

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ
ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΜΥΪΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

**EVALUATION OF ALTERATION IN APOPTOSIS-RELATED MOLECULES
EXPRESSION UPON AGING INDUCTION IN MUSCLE CELLS IN CULTURE**

**Τερζή Μελπομένη, Κωνσταντίνος
2025**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Λεωνίδας Δημήτριος

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Σκαμνάκη Βασιλική

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας - Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΣΚΟΠΟΣ	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΩΝ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ C2C12	9
1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	9
1.2.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	9
1.2.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	10
1.2.3 ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΩΘΟΥΝ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	10
1.2.4 ΦΑΙΝΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	12
1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ C2C12 ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ	15
1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ	15
1.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	15
1.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	16
1.4.3 ΚΑΣΠΑΣΕΣ	17
1.4.4 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	18
1.5. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	26
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	27
2.2 ΥΛΙΚΑ	28
2.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	28
2.2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ	29
2.2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	30
2.2.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	31
2.2.6 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	31
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ	31
2.3.1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	31
2.3.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
3.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ C2C12 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ D-GALACTOSE	38

3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BCL-2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 24 ΩΡΕΣ	40
3.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BCL-2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 48 ΩΡΕΣ	42
3.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ PROCASPASE-3 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 24 ΩΡΕΣ.....	45
3.5 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ PROCASPASE-3 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 48 ΩΡΕΣ.....	47
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια σταθερή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, που πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε παράγοντες καταπόνησης όπως η έλλειψη θρεπτικών ουσιών ή υποξία και οι διάφορες ακτινοβολίες. Οι παράγοντες αυτοί δημιουργούν βλάβες στα κύτταρα και τα αναγκάζουν να διακόψουν τον κυτταρικό τους κύκλο, ώστε να μην διαιωνίσουν το κατεστραμμένο γενετικό υλικό στα θυγατρικά τους κύτταρα. Παράλληλα τα γερασμένα κύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικά που μας επιτρέπουν να τα ξεχωρίσουμε από τα υγιή, με αξιοσημείωτη την ικανότητά τους να αντιστέκονται στην απόπτωση. Η αντίσταση αυτή τους δίνει χρόνο να επιδιορθώσουν τις βλάβες που έχουν προκληθεί από την γήρανση. Αν το επιτύχουν, μπορούν να επανενταχθούν στον κυτταρικό κύκλο και να ανακτήσουν την λειτουργικότητά τους. Αν οι βλάβες είναι εκτενείς και μη αναστρέψιμες τότε τα κύτταρα ενεργοποιούν την απόπτωση. Η απόπτωση αποτελεί μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά την οποία κύτταρα που έχουν συσσωρεύσει βλάβες ή δεν είναι πλέον απαραίτητα, εξαλείφονται χωρίς την δημιουργία φλεγμονής στους γύρω ιστούς. Σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της απόπτωσης κατέχουν ειδικές πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού, οι κασπάσες, οι οποίες χωρίζονται σε εναρκτήριες και εκτελεστικές. Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από δύο διαφορετικά μονοπάτια, το εξωγενές και το ενδογενές σηματοδοτικό μονοπάτι. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται από την πρόσδεση ειδικών προσδετών σε υποδοχείς-θανάτου της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων με αποτέλεσμα την στρατολόγηση ειδικών συμπλόκων και μορίων που τελικά θα οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση. Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται σε συνθήκες έκθεσης των κυττάρων σε παράγοντες καταπόνησης, με τελικό στόχο την ενεργοποίηση ειδικών πρωτεϊνών που οδηγούν στον θάνατο του κυττάρου.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση των μεταβολών των επιπέδων μορίων που σχετίζονται με απόπτωση, συγκεκριμένα της πρωτεΐνης Bcl-2 και προκασπάσης-3, κατά την επαγωγή γήρανσης μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια. Παράλληλα ήταν σημαντικός ο χαρακτηρισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης D-galactose που επάγει αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, σε συμφωνία με εδραιωμένα μοντέλα επαγόμενης γήρανσης. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυοβλαστών ποντικών από την κυτταρική σειρά C2C12 και πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες: δοκιμασία MTT και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα κύτταρα αρχικά εμφανίζουν μια αντίσταση στην απόπτωση. Στην συνέχεια ωστόσο λόγω αδυναμίας επιδιόρθωσης των βλαβών που προκαλούνται κατά την γήρανση, τελικά ενεργοποιούν τον μηχανισμό της απόπτωσης και πεθαίνουν. Μελλοντικές έρευνες θα στοχεύσουν στην περαιτέρω κατανόηση των βιοχημικών διεργασιών που επιτελούνται κατά την γήρανση, με έμφαση στην κατανόηση της ενεργοποίησης αποπτωτικών μηχανισμών σε προχωρημένα στάδια γήρανσης μυϊκών κυττάρων, σχετιζόμενα με παθολογικές καταστάσεις, συμβάλλοντας έτσι στον χαρακτηρισμό φαρμακευτικών στόχων και ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ABSTRACT

Cellular senescence is a permanent arrest of the cell cycle, which occurs when cells are exposed to stress-inducing factors, such as nutrient deprivation, hypoxia, and various forms of radiation. These stressors inflict damage upon the cells, compelling them to cease their proliferation in order to prevent the transmission of impaired genetic material to their progeny. Senescent cells exhibit distinctive characteristics that allow them to be distinguished from healthy cells, notably their increased resistance to apoptosis. This resistance provides time during which the cells may repair the damage incurred during senescence. If successful, the cells may re-enter the cell cycle and regain their functionality. However, if the damage is extensive and irreversible, the cells initiate apoptosis. Apoptosis is a form of programmed cell death where damaged or non-essential cells are eliminated in a controlled manner, without inducing inflammation in the surrounding tissues. Specific cysteine-aspartic proteases, known as caspases, have a central role in the apoptotic process. They are further categorized into initiator and executioner caspases. Apoptosis can be triggered via two distinct signaling pathways: the extrinsic and the intrinsic pathway. The extrinsic pathway is activated by the binding of specific ligands to death receptors on the cellular membrane, leading to the recruitment of specialized complexes and molecules that ultimately drive the cell towards apoptosis. Conversely, the intrinsic pathway is initiated under conditions of cellular stress, causing the activation of specific proteins that promote cell death.

The aim of the present thesis was to investigate the changes in the levels of apoptosis related molecules, specifically Bcl-2 protein and procaspase-3, during the induction of senescence in cultured muscle cells. Additionally, it was essential to determine the concentration of D-galactose that induces cellular senescence, in accordance with known cellular senescence model. For the experiments, mouse myoblasts from the C2C12 cell line were utilized, and the following procedures were carried out: the MTT assay and Western blot analysis. The results demonstrated that the cells initially exhibit resistance to apoptosis. However, due to their inability to repair the accumulated senescence-induced damage, they eventually activate the apoptotic machinery and undergo cell death. Future research will aim to further elucidate the biochemical processes involved in aging, with a particular focus on understanding the activation of apoptotic mechanisms in advanced stages of muscle cell aging, especially in relation to pathological conditions. This will contribute to the identification of potential pharmacological targets and the development of therapeutic strategies.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η ο χαρακτηρισμός των επιπέδων προ-αποπτωτικών και αντί-αποπτωτικών μορίων σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12, έπειτα από επαγόμενη γήρανση με την χρήση D-galactose. Παράλληλα ήταν απαραίτητη η διερεύνηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων D-galactose, οι οποίες επάγουν κυτταρική γήρανση, ωστόσο επιτρέπουν σε πολλά κύτταρα να παραμείνουν ζωντανά ώστε να μελετηθούν. Η έρευνα αυτή αποσκοπεί στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση και την ενεργοποίηση αποπτωτικών διεργασιών, συμβάλλοντας σε μελλοντικές προσπάθειες εντοπισμού θεραπευτικών στόχων και ανάπτυξης στρατηγικών για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τη γήρανση του μυϊκού ιστού.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΩΝ

Συντομογραφίες	Απόδοση όρων
MRFs	Myogenic Regulatory Factors
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
OIS	Oncogene-Induced Cellular Senescence
DDR	DNA Damage Response
ATM	Ataxia-Telangiectasia-Mutated
ATR	Ataxia-Telangiectasia-Mutated and Rad3-Related
CDKs	Cyclin-dependent kinases
H2AX	H2A Histone Family Member X
53BP1	p53-Binding Protein 1
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
MDC1	Mediator of DNA Damage Checkpoint 1
CCFs	Cytoplasmic Chromatin Fragments
DAMPs	Damage-Associated Molecular Pattern
SAHFs	Senescence-Associated Heterochromatic Foci
H3K9	Trimethylated Histone H3 Lys9
HP1	Heterochromatin Protein 1
PTPs	Protein Tyrosine Phosphatases
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
ApoBDs	Apoptotic Bodies
FADD	Fas-Associated Death Domain
TRADD	TNF Receptor 1 Associated Death Domain
RIP	Receptor Interacting Protein
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
RIPK1	RIP Kinase 1
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
BCL-2	B-cell Lymphoma 2
BAX	BCL2 Associated X
BAK	BCL2 antagonist/killer 1
Apaf-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
IAPs	Inhibitors of Apoptosis
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
CAD	Caspase-Activated DNase
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ C2C12

Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικών που χρησιμοποιείται ευρέως στην μελέτη της βιολογίας των σκελετικών μυϊκών κυττάρων (Carter, S. 2019) . Χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται και να συντήκονται σχηματίζοντας ώριμους μυοσωλήνες. Αρχικά τα κύτταρα C2C12 απομονώθηκαν από δορυφορικά κύτταρα μυών ποντικίου. Τα δορυφορικά κύτταρα αποτελούν μυογενή κύτταρα που μπορούν να αυτό-ανανεωθούν, να διαφοροποιηθούν και να σχηματίσουν νέες μυϊκές ίνες οδηγώντας στην αναγέννηση του μυϊκού ιστού. (Karalaki, M. 2009). Η διαφοροποίηση των μυοβλαστών ρυθμίζεται από πολλές σηματοδοτικές οδούς που ορίζουν την ισορροπία μεταξύ μυϊκής ανάπτυξης και ατροφίας και καθοδηγείται από μια ομάδα μυογενών ρυθμιστικών παραγόντων (Myogenic Regulatory Factors, MRFs) οι οποίοι ρυθμίζουν συνεργατικά την ανάπτυξη των σκελετικών μυών (Hernández-Hernández, J.M. 2017)

1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια σταθερή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, που συμβαίνει όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε παράγοντες καταπόνησης όπως η έλλειψη θρεπτικών ουσιών, η υποξία και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Calcinotto et al., 2019). Η γήρανση δρα ως ένας αμυντικός μηχανισμός που εμποδίζει τα γηραιά και κατεστραμμένα κύτταρα να υποστούν περαιτέρω βλάβες καθώς και να επανενταχθούν στον κυτταρικό κύκλο (Herranz et al., 2018). Παράλληλα τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν πολλές φαινοτυπικές αλλοιώσεις όπως μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, αναδιατάξεις στην χρωματίνη αλλά και αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Παρατηρείται επίσης η έκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων αποδίδοντας στα κύτταρα αυτά έναν εκκριτικό φαινότυπο που σχετίζεται με την γήρανση (SASP). Η γήρανση κατέχει έναν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, πέρα από τον ρόλο της σε ασθένειες που σχετίζονται με την γήρανση. Συμβάλλει στην εμβρυογένεση προωθώντας την σωστή ανάπτυξη των εμβρυικών κυττάρων, στην αναδιαμόρφωση των ιστών, όπως και στην πρόληψη της καρκινογένεσης (Calcinotto et al., 2019).

Η κυτταρική γήρανση θεωρούνταν μια στατική καθορισμένη κυτταρική μοίρα. Ωστόσο πρόκειται για μια δυναμική διαδικασία αποτελούμενη από πολλά βήματα (Van Deursen, JM. et al., 2014). Τα πρωτογενή σήματα που προωθούν την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο αποτελούν μόνο το πρώτο βήμα μίας σειράς μηχανισμών που θα οδηγήσουν τελικά το κύτταρο σε γήρανση. Αναδιαμορφώνοντας την χρωματίνη τους και ενεργοποιώντας τον φαινότυπο SASP, τα κύτταρα εισέρχονται σε ένα δεύτερο στάδιο, πλήρους γήρανσης. Η είσοδος τους στην τρίτη κατάσταση της όψιμης γήρανσης εξαρτάται από την ικανότητά τους να εξελίσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και εν τέλει να διαφοροποιηθούν σε συγκεκριμένους

φαινοτύπους γήρανσης *in vivo*. Η οξεία γήρανση αποτελεί μια προγραμματισμένη διαδικασία που ενεργοποιείται ως απόκριση σε διακριτούς παράγοντες καταπόνησης και εγκαθίσταται ταχύτατα, συμβάλλοντας στην ομοιόσταση των ιστών. Αντιθέτως η χρόνια γήρανση προκύπτει από μακροχρόνια απρογραμματίστη βλάβη και σχετίζεται με κύτταρα που βρίσκονται σε βαθιά γήρανση. Παράλληλα η αποτελεσματικότητα και η ταχύτητα απομάκρυνσης των γερασμένων κυττάρων ποικίλει ανάλογα με το όργανο στο οποίο συσσωρεύονται ή την γενική ικανότητα τους να προκαλούν μια ανοσολογική απόκριση (Herranz et al., 2018). Για παράδειγμα, ενώ τα κύτταρα που υφίστανται γήρανση που προκαλείται από ογκογόνα (OIS) στο ήπαρ καθαρίζονται αποτελεσματικά από το ανοσοποιητικό σύστημα, τα γερασμένα κύτταρα στους μελανοκυτταρικούς σπίλους συχνά καταφέρνουν να αποφύγουν την ανοσολογική κάθαρση και να επιμένουν (Kang TW, et al 2011) (Michaloglou C. et al., 2005)

1.2.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

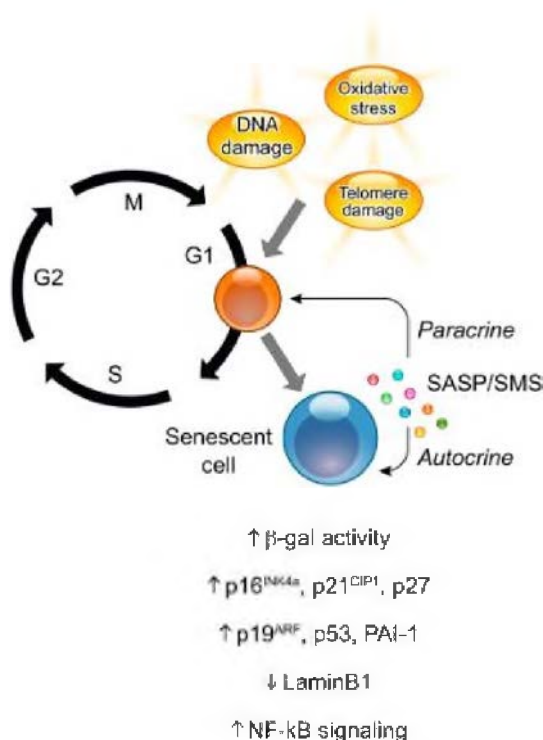
Τα γερασμένα κύτταρα δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν από συγκεκριμένους βιοδείκτες, παρά μόνο από έναν γενικό φαινότυπο. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου θεωρείται ένα κύριο χαρακτηριστικό των γερασμένων κυττάρων, ωστόσο δεν μπορεί να ληφθεί ως μοναδικό κριτήριο αναγνώρισής τους. Τα κύτταρα που υφίστανται γήρανση εμφανίζουν επιπλέον αδυναμία στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Dimri GP, Campisi J. 1994) όπως και υψηλή έκφραση αναστολέων του κυτταρικού κύκλου όπως οι p12INK4a, p21CIP1 και p27. Ορισμένα σημεία της χρωματίνης σχηματίζουν πυρηνικές 'εστίες' (DNA-SCARS) οι οποίες ενισχύουν την γήρανση πυροδοτώντας την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση του κυττάρου σε βλάβες (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; Rodier et al., 2009). Τα γερασμένα κύτταρα διατηρούν την ικανότητα να αυξάνονται σε μέγεθος αλλά και να είναι μεταβολικά ενεργά, εκκρίνοντας μάλιστα αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και πρωτεάσες με παρακρινή και αυτοκρινή δράση (Acosta et al., 2008; Corré et al., 2008, 2010; Kuilman et al., 2008)

1.2.3 ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΩΘΟΥΝ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

Η κυτταρική γήρανση προκαλείται από ποικίλα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια σήματα, τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση ενός συστήματος απόκρισης και εν τέλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου (d'Adda di Fagagna F. 2008). Ένα από τα πιο σημαντικά αποτελεί η σταδιακή απώλεια DNA από τα άκρα των χρωμοσωμάτων, τα τελομερή (Shawi M, Autexier C. 2008). Τα τελομερή είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων, που προστατεύουν τα κύτταρα από φθορές. Με κάθε κυτταρική διαίρεση χάνονται 50-200bp μη αντιγραφμένου DNA στο άκρο 3' των χρωμοσωμάτων. Το ένζυμο τελομεράση αντισταθμίζει την απώλεια των τελομερών προσθέτοντας νουκλεοτιδικές βάσεις. Ωστόσο η δράση της τελομεράσης δεν μπορεί να συμβαδίσει με τους ταχύτατους ρυθμούς της κυτταρικής διαίρεσης, οδηγώντας τελικά στην μείωση του μήκους των τελομερών και την επαγωγή γήρανσης (Ολοννίκον, ΑΜ. 1971). Παράλληλα η έκθεση σε έντονα μιτογόνα σήματα επιταχύνει

τις διαδικασίες της αντιγραφής με αποτέλεσμα την δημιουργία προβληματικών διχάλων αντιγραφής, την ανακριβή τοποθέτηση των νέων νουκλεοτιδίων και την συσσώρευση βλαβών.(Di Micco R, et al 2006). Τέλος εξωτερικά ερεθίσματα όπως η έκθεση σε υπερϊώδης ακτινοβολίες, χημικοθεραπευτικά φάρμακα αλλά και σε συγκεκριμένες ουσίες πυροδοτούν την κυτταρική γήρανση (d'Adda di Fagagna F. 2008).

Όλα αυτά τα ερεθίσματα ενεργοποιούν μια έντονη απόκριση βλάβης του DNA (DNA Damage Response, DDR), ένα σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Ataxia-Telangiectasia-Mutated, ATM) και (Ataxia-Telangiectasia-Mutated and Rad3-Related, ATR) μπλοκάρουν τον κυτταρικό κύκλο, σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη p53 και ενεργοποιώντας την μεταγραφή του αναστολέα κινάσων εξαρτώμενων από κυκλίνη (Cyclin-dependent kinases, CDKs) p21 (Cazzalini O. 2010). Παράλληλα τα κύτταρα στα οποία έχει ενεργοποιηθεί η DDR χαρακτηρίζονται από υψηλή εμφάνιση της ιστόνης γ-H2AX όπου η ιστόνη H2AX είναι φωσφορυλιωμένη στην σερίνη 139, καθώς και από τις πρωτεΐνες 53BP1, NBS1 και MDC1 (d'Adda di Fagagna F, et al.2003). Λειτουργώντας συλλογικά, αυτά τα μόρια οδηγούν στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου που εν τέλει θα οδηγηθεί σε γήρανση αν το κύτταρο δεν καταφέρει να διορθώσει τις βλάβες του.



Εικόνα 1: Ερεθίσματα και αποτελέσματα της κυτταρικής γήρανσης

Ερεθίσματα όπως το οξειδωτικό στρες, βλάβες του DNA και απώλεια των τελομερών οδηγούν στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1. Το κύτταρο εισέρχεται σε μια κατάσταση γήρανσης κατά την οποία μπορεί να εμφανίσει τον φαινότυπο SASP, εκκρίνοντας ένα σύνολο κυτοκινών και χημειοκινών τα οποία δρουν με αυτοκρινή ή παρακρινή σηματοδότηση. Παράλληλα ορισμένα επιπλέον χαρακτηριστικά που εμφανίζουν τα κύτταρα, ενδεικτικά της γήρανσης, είναι αύξηση στην δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης, σε ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως οι p16^{INK4a} και ο p27, σε ρυθμιστές απόκρισης της βλάβης όπως p19^{ARF} και ο p53, καθώς και στην φλεγμονώδη

σηματοδότηση του NF-κΒ. Τέλος εμφανίζεται μείωση στην L aminB1, πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου.

Πηγή: Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047–1078.

1.2.4 ΦΑΙΝΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.2.4.1 ΔΙΑΚΟΠΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου λόγω ερεθισμάτων που οδηγούν τελικά στην γήρανση του κυττάρου είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία. Διαφέρει από την φάση ηρεμίας του κυττάρου (G0), στην οποία εισέρχονται τα κύτταρα προσωρινά λόγω έλλειψης των απαραίτητων σηματοδοτικών μορίων που προωθούν τον κυτταρικό κύκλο. Μόλις αυτά τα κύτταρα εκτεθούν στις κατάλληλες συνθήκες μπορούν να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό τους (He and Sharpless, 2017). Σημαντικό ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου κατέχουν οι πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος (Rb) και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Rodier and Campisi, 2011). Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι πρωτεΐνες RB (RB1,p107,p130) είναι προσδεμένες σε ειδικούς ρυθμιστές της μεταγραφής όπως ο E2F και αποτρέπουν την δράση τους στην μεταγραφή γονιδίων που είναι απαραίτητα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όταν εξωτερικά σήματα όπως τα μιτογόνα ληφθούν από το κύτταρο, οι πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK2,CDK4,CDK6) φωσφορυλιώνουν τις RB, και τις αναγκάζουν να απελευθερώσουν τους ειδικούς ρυθμιστές ώστε να επαχθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Sharpless and Sherr, 2015). Κατά την γήρανση ωστόσο λόγω εντοπισμού κυτταρικής βλάβης, το κύτταρο αυξάνει την συγκέντρωση της πρωτεΐνης p53. Πρόκειται για ένα μεταγραφικό ρυθμιστή που ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου του αναστολέα των CDK κινάσων p21^{CIP}, ο οποίος μπλοκάρει την δράση της κινάσης CDK2, οδηγώντας σε μη φωσφορυλίωση της RB και συνεπώς αδυναμία επαγωγής του κυτταρικού κύκλου (d'Adda di Fagagna F. 2008). Παράλληλα την δράση των μορίων αυτών ενισχύει η μετατροπή της ευχρωματίνης των γονιδίων στόχων της E2F σε ετεροχρωματίνη (Salama et al., 2014), οι δράσεις των κυτοκινών που εκκρίνονται από τα κύτταρα (Rodier and Campisi, 2011), καθώς και η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Takahashi et al., 2006).

-

1.2.4.2 ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ (SASP)

Τα κύτταρα που υφίστανται γήρανση έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν τα γειτονικά κύτταρα και το εξωκυττάριο περιβάλλον. Παράγουν ένα περίπλοκο μίγμα διαλυτών και αδιάλυτων μορίων που συλλογικά ορίζεται ως εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με την γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype, SASP) (Kuilman and Peeper, 2009). Ανάμεσα στα εκκρινόμενα υλικά συμπεριλαμβάνονται προ-φλεγμονώδης κυτοκίνες (IL-6, IL-8, IL1a), χημειοκίνες (CXCL-2, CSCL-3, CXCL-5), αυξητικοί παράγοντες και πρωτεάσες, ωστόσο επικρατεί ετερογένεια των εκκρινόμενων μορίων στα διαφορετικά κύτταρα. (Corpe JP., 2010). Ανάμεσα στις

δράσεις του SASP περιλαμβάνονται η αυτοκρινής και παρακρινής μετάδοση της γήρανσης, η ενεργοποίηση ανοσολογικής απόκρισης που απομακρύνει τα γερασμένα κύτταρα καθώς και η επούλωση τραυμάτων. (Demaria et al., 2014). Το SASP ενεργοποιείται από ποικίλα σήματα όπως βλάβη του DNA, κυτταροπλασματικά θραύσματα χρωμοσωμάτων (Cytosolic Chromatin Fragments, CCFs) και μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη (Damage Associated Molecular Pattern, DAMPs) (Acosta et al., 2013). Παράλληλα ρυθμίζεται κυρίως από την δράση μεταγραφικών παραγόντων όπως NF-κΒ, C/EBPβ, GATA4 (Ito et al., 2017), καθώς και από σηματοδοτικά μονοπάτια των mTOR και p38MAPK (Freund et al., 2011). Οι επιδράσεις του SASP είναι πληθώρες και μπορούν να χαρακτηριστούν ευεργετικές ή και επιζήμιες. Το SASP ενισχύει την διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω ενός αυτοκρινή βρόχου θετικής ανάδρασης, και μέσω της δράσης των κυτοκινών και χημειοκινών (Acosta JC., 2008). Ταυτόχρονα μέσω παρακρινής σηματοδότησης επάγει γήρανση σε έντονα πολλαπλασιαζόμενα γειτονικά κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι της ογκογένεση (Biran A., 2015). Ωστόσο η σχέση του SASP και της ανοσολογικής απόκρισης είναι αμφιλεγόμενη. Ενώ μπορεί να επιστρατεύει το ανοσολογικό σύστημα προκειμένου να απομακρυνθούν γερασμένα κύτταρα, μπορεί και να το αναστείλει σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου (Herranz & Gil, 2018).

1.2.4.3 Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ (SA β-gal)

Το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης που σχετίζεται με την γήρανση (SA β-gal) λειτουργεί σε φυσιολογικά κύτταρα σε συνθήκες pH 4,0-4,5. Ωστόσο στην γήρανση η δράση της ενισχύεται σημαντικά λόγω του μεγάλου αριθμού λυσοσωμάτων και εντοπίζεται σε pH 6,0 (Kurz DJ et al., 2000). Η αύξηση στον αριθμό των λυσοσωμάτων οφείλεται στην ανάγκη του κυττάρου να ισορροπήσει τις συγκεντρώσεις των λυσοσωμάτων που έχουν υποστεί βλάβες και των φυσιολογικών. Ο εντοπισμός της αυξημένης δραστηριότητας της SA β-gal σε κύτταρα που υφίστανται γήρανση, την καθιστά ένα κριτήριο χαρακτηρισμού των γερασμένων κυττάρων.

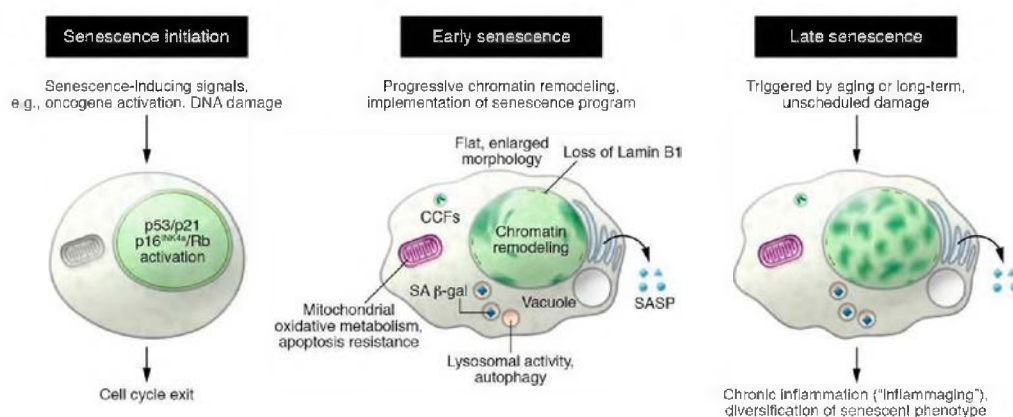
1.2.4.4 ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ

Στα κύτταρα που υφίστανται γήρανση εντοπίζονται 'εστίες' αλλοιωμένων τμημάτων χρωματίνης που ενισχύουν την γήρανση όπως τα τμήματα DNA με αλλοιώσεις χρωματίνης που ενισχύουν την γήρανση (DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence, DNA-SCARS) όπως και οι εστίες ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με την γήρανση (Senescence Associated Heterochromatin Foci, SAHFs) (Narita M, et al., 2003). Οι περιοχές αυτές αποτελούν δυναμικές δομές που μπορούν να ρυθμίσουν μηχανισμούς των γερασμένων κυττάρων όπως η αναστολή του κυτταρικού κύκλου και το SASP (Rodier et al., 2011). Οι SAHFs χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη της τριμεθυλιωμένης H3K9 (trimethylated histone H3 Lys9, H3K9me3), της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης 1 (Heterochromatin Protein 1, HP1), και από απώλεια της συνδετικής ιστόνης H1 (Salama R, et al., 2014). Η τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K9 οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της λαμίνης B, (Dou et al., 2015), η οποία τελικά θα οδηγήσει σε αναδιοργάνωση της χρωματίνης.

Παράλληλα η επαγωγή της γήρανσης οδηγεί σε καταστροφή των πρωτεϊνών, κυρίως λόγω παραγωγής των ROS οι οποίες οξειδώνουν τόσο τα κατάλοιπα μεθειονίνης όσο και τα κατάλοιπα κυστεΐνης και μεταβάλλουν την αναδίπλωση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών (Höhn et al., 2017). Ταυτόχρονα μπορούν να επηρεαστούν και πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (Protein Tyrosine Phosphatases, PTPs) οι οποίες φέρουν στα ενεργά τους κέντρα κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία λόγω της οξείδωσης μπορούν να απενεργοποιηθούν. Η οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών είναι μη αντιστρέψιμη με αποτέλεσμα αυτές να απομακρύνονται με αποικοδόμηση από το σύστημα πρωτεασώματος-ουβικουιτίνης (Ubiquitin Proteasome System UPS) ή με αυτοφαγοσώματα (Deschênes-Simard et al., 2013).

1.2.4.5 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗ

Παράλληλα τα κύτταρα που υφίστανται γήρανση εμφανίζουν μεταβολικές αλλαγές καθώς και τροποποιήσεις στη μιτοχονδριακή δομή και λειτουργία. Παρατηρείται αυξημένη διαρροή πρωτονίων, μειωμένο δυναμικό μεμβράνης αλλά και αφθονία των μεταβολιτών του κύκλου TCA (Kaplon et al., 2013; Passos et al., 2010). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι λειτουργίες ενός κυττάρου που υφίσταται γήρανση όπως το SASP, απαιτούν υψηλές ποσότητες ενέργειας με αποτέλεσμα να παρατηρείται μη φυσιολογική αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Ωστόσο αυτή η ανώμαλη λειτουργία των μιτοχονδρίων σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα μιτοφαγίας που εμφανίζουν τα γερασμένα κύτταρα, οδηγούν στην συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων και αυξημένη παραγωγή ROS . (Sun N. 2016). Τελικά η αυξημένη παραγωγή των ROS θα πυροδοτήσει την απόκριση βλάβης του DNA (DNA Damage Response, DDR) ενισχύοντας τις διεργασίες της κυτταρικής γήρανσης.



Εικόνα 2: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κυττάρων σε διαφορετικά στάδια της γήρανσης

Η έναρξη της γήρανσης πυροδοτείται από ερεθίσματα όπως βλάβες στο DNA και έκφραση ογκογονιδίων. Τα κύτταρα αποκρίνονται ενεργοποιώντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια των p53/p21 και p16^{INK4a}/Rb, που τελικά οδηγούν στην έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο. Κατά την πρώιμη γήρανση παρατηρούνται αλλαγές όπως αναδιάταξη της χρωματίνης, ενεργοποίηση του SASP, αυξημένη λυσοσωμική δραστηριότητα καθώς και αντίσταση στην απόπτωση. Τέλος αφού το κύτταρο έχει φτάσει σε μια κατάσταση όψιμης γήρανσης εμφανίζεται χρόνια φλεγμονή και διαφοροποίηση του φαινότυπου των γερασμένων κυττάρων.

Πηγή: Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246.

1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ C2C12 ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ

Η ερευνητική ομάδα των Moustogiannis A. et al., (2021) μελέτησαν την επίδραση της κυτταρικής γήρανσης στη λειτουργία και την ικανότητα διαφοροποίησης μυϊκών κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, παρατηρήθηκε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0/G1 στα γερασμένα κύτταρα καθώς και ελάχιστα από αυτά κατάφεραν να φτάσουν στην φάση G2/M σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (control). Παρατηρήθηκε υψηλή δραστηριότητα της SA β-gal καθώς και υψηλά ποσοστά ρήξεων στους κλώνους του DNA. Παράλληλα μελέτησαν την επίδραση της γήρανσης στους μυογενείς ρυθμιστικούς παράγοντες (Myogenic Regulatory Factors, MRFs), εξετάζοντας την ικανότητα διαφοροποίησης των γερασμένων κυττάρων σε μυοσωλήνες. Παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των αρχικών (Myf5, MyoD), και των τελικών (myogenin, MRF4) παραγόντων διαφοροποίησης σε σχέση με τα controls. Στα περισσότερα κύτταρα υπήρξε μια γενική καθυστέρηση και αδυναμία της διαφοροποίησης, με τους πλέον διαφοροποιημένους μυοσωλήνες να εμφανίζουν διαφορές στην μορφολογία τους, στο μήκος και την διάμετρό τους σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της γήρανσης σε παράγοντες μυϊκής ατροφίας, όπως η μυοστατίνη ο Murf1 και ο Atrogin 1, στους οποίους παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφρασή τους. Τέλος μελετήθηκε η έκφραση του PPAR-γ, ο οποίος κατά την διαδικασία διαφοροποίησης των μυϊκών κυττάρων, βελτιώνει την ευαισθησία τους στην ινσουλίνη, ενισχύοντας τον μηχανισμό ανάπτυξης. Παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του PPAR-γ, με συνέπεια τα γερασμένα μυϊκά κύτταρα να αποκτούν αντίσταση στην ινσουλίνη. Η ερευνητική ομάδα οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι η κυτταρική σειρά C2C12 με την επαγωγή γήρανσης εμφανίζει τον χαρακτηριστικό φαινότυπο όλων των γερασμένων κυττάρων καθώς και επηρεάζει την ικανότητα και την ποιότητα της διαφοροποίησης τους.

1.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

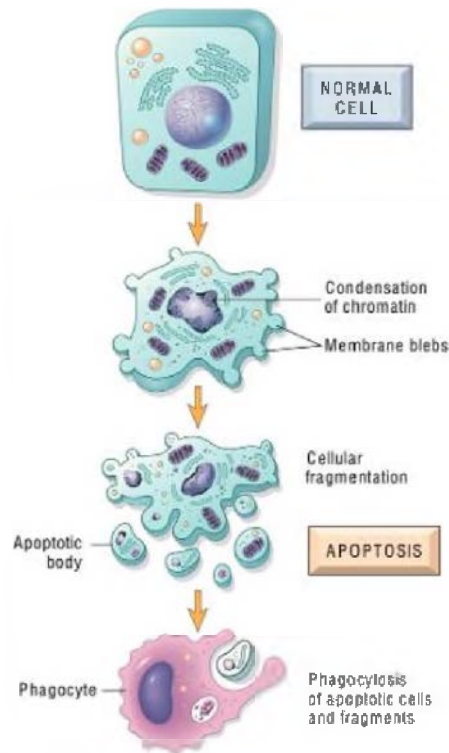
1.4.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Η επιβίωση και ο θάνατος των κυττάρων ρυθμίζεται εκτενώς από τον μηχανισμό της απόπτωσης, που αποτελεί μαζί με την νέκρωση, την πυρόπτωση και την αυτοφαγία τις κύριες μορφές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Mustafa M. et al., 2024). Η απόπτωση πρόκειται για μια ενεργητική και αυστηρά ρυθμιζόμενη βιολογική διαδικασία, μέσω της οποίας το κύτταρο αυτοκαταστρέφεται με τρόπο που δεν προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση στους γύρω ιστούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η απόπτωση πραγματοποιείται κατά την ανάπτυξη και γήρανση των οργανισμών όταν τα κύτταρα παύουν να είναι πλέον χρήσιμα, ή συσσωρεύουν

βλάβες, ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός για τη διατήρηση των κυτταρικών πληθυσμών στους ιστούς (Elmore, 2007). Παράλληλα συμβάλει στην άμυνα του οργανισμού όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί βλάβη από ασθένειες ή επιβλαβείς παράγοντες (Norbury και Hickson, 2001). Η δυσλειτουργία αυτής της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, οι αυτοάνοσες νόσοι και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

1.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στα κύτταρα που προορίζονται για απόπτωση παρατηρούνται ορισμένες μορφολογικές αλλαγές. Κατά το πρώιμο στάδιο της απόπτωσης, τα κύτταρα υφίστανται μια χαρακτηριστική συρρίκνωση ενώ τα οργανίδια οργανώνονται πιο στενά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια χάνουν την ακεραιότητα της μεμβράνης τους και υφίστανται μεταβολές στην ενεργότητα και δομή τους που σχετίζονται με την απόπτωση όπως: (1) μεταβολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της παραγωγής ATP, (2) διακοπή του δυναμικού οξειδοαναγωγής και (3) απελευθέρωση μορίων που εκκινούν τη δραστηριοποίηση κασπασών (Fleischer et al, 2006). Ταυτόχρονα εμφανίζεται το φαινόμενο της πύκνωσης, η μη αναστρέψιμη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα. Στην συνέχεια ακολουθεί η καρρυόρευση (karyorrhexis), η οποία αναφέρεται στον κατακερματισμό του πυρήνα. Η καρυόρευση συνοδεύεται από περαιτέρω δημιουργία φυσαλίδων στην πλασματική μεμβράνη που διασπά τα αποπτωτικά κύτταρα σε μικρά κυστίδια τα αποπτωτικά σώματα (Apoptotic Bodies, ApoBDs). Το περιεχόμενο των αποπτωτικών κυττάρων κατανέμεται τυχαία στα ApoBDs, με αποτέλεσμα ένα συγκεκριμένο οργανίδιο ή τμήμα του πυρηνικού υλικού να μπορεί είτε να περιλαμβάνεται είτε να απουσιάζει από κάποιο συγκεκριμένο αποπτωτικό σώμα. Τέλος τα ApoBDs απορροφώνται από φαγοκύτταρα, για τελική αποικοδόμηση με σκοπό την απομάκρυνση βλαβερών ουσιών από τον οργανισμό. (Xu, Lai, & Hua, 2019). Ουσιαστικά δεν υπάρχει φλεγμονώδης αντίδραση που να σχετίζεται με τη διαδικασία της απόπτωσης ούτε με την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων καθώς, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν τα κυτταρικά τους συστατικά στον περιβάλλοντα διάμεσο ιστό, φαγοκυτταρώνονται γρήγορα από τα περιβάλλοντα κύτταρα, αποτρέποντας έτσι πιθανώς τη δευτερογενή νέκρωση και, τα κύτταρα που τα κατακλύζουν δεν παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Savill and Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003).



Εικόνα 3: Μορφολογία αποπτωτικών κυττάρων

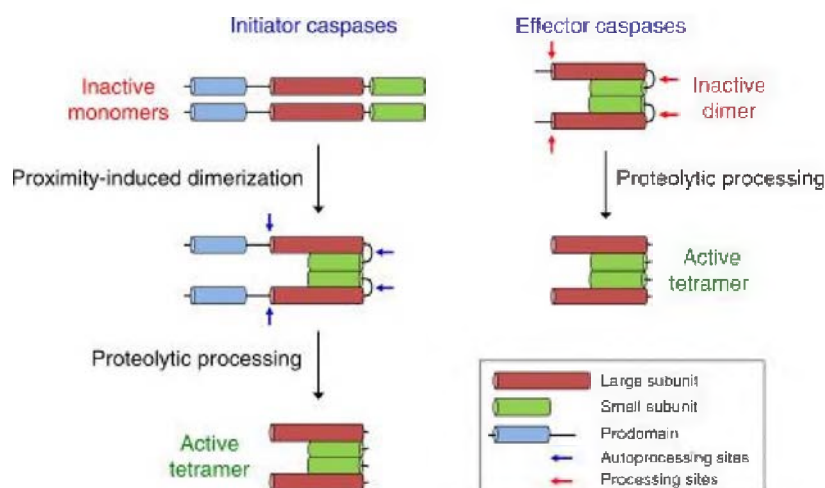
Ένα υγιές κύτταρο λειτουργεί φυσιολογικά με όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα και οργανίδια να διατηρούν την ακεραιότητά τους. Μόλις ενεργοποιηθεί η απόπτωση παρατηρείται συμπύκνωση της χρωματίνης στον πυρήνα, καθώς και μεμβρανικές φυσαλίδες που προέρχονται από την κυτταρική μεμβράνη. Στην συνέχεια το κύτταρο διασπάται σε αποπτωτικά σώματα (ΑpoBDs), τα οποία κουβαλούν συστατικά του κυττάρου όπως μόρια και οργανίδια. Τέλος φαγοκύτταρα όπως τα μακροφάγα, "καταβροχθίζουν" τα αποπτωτικά σώματα, με σκοπό την απομάκρυνσή τους χωρίς την παραγωγή φλεγμονής.

Πηγή: Astier, A.L.P. (2021) Necrosis and apoptosis - what are the differences and their significances", AndreasAstier. Available at: <https://www.andreasastier.com/blog/necrosis-and-apoptosis-what-are-the-differences-and-their-significances>.

1.4.3 ΚΑΣΠΑΣΕΣ

Η έναρξη της απόπτωσης εξαρτάται από την ενεργοποίηση μιας σειράς κυστεΐνο-ασπαρτικών πρωτεασών γνωστών ως κασπάσες. Αρχικά εκφράζονται σε μια δομή απενεργοποιημένου προ-ενζύμου, εν ονόματι προ-κασπάσες. Μόλις ενεργοποιηθούν μπορούν στην συνέχεια να ενεργοποιήσουν άλλες προκασπάσες, επιτρέποντας την έναρξη ενός καταρράκτη πρωτεασών (Elmore, 2007). Οι κασπάσες έχουν πρωτεολυτική δράση και είναι ικανές να διασπούν πρωτεΐνες σε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, αν και διαφορετικές κασπάσες έχουν διαφορετικές εξειδικεύσεις που περιλαμβάνουν την αναγνώριση γειτονικών αμινοξέων. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί δέκα κύριες κασπάσες και έχουν κατηγοριοποιηθεί ευρέως σε εκκινήτες (κασπάση-2,-8,-9,-10), τελεστές ή εκτελεστές (κασπάση-3,-6,-7) και φλεγμονώδεις κασπάσες (κασπάση-1,-4,-5) (Cohen, 1997; Rai et al., 2005). Η ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών ξεκινά μια αλληλουχία γεγονότων που έχει ως αποτέλεσμα

τον κατακερματισμό του DNA από την ενεργοποίηση ενδονουκλεασών, την καταστροφή των πυρηνικών πρωτεϊνών και του κυτταροσκελετού, τη διασύνδεση πρωτεϊνών, την έκφραση υποκαταστατών για φαγοκυτταρικά κύτταρα και τον σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων (Martinvalet et al., 2005; Poon et al., 2014). Μόλις οι κασπάσες ενεργοποιηθούν αρχικά, φαίνεται να υπάρχει μια μη αναστρέψιμη δέσμευση προς τον κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 4: Εναρκτήριες και εκτελεστικές κασπάσες

Οι εναρκτήριες κασπάσες όπως η κασπάση-8 και η κασπάση-9 αρχικά παράγονται ως ανενεργά μονομερή, με μια μεγάλη υπομονάδα, μια μικρή υπομονάδα και μια προ-επικράτεια. Στην συνέχεια όταν δυο μονομερή θρεθούν σε κοντινή απόσταση, ενώνονται μέσω των μικρών υπομονάδων, σχηματίζοντας διμερή. Τα διμερή αυτά αυτό-καταλύονται δημιουργώντας τελικά ένα ενεργό τετραμερές με δύο μεγάλες και δύο μικρές υπομονάδες. Οι εκτελεστικές κασπάσες όπως οι κασπάσες -3, -6, -7 αρχικά βρίσκονται σε μορφή ανενεργών διμερών, τα οποία ενεργοποιούνται από την πρωτεολυτική επεξεργασία των εναρκτήριων κασπασών, και τελικά να δημιουργηθεί ένα ενεργό τετραμερές.

Πηγή: J. Puccini, S. Kumar, 2016, Caspases, Encyclopedia of Cell Biology, Academic Press, Editors: Ralph A. Bradshaw, Philip D. Staid, p. 364-373

1.4.4. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

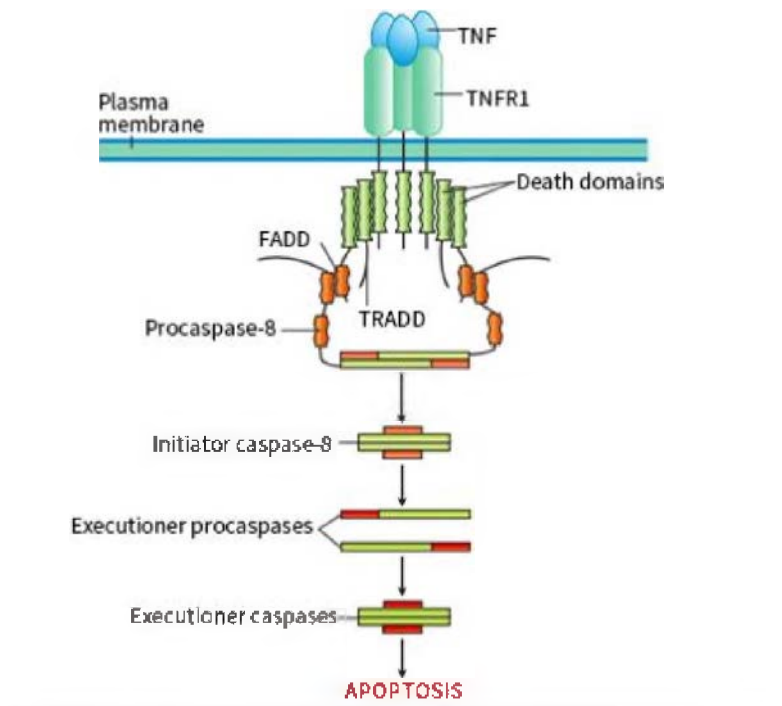
Δύο είναι τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει ένα κύτταρο: Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι ή αλλιώς η οδός του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF-α και το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι ή αλλιώς η μιτοχονδριακή οδός. Και τα δυο μονοπάτια της απόπτωσης λειτουργούν συνεργικά για να διασφαλιστεί ότι οι πολυκύτταροι οργανισμοί παραμένουν υγιείς και τα ελαττωματικά κύτταρα αφαιρούνται από το σώμα

1.4.4.1 ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Η ενεργοποίηση της απόπτωσης μπορεί να προκληθεί από σήματα που προέρχονται από γειτονικά κύτταρα, εκκινώντας έτσι το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης. Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης χαρακτηρίζεται από αλληλεπιδράσεις μέσω

διαμεμβρανικών υποδοχέων. Αυτές περιλαμβάνουν τους υποδοχείς θανάτου, που είναι μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν ως κοινό γνώρισμα τον πλούσιο σε κυστείνες εξωκυτταρικό τομέα, με την κυτταροπλασματική περιοχή να αποκαλείται "τομέας-επικράτεια θανάτου", με 80 περίπου αμινοξέα. (Zhou, Jiang, Liu, et al., 2017). Η τελευταία αυτή περιοχή είναι απολύτως απαραίτητη για τη μετάδοση του σήματος θανάτου από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου.

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου γίνεται μέσω ομαδοποίησης και σύνδεσης ειδικών τριμερών προσδετών (Elmore, 2007). Μερικά από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα ζευγάρια προσδετών/υποδοχέων είναι οι CD95/FasR, TNF- α /TNF-R1, Apo2L/DR4 και Apo2L/DR5 (Kashyap et al., 2021). Οι προσδέτες παράγονται κυρίως από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα και τα μακροφάγα (Thomas J Sayers, 2011). Η δέσμευσή τους στους αντίστοιχους υποδοχείς προκαλεί τριμερισμό του υποδοχέα θανάτου και οδηγεί στη συσώρευση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών προσαρμογής. Αυτές οι πρωτεΐνες φέρουν αντίστοιχες επικράτειες θανάτου που τους επιτρέπουν να αλληλοεπιδρούν με τις αντίστοιχες των υποδοχέων. Δύο από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες προσαρμογής είναι η επικράτεια θανάτου που σχετίζεται με την Fas (Fas Associated Death Domain FADD) και η επικράτεια θανάτου που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TNF Receptor 1 Associated Protein TRADD). Η δέσμευση του προσδέτη FasL στον υποδοχέα του FasR, έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση της κατάλληλης πρωτεΐνης προσαρμογής FADD. Από την άλλη, η δέσμευση του προσδέτη TNF- α στον υποδοχέα του TNFR οδηγεί στη δέσμευση της πρωτεΐνης προσαρμογής TRADD με την ταυτόχρονη στρατολόγηση του FADD και της κινάσης RIP (Receptor Interacting Protein)(Hsu et al., 1995). Η σύνδεση των πρωτεϊνών προσαρμογών ενεργοποιεί τις εναρκτήριες κασπάσες κασπάση-8 και κασπάση-10 και οδηγεί στον σχηματισμό ενός σηματοδοτικού συμπλόκου θανάτου (Death Inducing Signaling Complex DISC) (Berghe, T. V. et al 2004). Παράλληλα η ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών -8 και -10 μπορεί να γίνει από την πρωτεΐνη FLIP (FLICE Inhibitory Protein) που είναι παρούσα στο σύμπλοκο DISC (Scaffidi, C., 1999).



Εικόνα 5: Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης

Το εξωγενές σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται όταν ο προσδέτης TNF συνδέεται στον υποδοχέα θανάτου TNFR1. Η σύνδεση αυτή πυροδοτεί την δημιουργία του συμπλόκου DISC, ενδοκυτταρικά, που περιέχει τις πρωτεΐνες FADD και TRADD. Οι πρωτεΐνες αυτές σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες και μόρια που βρίσκονται στο σύμπλοκο DISC όπως η FLIP, συνδέουν την προκασπάση-8 και την ενεργοποιούν προκαλώντας τον διμερισμό της και μετατρέποντάς την σε κασπάση-8. Η ενεργή κασπάση-8 με την σειρά της θα ενεργοποιήσει τις εκτελεστικές κασπάσες με τελικό στόχο την ενεργοποίηση της απόπτωσης.

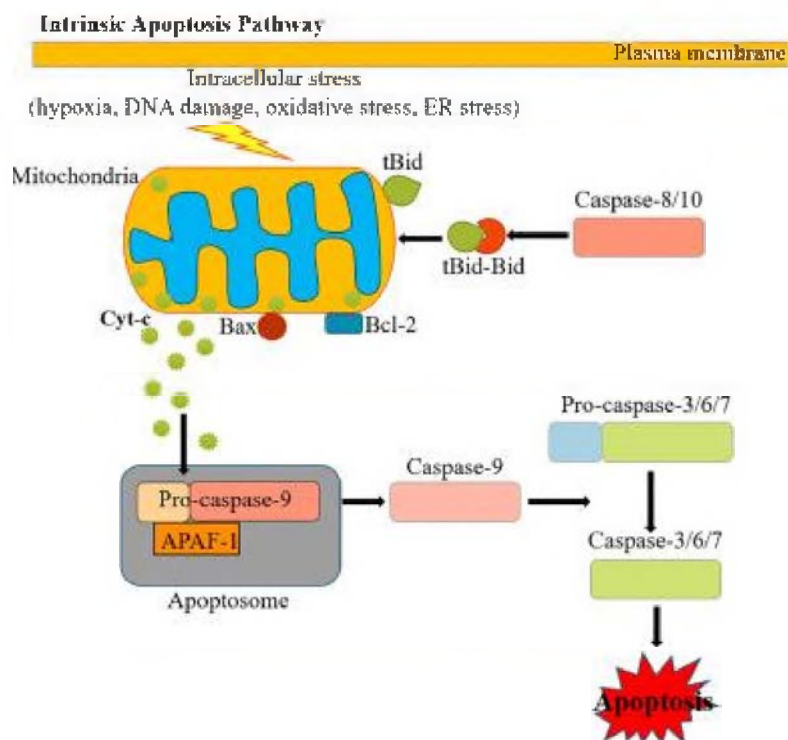
Πηγή: Sino Biological. *Extrinsic apoptosis signaling pathway*. Sino Biological. Available at: <https://www.sinobiological.com/category/extrinsic-apoptosis-signaling-pathway>

Ο σχηματισμός του σηματοδοτικού συμπλόκου θανάτου (DISC) οδηγεί στην αυτοκατάλυση και ενεργοποίηση της προ-κασπάσης -8 και την μετατρέπει στην ενεργή κασπάση-8 (Bertheloot et al, 2021). Η ενεργοποιημένη κασπάση-8 μπορεί να μυήσει την απόπτωση μέσα από δύο διαφορετικά υπό-μονοπάτια. Η επιλογή του μονοπατιού εξαρτάται από τα επίπεδα ενεργοποίησης της κασπάσης-8 κατά τη δημιουργία του DISC. Σε ορισμένα κύτταρα παράγεται μεγάλη ποσότητα της κασπάσης-8 η οποία οδηγεί στην άμεση διάσπαση και ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών, όπως της κασπάσης-3 (Z T Schug, 2010). Η κασπάση-3 υπάρχει αρχικά ως προκασπάση-3 (PC-3), η οποία είναι η ανενεργή μορφή και αποτελείται από έναν προτομέα, μια μεγάλη υπομονάδα και μια μικρή υπομονάδα. Αυτό γίνεται καθώς η προκασπάση-3 διασπάται σε ένα κατάλοιπο ασπαρτικού για να παραχθεί μια υπομονάδα p12 και p17 για να σχηματιστεί η διασπασμένη ενεργή κασπάση-3 (Silva et al, 2022). Στις δράσεις της κασπάσης-3 εμπεριέχεται η διάσπαση της ακτίνης, των πυρηνικών λαμινών, καθώς και η αναστολή μιας DNάσης προωθώντας έτσι την αποικοδόμηση του DNA, την κατάρρευση του κυτταροσκελετού και του πυρήνα (Anusri Yanumula, 2023). Η χαμηλή έκφραση της

έχει συνδεθεί με πιθανή αποτυχία στον αποπτωτικό μηχανισμό, επιτρέποντας το συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και ευνοώντας την ανάπτυξη καρκίνου (Boudreau et al, 2019). Παράλληλα ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες κασπάση-6 και κασπάση-7, που τελικά θα οδηγήσουν στην απόπτωση.

Σε ορισμένα κύτταρα τα επίπεδα της κασπάσης-8 δεν είναι επαρκή ώστε να ενεργοποιήσουν άμεσα την απόπτωση. Σε αυτά τα κύτταρα εμφανίζεται μια σύγκλιση μεταξύ της εξωκυττάριας και την ενδοκυττάριας οδού της απόπτωσης. (Thomas J Sayers, 2011). Συγκεκριμένη η ενεργοποιημένη κασπάση-8 διασπά και ενεργοποιεί την Bid, μέλος της προ-αποπτωτικής οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, μετατρέποντάς την σε tBid. (Mustafa et al., 2024). Η tBid οδηγεί στην απελευθέρωση του κυττοχρώματος c, ακολουθώντας την πορεία του ενδογενούς μονοπατιού. Έτσι εμφανίζεται μια σύζευξη του εξωγενούς και του ενδογενούς μονοπατιού, που τελικά και τα δύο καταλήγουν στην επαγωγή της απόπτωσης (Igney and Krammer, 2002).

Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και συνεπώς της εξωγενούς οδού της απόπτωσης μπορεί να ρυθμιστεί από ποικίλες πρωτεΐνες. Μια από αυτές είναι η FLIP, η οποία μοιάζει με κασπάση και βρίσκεται μέσα στο σύμπλοκο DISC καθώς και από την c-FLIP η οποία διαθέτει προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, ανάλογα με το ερέθισμα, και δεσμεύεται με το FADD και την κασπάση-8, καθιστώντας τα αναποτελεσματικά, εφόσον τα αδρανοποιεί (Scaffidi et al, 1999). Παράλληλα η πρωτεΐνη Toso μπορεί να εμποδίζει την επαγόμενη από το Fas απόπτωση των T κυττάρων μέσω της αναστολής της μετατροπής της κασπάσης 8 (Elmore, 2007). Τέλος η ενεργοποίηση της εξωγενούς αποπτωτικής οδού φαίνεται να επηρεάζεται και από τη δράση της πρωτεΐνης RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1). Η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει στη συγκρότηση του συμπλόκου DISC, καθώς αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες FADD και TRADD, μέσω της σύνδεσής της με τις επικράτειες θανάτου. Μέσω της στρατολόγησης των TRADD, προκασπάσης-8, της ουβικιτινοποιημένης μορφής της RIPK1 και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης FLIP στο DISC, αναστέλλεται η αποπτωτική δράση της κασπάσης-8 και ενεργοποιείται ένα προφλεγμονώδες μονοπάτι σηματοδότησης που εξαρτάται από τον παράγοντα NF-κΒ. Στην συνέχεια το αρχικό σύμπλοκο αποσπάται από τον υποδοχέα και δημιουργεί ένα δεύτερο σύμπλοκο, το οποίο έχει προ-αποπτωτικές ιδιότητες. Στο νέο αυτό σύμπλοκο, οι προκασπάσες-8 και -10 ενεργοποιούνται μέσω αυτοκαταλυτικής διάσπασης (Bertheloot et al., 2021).



Εικόνα 6: Σύγκλιση εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης

Το ενδοκυττάριο μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται από καταστάσεις ενδοκυττάριου στρες όπως η υποξία και η βλάβη του DNA. Ωστόσο όταν κατά την ενεργοποίηση του εξωκυττάριου μονοπατιού της απόπτωσης δεν ενεργοποιούνται πολλά μόρια της εναρκτήριας κασπάσης-8 το κύτταρο αναγκάζεται να αποκλίνει από την εξωκυττάρια οδό και να ενεργοποιήσει την ενδοκυττάρια. Συγκεκριμένα η κασπάση-8 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bid μέλος της προ-αποπτωτικής οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, και την μετατρέπει σε tBid. Η tBid μαζί με άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, την δημιουργία του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπάσεων -3, -6, -7 οι οποίες θα οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση.

Πηγή: Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Chapter Four – Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In R. Donev (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 125, pp. 73–120). Elsevier.

1.4.4.2 ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Η διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να προκληθεί από σήματα που προέρχονται από το ίδιο το κύτταρο, τα οποία υποδηλώνουν την ύπαρξη βλάβης, ενεργοποιώντας το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται από ποικίλα ερεθίσματα που δεν σχετίζονται με μεμβρανικούς υποδοχείς, τα οποία παράγουν ενδοκυττάρια σήματα που δρουν άμεσα στους στόχους τους μέσα στο κύτταρο, ξεκινώντας από τα μιτοχόνδρια. Αυτά τα σήματα δρουν θετικά ή αρνητικά, με τα θετικά να περιλαμβάνουν, ακτινοβολία, τοξίνες, υποξία, υπερθερμία, ιογενείς λοιμώξεις, ελεύθερες ρίζες και τα αρνητικά να αφορούν την έλλειψη ορισμένων αυξητικών παραγόντων ορμονών και κυτοκινών, που οδηγούν σε απώλεια της αποπτωτικής καταστολής και επακόλουθη ενεργοποίηση της απόπτωσης (Elmore, 2007). Τα παραπάνω ερεθίσματα επιφέρουν μεταβολές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι οποίες οδηγούν στο

άνοιγμα πόρων (Mitochondrial Permeability Transition, MPT), στην απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και τελικά στην αυξημένη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). (Saelens et al., 2004). Η δημιουργία των MOMP οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας την δημιουργία του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Σε αυτό το σημείο δεν υπάρχει επιστροφή καθώς αυτές οι δύο διαδικασίες δεσμεύουν το κύτταρο στην αποπτωτική του πορεία.

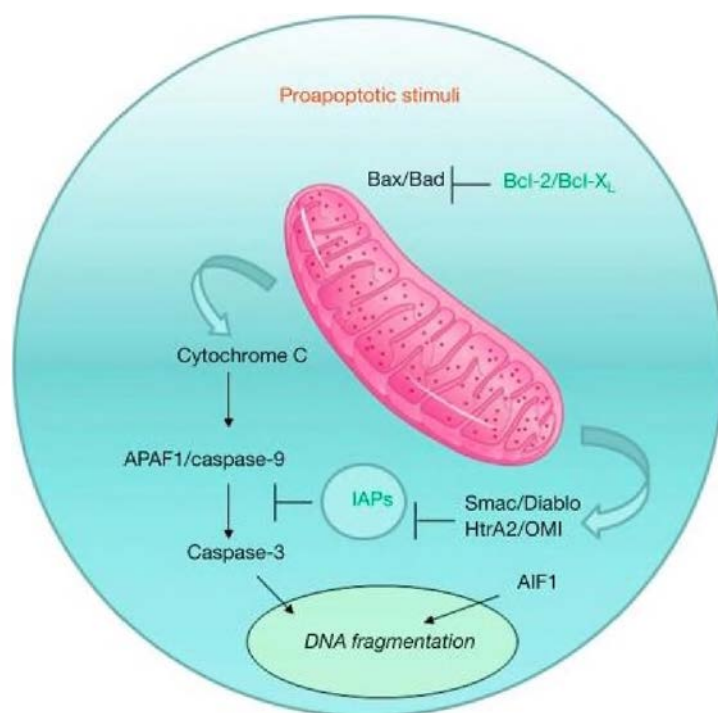
Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 (λευχαιμία Β-κυττάρων/λέμφωμα-2) παίζουν κύριο ρόλο στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, ενεργοποιώντας το ή καταστέλλοντάς το. Συνολικά έχουν ανακαλυφθεί 25 γονίδια που αποτελούν πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας και ανάλογα με την δράση τους χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: αντι- αποπτωτικές όπως Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-W, Mcl-1, και BFL-1/A1 και προ-αποπτωτικές όπως Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik και Blk (Dharambir Kashyap, 2021). Η ισορροπία μεταξύ των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών θα οδηγήσει ή όχι το κύτταρο σε απόπτωση και μεταβάλλεται ανάλογα με το ερέθισμα που δέχεται το κύτταρο, την θέση των πρωτεϊνών της οικογένειας BCL-2 καθώς και από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. (Bartheloot, 2021)

Η κύρια αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 αντιτίθεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, εμποδίζοντας το ενδογενές μονοπάτι. Στα κύτταρα υπάρχουν 2 ισομορφές του Bcl-2 με όμοιες BH περιοχές, τα Bcl-2a και Bcl-2β, με το πρώτο να παρουσιάζει ξεκάθαρες αντι-αποπτωτικές δράσεις, ενώ η δράση της τελευταίας ισομορφής δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας μοιράζονται μια κοινή δομή αποτελούμενη από 9 α-έλικες και μια C-τελικό ελικοειδές άγκιστρο μεμβράνης (Edlich, 2018). Παράλληλα μοιράζονται 4 ομόλογα, καλά διατηρημένα μοτίβα γνωστά ως BCL-2 ομόλογα μοτίβα (BH1-BH4), τα οποία διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών μεταξύ τους και μπορούν να υποδηλώνουν προ-αποπτωτική ή αντι-αποπτωτική λειτουργία (Edlich, 2018). Η δράση τους εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και καταστέλλουν την απόπτωση εμποδίζοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τους MOMP (Dharambir Kashyap, 2021).

Οι κύριες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη X που σχετίζεται με BCL-2 (Bcl-2-Associated Protein X, BAX) και ο δολοφόνος ανταγωνιστών 1 (Bcl-2 Antagonist Killer 1, BAK) διαθέτουν πολλές BH δομές και είναι δομικά όμοιες με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Κατά την απόπτωση, αυτές οι πρωτεΐνες υφίστανται ολιγομερισμό στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγώντας στην δημιουργία των MOMP, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και την ενεργοποίηση των εναρκτήριων (κασπάση-8,-9,-10) και εκτελεστικών (κασπάση-3,-6,-7) κασπασών (Elmore, 2007). Η ενεργοποίηση των BAX και BAK είναι η μοριακή απόφαση του κυττάρου να οδηγηθεί σε απόπτωση. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν και να τροποποιήσουν την δράση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω την δομής BH3, που παίζει σημαντικό ρόλο στην μιτοχονδριακή αποπτωτική οδό (Edlich, 2018). Παράλληλα μια άλλη προ-αποπτωτική πρωτεΐνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί στην σερίνη και να παγιδευτεί από την πρωτεΐνη 14-3-3, ένα μέλος μιας οικογένειας πολυλειτουργικών μορίων πρόσδεσης

φωσφοσερίνης. Με τη φωσφορυλίωσή της, η Bad απομονώνεται στο κυτοσόλιο, αλλά μόλις αποφωσφορυλιωθεί, θα μετατοπιστεί στα μιτοχόνδρια για να απελευθερώσει το κυτόχρωμα C (Zha, et al., 1996)

Το άνοιγμα των πόρων και η αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγεί στην απελευθέρωση δύο ομάδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τον διαμεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από το κυτόχρωμα c, το Smac/DIABLO και την πρωτεάση σερίνης HtrA2/Omi (Cai et al., 1998; Du et al., 2000; Loo et al., 2002; Garrido et al., 2005). Αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούν το μιτοχονδριακό μονοπάτι που εξαρτάται από κασπάσες. Αρχικά το cytC προσδένεται και ενεργοποιεί τον αποπτωτικό παράγοντα ενεργοποίησης πρωτεάσης, Araf-1, επιτρέποντας τον να δημιουργήσει μια μεγάλη ολιγομερή δομή, το αποπτόσωμα. Ο ολιγομερισμός του Araf-1 δημιουργεί μια δομή δακτυλίου και οδηγεί στην στρατολόγηση μορίων προκάσπασης-9, τα οποία αυτοκαταλύονται και μετατρέπονται σε ενεργά μόρια κασπάσης-9, συμπληρώνοντας το αποπτόσωμα (Mustafa, 2024). Η κασπάση-9 διασπά το ISL των προκάσπασης-3 και -7, ενεργοποιώντας έτσι την ώριμη μορφή τους και απελευθερώνοντας την αποπτωτική τους λειτουργία. Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 μεσολαβεί στη διάσπαση της αντίστοιχης ISL της προκάσπασης-6 για την ενεργοποίηση της κασπάσης-6, με τις εκτελεστικές κασπάσες εν τέλει να πρωτεολύουν τα αντίστοιχα και κοινά υποστρώματά τους προκαλώντας απόπτωση (Soni et al, 2021). Παράλληλα Τα Smac/DIABLO και το HtrA2/Omi προάγουν την απόπτωση αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών αναστολέων της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptosis, IAPs) (Elmore, 2007).



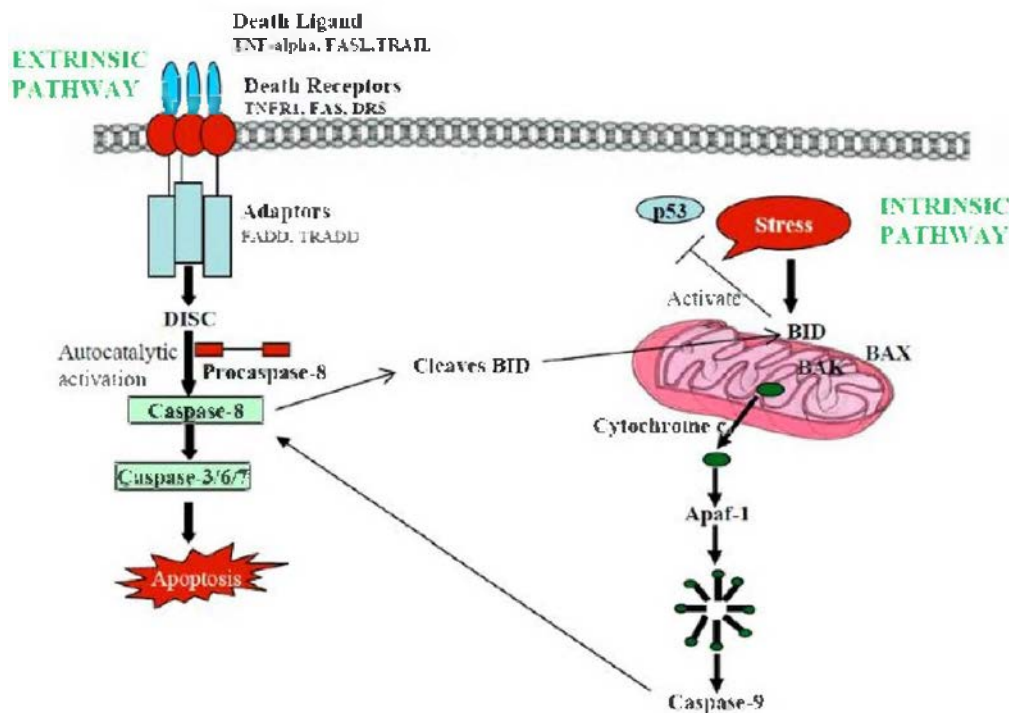
Εικόνα 7: Ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης

Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται από προ-αποπτωτικά ερεθίσματα, όταν το κύτταρο υφίστανται καταστάσεις στρες τις οποίες δεν μπορεί να καταπολεμήσει. Έτσι ενεργοποιούνται οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες *Bax/Bad* οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες αναστέλλονται από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες *Bcl-2/Bcl-XL*. Οι *Bax/Bad* δημιουργούν πόρους στην μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγώντας στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος *C* από το μιτοχόνδριο. Το *cytc* επάγει την δημιουργία του αποπτοσώματος από την πρωτεάση *APAF1* και την κασπάση -9 που τελικά ενεργοποιεί την εναρκτήρια κασπάση-3. Τα σύμπλοκα *Smac/DIABLO* και *HtrA2/Omi* προάγουν την απόπτωση καταστέλλοντας τους *IAPs*. Η κασπάση-3 μαζί με την πρωτεΐνη *AIF* συμβάλλουν στον κατακερματισμό του *DNA*.

Πηγή: Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2014). Cell death and repair in lung disease. In *Pathobiology of human disease: A dynamic encyclopedia of disease mechanisms* (pp. 2558–2574). Elsevier.

Η δεύτερη ομάδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών η *AIF*, η ενδονουκλεάση *G* και η *CAD* απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια σε τελευταία στάδια, όταν έχει ήδη αποφασιστεί ότι θα πραγματοποιηθεί η απόπτωση. Η *AIF* μετατοπίζεται στον πυρήνα και κατακερματίζει το *DNA* σε κομμάτια των 50-300 bp, ενώ η ενδονουκλεάση *G* συμπυκνώνει και διασπά την χρωματίνη, επίσης μετατοπισμένη στον πυρήνα (Joza et al., 2001), (Li et al., 2001). Το *CAD* στην συνέχεια απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και οδηγείται στον πυρήνα, όπου συμβάλει στις δράσεις των *AID* και ενδονουκλεάση *G* (Enari et al., 1998).

Στο τελικό στάδιο της απόπτωσης, ενεργοποιούνται οι κασπάσες-3 και -7, οι οποίες με τη σειρά τους διασπούν άλλες προκασπάσες (όπως τις προκασπάσες-2, -6, -8 και -10), μετατρέποντάς τις στις ενεργές τους μορφές και προκαλώντας έναν ενισχυτικό καταρράκτη απόπτωσης. Η κασπάση-8, που ανήκει στο εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, μπορεί επίσης να διασπάσει την πρωτεΐνη *Bid*, γεφυρώνοντας έτσι το εξωγενές με το ενδογενές μονοπάτι και υποδεικνύοντας τη στενή αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η απόπτωση ολοκληρώνεται με τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης μέσω της κασπάσης-6 και την αποδόμηση διαφόρων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, όπως η *PARP* και οι λαμίνες (Elmore, 2007),(Bertheloot et al, 2021)



Εικόνα 8: Το εξωγενές και ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης

Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται από εξωτερικούς προσδέτες όπως οι TNF- α , FASL και TRAIL οι οποίοι συνδέονται σε υποδοχείς-θανάτου όπως οι αντίστοιχοι TNFR1, FAS και DR5. Η πρόσδεση αυτή επάγει την δημιουργία του συμπλόκου DISC μέσω των πρωτεϊνών προσαρμογών FADD και TRADD, και επάγει την αυτό-κατάλυση και μετατροπή της προκασπάσης-8 σε ενεργή κασπάση-8. Η κασπάση-8 ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες -3, -6, -7 που οδηγούν σε απόπτωση του κυττάρου. Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται από ενδοκυττάρια σήματα όπως το στρες. Ενεργοποιούνται οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bak και Bax οι οποίες ελευθερώνουν το κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί την πρωτεάση Apaf-1 η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση-9, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Στην συνέχεια ενεργοποιούνται οι εκτελεστικές κασπάσες -3, -6, -7 που οδηγούν σε απόπτωση του κυττάρου. Η σύγκλιση του εξωγενούς με το ενδογενές μονοπάτι πραγματοποιείται από την διάσπαση του bid που ενισχύει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια.

Πηγή: Rampal, G., Khanna, N., Thind, T. S., Arora, S., & Viga, A. P. (2012). Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. *Medicinal Chemistry & Drug Discovery*, 3(2), 79–93.

1.5. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

Ένας από τους μηχανισμούς που επηρεάζεται στα κύτταρα που υφίστανται γήρανση είναι η απόπτωση. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες, ωστόσο δεν υπάρχουν σαφή αποτελέσματα που να ορίζουν την αποπτωτική μοίρα του γερασμένου κυττάρου. Γενικά θεωρείται ότι σε αυτά τα κύτταρα εμφανίζεται μια αντίσταση σε ενδογενή και εξωγενή αποπτωτικά ερεθίσματα (Sasaki, M. et al., 2001) Συγκεκριμένα η ερευνητική ομάδα των Reut Yosef, et al., (2016) μελέτησε τις συγκεντρώσεις των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-2). Αφού επάχθηκε γήρανση στα κύτταρα στην συνέχεια κατεργάστηκαν με ερεθίσματα που ενεργοποιούν το εξωγενές και ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης.

Παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, υποδηλώνοντας ότι τα γερασμένα κύτταρα αντιστέκονται στην απόπτωση περισσότερο από τα κύτταρα control. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την χρήση αναστολέων όπως του ABT-737, που στοχεύουν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και σταματούν την δράση τους. Παρατηρήθηκε ότι με την αναστολή των πρωτεϊνών Bcl-XL, Bcl-W το κύτταρο οδηγήθηκε σε απόπτωση. Η χρήση αυτών των αναστολέων αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην ιατρική καθώς δίνει την δυνατότητα να απομακρυνθούν γερασμένα κύτταρα από ιστούς που μπορεί να προκαλέσουν πολλές ασθένειες που σχετίζονται με την γήρανση.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συσκευές και εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Εργαστηριακά όργανα	Εταιρεία
Multimode Plate Reader	Enspire multimode plate reader
Αναδευτήρας (Vortex)	Bio Vortex V1
Αυτόματος πιπεταδόρος	HTC Lab solution
Ανάστροφο Μικροσκόπιο	A. Kruss Optronic Germany
Επιτραπέζια μικρή φυγόκεντρος (Quick spin)	Nippon Genetics Europe GmbH
Επωαστήρας κυτταροκαλλιιεργειών	Thermo Electron Corporation
Ζυγός	Kern EW
Ζυγός	Kern 440-47N
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής/Απαγωγός	Tel Star AV-30/70
Θερμαινόμενη πλάκα (Heat Block)	Kisker
Μαγνητικός Αναδευτήρας (Stirrer)	Nuova thermolyne
Οριζόντιος Αναδευτήρας	Heidolph Rotamax
Πεχάμετρο	Metrohm 827 pH lab
Πλάκα Neubauer	HBG Germany
Πλαστική ράβδος (scraper)	Thermo Fisher Scientific
Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών	W.B Kodak, Fuji
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς	Biorad mini-trans Blot
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN tetra cell
Συσκευή υπερήχων (Sonicator)	Heischer Ultrasound Technology, model UP400S

Τροφοδοτικό	Wealtec Elite 200
Υδατόλουτρο κυτταροκαλλιιεργειών	P. Selecta
Φασματοφωτόμετρο	Spectronic 20 GENESYSTEM
Φυγόκεντρος κυτταροκαλλιιεργειών	Jouan BR4
Ψυχόμενη φυγόκεντρος	Eppendorf 5810R

2.2 ΥΛΙΚΑ

2.2.1 ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
Acrylamide/Bis 40% (Acr)	Bio-Rad
Ammonium persulfate (APS)	Serva
Bradford (5X)	Bio-Rad
Bradford Protein Assay	Biorad
Brophenolol blue	Fluka
Developer	Fuji
D- galactose	Sigma
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Enhanced ChemiLuminescence (ECL)	Santa Cruz
Ethanol 100%	Sigma
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Scharlau
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Fixer	Fuji
Glycerol	KaloChem
Glycine	Serva
Hydrochloric acid (HCl)	Scharlau
Isopropanol	Sigma
L-Glutamine 200mM (L-Gln) (100X)	Gibco
Methanol 100%	Sigma
Penicillin/Streptomycin (P/S) (5000U/mL)	Gibco

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Serva
Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X)	Gibco
Protease inhibitors (Αναστολείς πρωτεασών)	Roche
Protein ladder	Proteintech
Skimmed milk powder	Regilait
Sodium chloride (NaCl)	Scharlau
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Serva
Triton X-100	AppliChem
Trypsin-EDTA 5% (10X)	Gibco
Tween 20	Sigma
β-mercaptoethanol	Riedel de Haen

2.2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ

Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αναλώσιμα υλικά	Εταιρεία
Γυάλινες πιπέτες (Pasteur)	Kimble
Βαθμονομημένα Σωληνάρια (Falcon) (15mL, 50mL)	Sarstedt
Διηθητικά χαρτιά (Whatman)	Amersham
Σωληνάρια για μεταφορά των κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (-80oC) (cryovials) (1,5mL και 2mL)	Sarstedt
Φιλμ ανίχνευσης σήματος	FUJI MEDICAL
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45μM, 0,22μM)	Amersham Potran
Πλαστικά Σιφώνια (2mL, 5mL, 10mL, 25mL)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια (eppendorf) (1.5 mL, 2.0 mL)	Sarstedt
Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (6, 24, 96 θέσεων)	Sarstedt
Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων (T25, T75)	Sarstedt
Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (60x15mm)	
Ρύγχοι πιπετών (tips) (0.2-10 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL)	Sarstedt

2.2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Διαλύματα	
Lysis buffer Περιέχονται 20 mM Tris pH 7.5, 0.5% (v/v) Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Πριν τη χρήση του προστίθενται 1mM DTT, 0.1 mM PMSF και εμπορικά διαθέσιμο μίγμα Protease Inhibitors στην απαιτούμενη συγκέντρωση, σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Αποθήκευση στους 4°C.	Διάλυμα Bradford 1X Αραίωση του διαλύματος Bradford 5X σε dH ₂ O και δημιουργία νέου διαλύματος Bradford 1X
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hydrochloride (Tris-HCl) pH 6,8 1,5M Διάλυτοποίηση Tris base σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH (6,8) με την προσθήκη πυκνού HCl 12N. Αποθήκευση στους 4°C.	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Hydrochloride (Tris-HCl) pH 8,8 1,5M Διάλυτοποίηση Tris base σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH (8,8) με την προσθήκη πυκνού HCl 12N. Αποθήκευση στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 1X Περιέχει 20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0,05% (v/v) SDS σε dH ₂ O. Αποθήκευση στους 4°C.	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-buffered saline (TBS) 10X Διάλυτοποίηση Tris base σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH (7,4-7,6) με την προσθήκη πυκνού HCl 12M. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 10X Περιέχει 14,4% (w/v) Glycine και 3% (w/v) Tris base σε dH ₂ O. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) 1X Περιέχει 10 % (v/v) TBS 10X και 0.06% (v/v) Tween 20 σε dH ₂ O. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 1X Περιέχει 10% (v/v) Running Buffer 10X και 0,1% (v/v) SDS σε dH ₂ O. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου	Sample Buffer 4X Περιέχονται 1 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) SDS, 1% (v/v) Bromophenol blue σε dH ₂ O. Ανάδευση και θέρμανση, για πλήρη διαλυτοποίηση του τελικού διαλύματος. Διανομή σε aliquots των 960μL στα οποία προστίθεται 5% (v/v) β-mercaptoethanol. Αποθήκευση στους -20°C.
Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) Για την παρασκευή 1000mL διαλύματος προστίθενται 725mL dH ₂ O, 250mL Διαλύματος A και 25mL Διαλύματος B. Αποθήκευση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου	Διάλυμα σταθεροποίησης σήματος (Fixer solution) Για την παρασκευή 1000mL διαλύματος προστίθενται 750mL dH ₂ O, 225mL Διαλύματος A και 25mL Διαλύματος B. Αποθήκευση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.4 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανασοαποτύπωση κατά Western παρουσιάζονται στους Πίνακες 5 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αντίσωμα έναντι	Συγκέντρωση (v/v)	Μοριακό βάρος (kDa)	Εταιρεία
Procaspase-3	1:1000	35	ELK
Bcl-2	1:1000	28	Cell Signaling
β-actin	1:2000	42	Protein Tech

Πίνακας 6: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Αντίσωμα έναντι	Συγκέντρωση (v/v)	Εταιρεία
Mouse IgG-HRP	1:50000	Pierce
Rabbit IgG-HRP	1:50000	Pierce

2.2.6 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Θρεπτικό μέσο	Σύσταση
Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose with phenol red (DMEM) 1X	Περιέχονται 1gr/L D-Glucose, L-glutamate και phenol red. Για την παραγωγή πλήρους θρεπτικού υλικού προστίθενται 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln και 1% v/v P/S. Αποθηκεύεται στους 4°C.

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.3.1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.3.1.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές C2C12 που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των στόχων της παρούσας πτυχιακής εργασίας βρίσκονταν αποθηκευμένες σε cryovial των 1ml

στους -80°C . Στο cryovial εμπεριέχεται και ο οργανικός διαλύτης DMSO, ο οποίος περιορίζει την ανάπτυξη κρυστάλλων κατά την διαδικασία της ψύξης των κυττάρων, αποτρέποντας τον κυτταρικό θάνατο. Αφού αφαιρέθηκε το cryovial από το ψυγείο, τοποθετήθηκε το 1 ml κυττάρων σε falcon και συμπληρώθηκε με 9 ml θρεπτικού υλικού DMEM 1x high glucose, το οποίο εμπεριέχει 4,5 gr/L D- glucose, στο οποίο έγινε επιπλέον προσθήκη των 1% v/v L-Glut, 10% v/v FBS και 1% v/v P/S. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 λεπτά και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5 ml θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε φλάσκα 25cm² σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

2.3.1.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης χρησιμοποιείται το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, το οποίο δρα ως πρωτεάση σερίνης και διασπά καρβοξυλικές ομάδες που βρίσκονται στα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη. Σε καλλιέργειες κυττάρων η δράση της είναι αναγκαία για τον διαχωρισμό των κυτταρικών συσσωματωμάτων, καθώς και για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια ανάπτυξης του τρυβλίου-φλάσκας, πρωτεολύοντας πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων που αναπτύσσουν δεσμούς με τον εξωκυττάριο χώρο. Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της φλάσκας καλλιέργειας των κυττάρων. Στην συνέχεια προστίθεται θρυψίνη και η φλάσκα μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο για 1 λεπτό σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της θρυψινοποίησης, η φλάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο, και επιβεβαιώνεται ότι τα κύτταρα πλέον έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας και έχουν χάσει την μορφολογία τους. Για να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης προστίθεται στην φλάσκα θρεπτικό υλικό σε ποσότητα 4X του όγκου της θρυψίνης. Στην συνέχεια το υλικό της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 1000rpm για 5 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν τα ζωντανά κύτταρα από το μέσο ανάπτυξης, με παράλληλη απομάκρυνση των νεκρών. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με θρεπτικό υλικό σε φλάσκα ανάπτυξης.

2.3.1.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά το πέρας της θρυψινοποίησης ακολουθεί η μέτρηση και η επιστρωση των κυττάρων σε πιάτα καλλιέργειας (well-plates). Μεταφέρονται 10μl από το διάλυμα των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου. Αφού μετρηθούν τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν σε κάθε τεταρτημόριο υπολογίζεται προσεγγιστικά ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν σε κάθε ml διαλύματος, και μεταφέρεται ο επιθυμητός όγκος κυττάρων σε νέο falcon. Η ποσότητα αυτή συμπληρώνεται με θρεπτικό μέσο DMEM, στο οποίο περιέχονται 1gr/L D-Glucose, 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln, 1% v/v P/S και phenol red. Στην συνέχεια μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος στα wells των well-plate και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Τέλος τα κύτταρα μεταφέρονται προς ανάπτυξη στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

2.3.1.4 ΑΠΟ D-GALACTOSE ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΗΡΑΝΣΗΣ C2C12 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

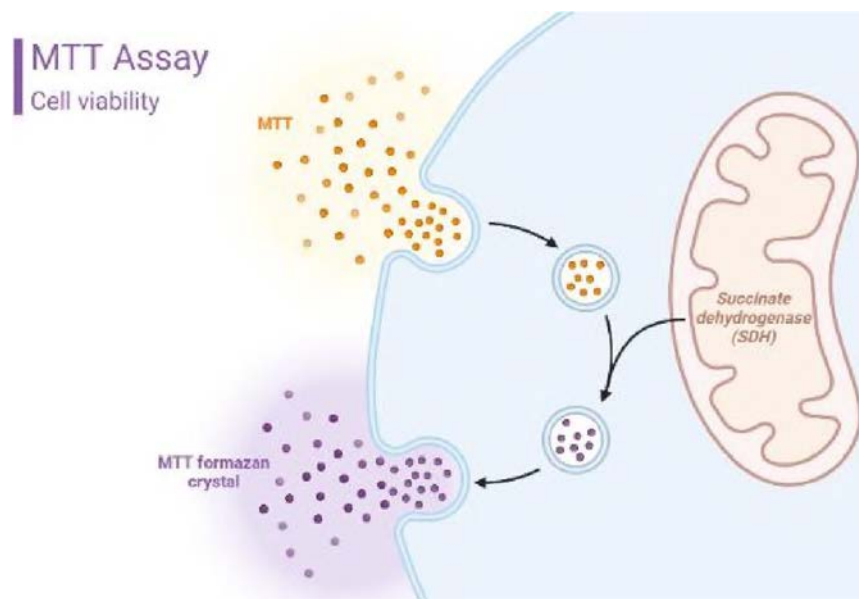
Για τη διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των αποπτωτικών μορίων Procaspase-3 και Bcl-2 αρχικά πραγματοποιήθηκε επίστρωση των κυττάρων C2C12 (35.000 κύτταρα/well) σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6 well-plates), με θρεπτικό υλικό DMEM στο οποίο περιέχονται 1gr/L D-Glucose, 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln, 1% v/v P/S και phenol red. Αφού τα κύτταρα επωαστούν για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37°C και 5% CO₂), ακολουθεί η προσθήκη της D-galactose, διαλυτοποιημένης σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου. Συγκεκριμένα, με διαδοχικές αραιώσεις της αρχικής συγκέντρωσης των 200mg/ml D-galactose, δημιουργήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 30mg/ml και 40mg/ml, διαλυτοποιημένες σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης οι οποίες επιτυγχάνουν τις βέλτιστες συνθήκες επαγωγής γήρανσης στα κύτταρα. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προσθήκη της συγκέντρωσης D-galactose 30mg/ml σε 2 well (2 επαναλήψεις της συνθήκης) και της συγκέντρωσης D-galactose 40mg/ml σε άλλα 2 well. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι 2 well λειτουργούν ως συνθήκες control στις οποίες δεν προστίθεται D-galactose, και τα κύτταρα αναπτύσσονται μόνο με την παρουσία θρεπτικού μέσου. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη της ουσίας το 6 well-plate οδηγείται στον επωαστικό κλίβανο (37°C και 5% CO₂), όπου θα παραμείνουν για 24 ώρες.

Επαναλήφθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία για τη διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των αποπτωτικών μορίων Procaspase-3 και Bcl-2, κατά την οποία ωστόσο τα κύτταρα θα επωαστούν με την D-galactose για 48 ώρες. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επίστρωση των κυττάρων C2C12 (35.000 κύτταρα/well) σε πιάτα καλλιέργειας 6 θέσεων (6 well-plates), με θρεπτικό υλικό DMEM στο οποίο περιέχονται 1gr/L D-Glucose, 10% v/v FBS, 1% v/v L-Gln, 1% v/v P/S και phenol red. Αφού τα κύτταρα επωαστούν για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37°C και 5% CO₂), ακολουθεί η προσθήκη της D-galactose, διαλυτοποιημένης σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου. Συγκεκριμένα, με διαδοχικές αραιώσεις της αρχικής συγκέντρωσης των 200mg/ml D-galactose, δημιουργήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 30mg/ml και 40mg/ml σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προσθήκη της συγκέντρωσης D-galactose 30mg/ml σε 2 well (2 επαναλήψεις της συνθήκης) και της συγκέντρωσης D-galactose 40mg/ml σε άλλα 2 well. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι 2 well λειτουργούν ως συνθήκες control στις οποίες δεν προστίθεται D-galactose, και τα κύτταρα αναπτύσσονται μόνο με την παρουσία θρεπτικού μέσου. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη της ουσίας το 6 well-plate οδηγείται στον επωαστικό κλίβανο (37°C και 5% CO₂), όπου θα παραμείνουν για 48 ώρες.

2.3.1.5 ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ MTT

Η χρωματομετρική μέθοδος MTT βασίζεται στην αναγωγή του κίτρινου άλατος τετραζολίου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) με αποτέλεσμα την παραγωγή μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης από μιτοχονδριακές NAD(P)H εξαρτώμενες αφυδρογονάσεις. Η μετατροπή αυτή υποδηλώνει μιτοχονδριακή δραστηριότητα και συνεπώς την ύπαρξη ζωντανών κυττάρων σε

καλλιέργεια. Χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας και αποτελεί δείκτη της βιωσιμότητας, της κυτταρικής ανάπτυξης, καθώς και των κυτταροτοξικών επιδράσεων ουσιών και φαρμάκων (Meerlo, Kaspers, & Cloos, 2011).



Εικόνα 9: Η χρωματομετρική μέθοδος MTT

Το κίτρινο άλας τετραζολίου MTT ανάγεται από μιτοχονδριακές NAD(P)H εξαρτώμενες αφυδρογονάσες δημιουργώντας μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης. Η αναγωγή αυτή μας επιτρέπει να εντοπίσουμε την κυτταρική βιωσιμότητα

Πηγή: Ona, S. (n.d.). *MTT Assay Principle*. BioRender.

<https://app.biorender.com/templates/figure-6494f616bd359d0019f73cbd-mtt-assay-principle>

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μεθόδου πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων C2C12 σε 96 well-plates (3.000 κύτταρα/well) παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM high glucose with phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v P/S και 1% v/v L-Gln. Αφού τα κύτταρα επωαστούν σε επωαστικό κλίβανο (37°C και 5% CO₂) για 48 ώρες, προστίθεται D-galactose σε τελικές συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml, και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών έγινε προσθήκη του αντιδραστηρίου MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml, και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ με αποτέλεσμα την παραγωγή μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης. Αφού περάσουν οι 3 ώρες έγινε προσθήκη οργανικού διαλύτη ισοπροπανόλης με στόχο την διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση του 96-well-plate, σε σκοτάδι υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Τέλος πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm και του background στα 690nm σε φασματοφωτόμετρο Multimode Plate Reader.

Η ίδια πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε, κατά την οποία ωστόσο τα κύτταρα επωάζονται με την D-galactose για 48 ώρες. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων C2C12 σε 96 well-plates (3000 κύτταρα/well) παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM high glucose with phenol red εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v P/S και 1% v/v L-Gln. Αφού τα κύτταρα επωαστούν σε επωαστικό κλίβανο (37°C και 5% CO₂) για 48 ώρες, προστίθεται D-galactose σε τελικές συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml, και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών έγινε προσθήκη του αντιδραστήριου MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml, και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ με αποτέλεσμα την παραγωγή μωβ κρυστάλλων φορμαζίνης. Αφού περάσουν οι 3 ώρες έγινε προσθήκη οργανικού διαλύτη ισοπροπανόλης με στόχο τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζίνης. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση του 96-well-plate, σε σκοτάδι υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Τέλος πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm και του background στα 690nm σε φασματοφωτόμετρο Multimode Plate Reader.

2.3.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

2.3.2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (HARVEST)

Αφού ολοκληρωθεί η περίοδος επώασης των κυττάρων με D-galactose, ακολουθεί η συλλογή τους με την τεχνική του Harvest. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό DMEM low glucose with phenol red και τα κύτταρα υφίστανται διαδοχικές πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X σε θερμοκρασία 4°C. Η αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω μιας αποστειρωμένης πλαστικής ράβδου (scraper). Τα κύτταρα συλλέγονται και υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα αποθηκεύεται στους -80°C ή χρησιμοποιείται αμέσως για την ολοκλήρωση της πειραματικής μεθοδολογίας.

2.3.2.2 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ιζήματα κυττάρων που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία -80°C μεταφέρονται σε πάγο για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε δείγμα διάλυμα λύσης (Lysis Buffer), το οποίο έχει εμπλουτιστεί με 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF και με διάλυμα Protease Inhibitors στην κατάλληλη συγκέντρωση. Τα δείγματα υφίστανται ήπια ανάδευση και επωάζονται για 30 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η κυτταρική λύση η οποία επιτυγχάνεται μέσω υπερήχων (sonication), όπου τα δείγματα υποβάλλονται σε 5 διαδοχικούς κύκλους παλμών διάρκειας 1 δευτερολέπτου, με ενδιάμεσα διαστήματα 35 δευτερολέπτων.

2.3.3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος Bradford εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Αρχικά, το stock του αντιδραστήριου Bradford (5X) αραιώνεται με στόχο την παραγωγή διαλύματος με τελική συγκέντρωση 1X. Προστίθεται 1ml από το αντιδραστήριο Bradford 1X σε 1ml από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα. Τα μείγματα υπόκεινται σε ήπια ανάδευση και επωάζονται προστατευμένα από το φως για χρονικό διάστημα 20 έως 40 λεπτών, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, η απορρόφηση κάθε δείγματος καταγράφεται στα 595 nm με την χρήση φασματοφωτομέτρου ή Plate Reader. Η μέτρηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης που βρίσκεται στο δείγμα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε από την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA και ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων με τη βοήθεια του Microsoft Office Excel.

2.3.3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η αποδιαταγμένη πρωτεΐνη σχηματίζει σύμπλοκο με το απορρυπαντικό SDS με καθαρό αρνητικό φορτίο σχεδόν ανάλογο με την μάζα της πρωτεΐνης. Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, με αποτέλεσμα οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες να μετακινούνται μέσω της πηκτής από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+), επιτρέποντας τον διαχωρισμό τους. Αρχικά, τα πρωτεϊνικά δείγματα φορτώνονται στο stacking gel, ένα πήκτωμα χαμηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδιου, το οποίο ευνοεί την συγκέντρωση και ευθυγράμμιση του συνόλου των πρωτεϊνών προς διαχωρισμό. Κατόπιν, υπό τη συνεχή επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες μετακινούνται στο separating gel, υψηλότερης συγκέντρωσης, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους βάσει του μοριακού βάρους τους.

Πίνακας 8: Η σύσταση των πηκτωμάτων επιστοίβαξης (stacking gel) και διαχωρισμού (separating gel)

Stacking gel	Separating gel
ddH ₂ O	ddH ₂ O
0,125 M Tris-HCl pH 6,8	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
SDS 0,1% (w/v)	SDS 0,1% (w/v)
Acr 4% (w/v)	Acr 10% ή 12% (w/v)
APS 1% (w/v)	APS 1% (w/v)
TEMED 0,04% (v/v)	TEMED 0,04% (v/v)

Τα πρωτεϊνικά δείγματα προτού υποβληθούν σε ηλεκτροφόρηση, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, με σκοπό την κατάργηση της τριτοταγούς δομής των

πρωτεϊνών και των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 90 Volt παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος Running Buffer 1X.

2.3.3.5 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (WESTERN BLOT)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting) αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την ποιοτική και ημιποσοτική ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-στόχων σε βιολογικά δείγματα. Τα βήματα που απαιτούνται για την ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western είναι τα ακόλουθα:

- **ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ**

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, ακολουθεί εξισορρόπηση του πηκτώματος για 10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (*Transfer Buffer*). Στη συνέχεια, κατασκευάζεται το σύστημα ηλεκτρομεταφοράς τύπου "σάντουιτς" στη μαύρη πλευρά της κασετίνας μεταφοράς όπου τοποθετείται το gel και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανάμεσα σε 2 σφουγγαράκια και διηθητικά χαρτιά τύπου Whatman. Στην συνέχεια, ξεκινά η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 0,35A για 70min στους 4°C. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πάνω στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες, μεταφέρεται σε διάλυμα TBST 1X.

- **ΜΠΛΟΚΑΡΙΣΜΑ ΜΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ**

Για την αποφυγή μη ειδικής πρόσδεσης των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πραγματοποιείται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος που περιέχει 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (*non-fat dry milk*, NFDm) διαλυμένο σε διάλυμα TBST 1X. Η μεμβράνη επώαζεται υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ**

Μετά το στάδιο του μπλοκαρίσματος, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο έχει προηγουμένως αραιωθεί στην επιθυμητή συγκέντρωση σε διάλυμα που περιέχει 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (NFDm) σε TBST 1X. Η επώαση πραγματοποιείται υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία 4°C, για διάρκεια περίπου 16 ωρών (*overnight*), με σκοπό την ειδική σύνδεση του αντισώματος με την πρωτεΐνη-στόχο. Μετά το πέρας της κατά τη διάρκεια της νύχτας επώασης (14-16hr), η μεμβράνη υποβάλλεται σε πέντε διαδοχικές πλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, με ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X, προκειμένου να απομακρυνθεί η μη συνδεδεμένη περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο σε αναλογία 1:50.000 σε διάλυμα που περιέχει 2% (w/v) NFDm σε TBST 1X. Η επώαση διαρκεί 1 ώρα και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Με την ολοκλήρωση της επώασης, η μεμβράνη πλένεται τρεις

φορές (5 λεπτά έκαστη) με TBST 1X για την απομάκρυνση μη ειδικά προσδεδεμένου δευτερογενούς αντισώματος.

- **ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ**

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (horseradish peroxidase, HRP). Μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων, η μεμβράνη επάγεται με το αντιδραστήριο ECL (Equal volumes των ECLA και ECLB, 1:1) για 3 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον, υπό συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Το εν λόγω υπόστρωμα αντιδρά με την HRP και οδηγεί σε εκπομπή φωτός, η οποία καταγράφεται μέσω φωτοευαίσθητων X-ray φιλμ. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική κασετίνα έκθεσης, η οποία μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο. Στο εσωτερικό της κασετίνας τοποθετούνται τα φιλμ, τα οποία στη συνέχεια εμφανίζονται διαδοχικά: πρώτα σε διάλυμα ανάπτυξης (Developer), έπειτα εκπλένονται με νερό και, τέλος, εμβαπτίζονται σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer), με σκοπό τη σταθεροποίηση του σήματος.

- **ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμασιών απαιτούσαν υπολογιστική επεξεργασία. Με τη βοήθεια του Microsoft Office Excel πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου Bradford,, ο υπολογισμός των ποσοτήτων διαλύματος πρωτεΐνης και λοιπών συστατικών στο διάλυμα πρωτεϊνών προς ηλεκτροφόρηση, οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western και οι κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT. Μέσω του προγράμματος ImageJ πραγματοποιήθηκαν οι ποσοτικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western Blot. Τα αποτελέσματα του πειράματος MTT αναλύθηκαν με One-Way και Two-Way Analysis of Variance-Tukey B (ANOVA) αντίστοιχα μέσω του προγράμματος StatPlus. Τέλος για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

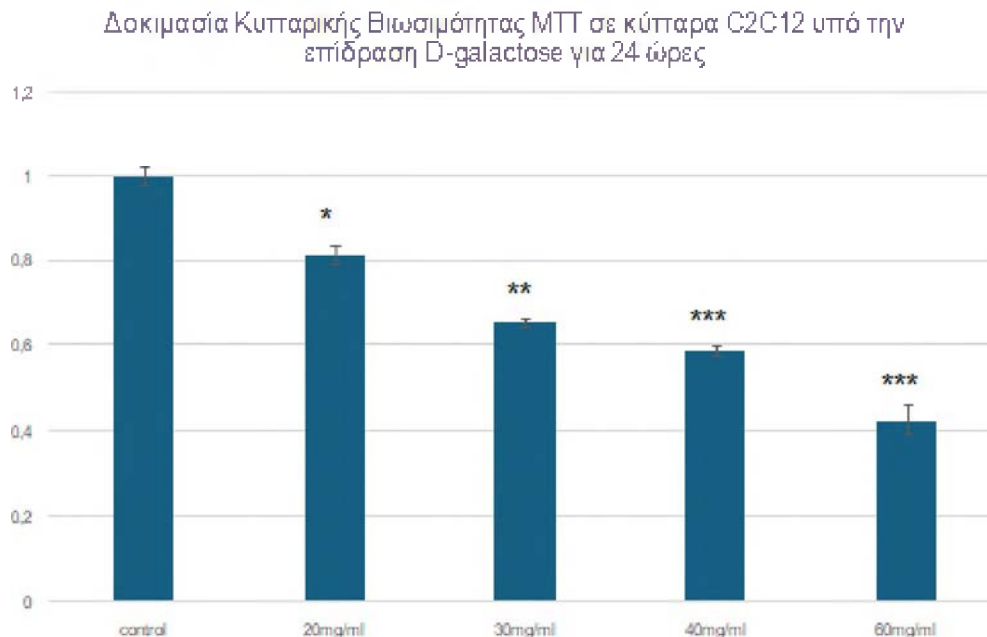
3.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ C2C12 ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ D-GALACTOSE

Πρωταρχικός στόχος της συγκεκριμένης έρευνας αποτελούσε η εκτίμηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων D-galactose που επάγουν επιτυχώς την κυτταρική γήρανση, μέσω της δοκιμασίας MTT. Συγκεκριμένα, κύτταρα C2C12 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε 96 well-plate (3.000 κύτταρα/well), παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη της D-galactose σε τελικές συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες. Μετά το πέρας του εικοσιτετράωρου προστέθηκε στα κύτταρα το

αντιδραστήριο MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες. Τέλος πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm και 690nm.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι τα κύτταρα επώάζονται με την D-galactose για 48 ώρες. Συγκεκριμένα, κύτταρα C2C12 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε 96 well-plate (3.000 κύτταρα/well), παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη της D-galactose σε τελικές συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml, και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκαν οι 48 ώρες, έγινε προσθήκη του αντιδραστηρίου MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες. Τέλος πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm και 690nm.

Όπως παρατηρούμε στο Διάγραμμα 1, η συγκέντρωση 20mg/ml D-galactose οδήγησε σε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας - κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 20% σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα, λόγω των επιδράσεων της κυτταρικής γήρανσης. Η συγκέντρωση 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose προκάλεσαν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 40%, ενώ η συγκέντρωση 60mg/ml προκάλεσε μείωση κατά 60% σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα μπορούμε να οδηγηθούμε σε ορισμένα συμπεράσματα. Η συγκέντρωση των 20mg/ml D-galactose προκαλεί μικρή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και συνεπώς στα κύτταρα δεν έχει επαχθεί αρκετή κυτταρική γήρανση ώστε να ενεργοποιηθούν και να μελετηθούν οι μηχανισμοί της. Οι συγκεντρώσεις των 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose οδηγούν σε μια ικανοποιητική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, όπου επάγεται η κυτταρική γήρανση επαρκώς ώστε ορισμένα κύτταρα να αντιστέκονται και να παραμένουν ζωντανά, παρότι μειώνεται σημαντικά ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους, ενώ κάποια πεθαίνουν. Τέλος η συγκέντρωση των 60mg/ml D-galactose οδηγεί σε αυξημένη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, συνεπώς επάγεται έντονη κυτταρική γήρανση και τα κύτταρα δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν λόγω των συσσωρευμένων βλαβών. Συμπερασματικά, είναι αντιληπτό ότι οι συγκεντρώσεις των 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose επάγουν την κατάλληλη συνθήκη κυτταρικής γήρανσης, κατά την οποία τα κύτταρα υφίστανται γήρανση, ωστόσο ένα μεγάλο ποσοστό τους παραμένει ζωντανό ώστε να μπορεί να μελετηθούν περαιτέρω οι μηχανισμοί που την διέπουν.



Διάγραμμα 1: Αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων D-galactose στην βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12. Πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με τις συγκεντρώσεις D-galactose, όπως υποδεικνύονται στο διάγραμμα και στην συνέχεια προστέθηκε το αντιδραστήριο MTT με συγκέντρωση 0,5mg/ml και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες. Στο τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης φασματοφωτομετρικά με την χρήση του φασματοφωτόμετρου στα 570nm και για το background στα 690nm. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ SD (n=5). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

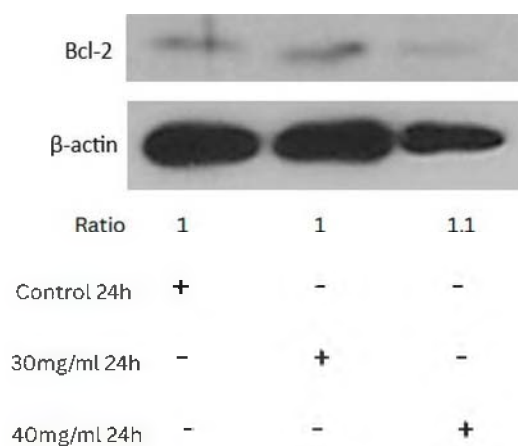
3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BCL-2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 24 ΩΡΕΣ

Επόμενος στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα C2C12 που επώαστηκαν με D-galactose για 24 ώρες. Η Bcl-2 αποτελεί την κύρια αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, η οποία καταστέλλει το ενδογενές σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης. Μελετώντας την επίδραση της κυτταρικής γήρανσης στα επίπεδα έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης αποκαλύπτεται αν τα κύτταρα μπορούν να αντισταθούν στον κυτταρικό θάνατο και να καταπολεμήσουν τις επιδράσεις της γήρανσης ή αν τελικά οδηγούνται σε απόπτωση.

Για την επίτευξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με σκοπό την ανίχνευση των μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με D-galactose για 24 ώρες. Αρχικά κύτταρα C2C12 (35.000 κύτταρα/well) επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας, σε θρεπτικό υλικό DMEM και επώαστηκαν για 48 ώρες. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη

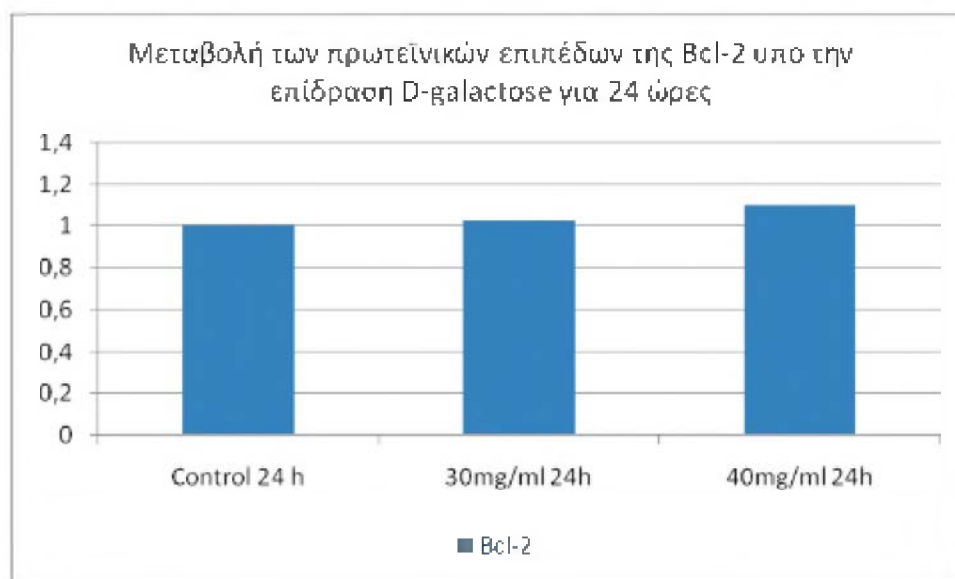
της D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης, στην διαδικασία της απόπτωσης σε διάστημα 24 ωρών.

Στην Εικόνα 10 και στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η επίδραση της εικοσιτετράωρης επώασης των κυττάρων με D-galactose στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Οι συγκεντρώσεις D-galactose που χρησιμοποιήθηκαν είναι 30mg/ml και 40mg/ml, καθώς επάγουν σημαντικό ποσοστό των κυττάρων σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης. Παρατηρούμε ότι με την προσθήκη 30 mg/ml D-galactose δεν εμφανίζεται καμία μεταβολή στα επίπεδα της Bcl-2 σε σχέση με την συνθήκη control στην οποία τα κύτταρα είναι υγιή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι 24 ώρες επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης ίσως να μην προκαλούν όλες τις μη αναστρέψιμες κυτταρικές βλάβες που θα οδηγήσουν τελικά το κύτταρο να ενεργοποιήσει ένα από τα δύο μονοπάτια της απόπτωσης, και αντίστασης σε αυτήν. Στην συνέχεια παρατηρούμε ότι σε συγκέντρωση D-galactose 40mg/ml η ποσότητα της πρωτεΐνης Bcl-2 αυξάνεται κατά 10% σε σχέση με την συνθήκη control. Συμπεραίνουμε ότι ίσως η μεγαλύτερη συγκέντρωση των 40mg/ml της D-galactose επάγει μια εντονότερη συνθήκη κυτταρικής γήρανσης σε σχέση με των 30mg/ml στην ίδια χρονική περίοδο, ενεργοποιώντας μηχανισμούς αντίστασης των κυττάρων, όπως αυτών της έκφρασης αντι-αποπτωτικών μορίων. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μπορεί να δημιουργεί γρηγορότερα βλάβες στις κυτταρικές λειτουργίες με αποτέλεσμα το κύτταρο να ετοιμάζεται για απόπτωση. Ωστόσο αφού παρατηρούμε ότι η Bcl-2 αυξάνεται στο μικρό ποσοστό των 10%, το κύτταρο προσπαθεί να αντισταθεί στην ενεργοποίηση της απόπτωσης προκαλούμενη από την γήρανση, και να διορθώσει τις βλάβες που έχουν προκληθεί. Δεδομένου ότι η παρατηρούμενη αύξηση κυμαίνεται σε πολύ μικρό ποσοστό της τάξης των 10%, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ώστε να εκτιμηθεί εάν είναι στατιστικώς σημαντική.



Εικόνα 10: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 24 ώρες. Πρωτεΐνες από κυτταρικά εκχυλίσματα C2C12, που είχαν υποβληθεί σε κατεργασία με D-galactose, ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν

σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,22 μM με Western Blot και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2. Η β -ακτίνη εμφανίζεται σε μοριακό βάρος 42kDa ενώ η Bcl-2 στα 28kDa. Οι λόγοι στην εικόνα προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β -ακτίνης και στην συνέχεια ως προς την συνθήκη control των 24 ωρών, μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-2 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β -ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 2: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 24 ώρες με διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών της πρωτεΐνης Bcl-2 ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β -ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-2 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β -ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

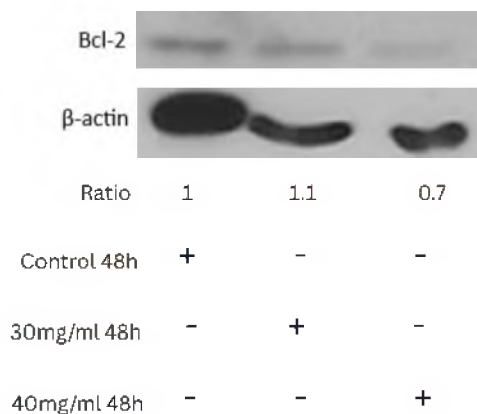
3.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BCL-2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 48 ΩΡΕΣ

Ταυτόχρονα ήταν απαραίτητη η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 48 ώρες, με στόχο την σύγκρισή τους με αυτών των 24 ωρών. Η έκθεση των κυττάρων στην D-galactose για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επάγει εντονότερα φαινόμενα κυτταρικής γήρανσης που συνοδεύονται με μεγαλύτερες μεταβολές στα επίπεδα της Bcl-2, πιθανώς ως αντίσταση του κυττάρου στην επερχόμενη κυτταρική απόπτωση. Αντίθετα μπορεί οι βλάβες που προκαλούνται σε αυτή τη χρονική

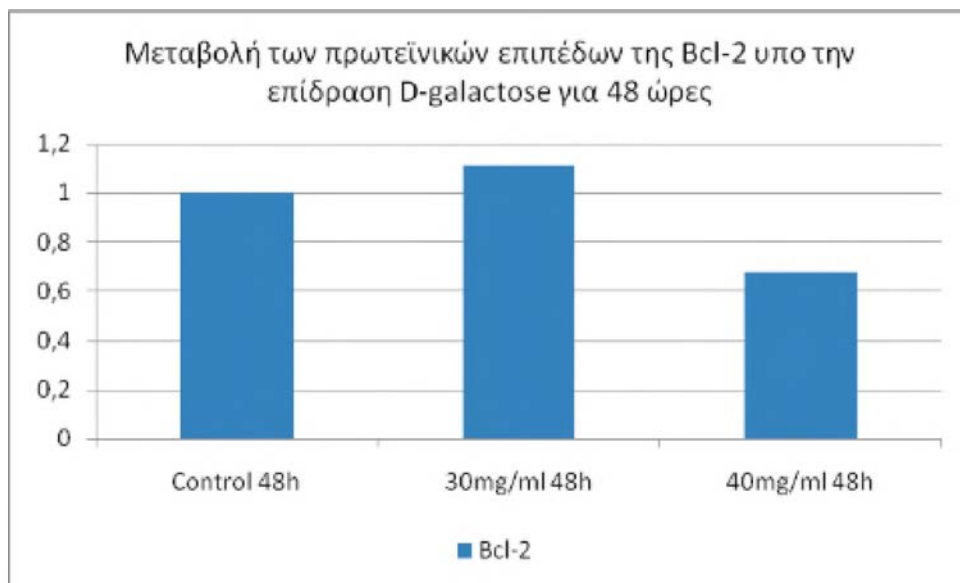
περίοδο, επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης, να είναι σοβαρές και μη αναστρέψιμες, και έτσι το κύτταρο να μην μπορεί να τις διορθώσει και να ενεργοποιήσει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Για την επίτευξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με στόχο την ανίχνευση των μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με D-galactose για 48 ώρες. Αρχικά κύτταρα C2C12 (35.000 κύτταρα/well) επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας, σε θρεπτικό υλικό DMEM και επώαστηκαν για 48 ώρες. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη της D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της κυτταρικής γήρανσης, που επάγεται σε διάστημα 48 ωρών, στους μηχανισμούς και τα μόρια που εμπλέκονται σε μηχανισμούς κυτταρικής γήρανσης.

Στην Εικόνα 11 και στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η επίδραση που έχει στις συγκεντρώσεις της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, η επώαση των κυττάρων με D-galactose, για 48 ώρες. Οι συγκεντρώσεις D-galactose που χρησιμοποιήθηκαν είναι 30mg/ml και 40mg/ml, καθώς επάγουν σημαντικά ποσοστά των κυττάρων σε φάση κυτταρικής γήρανσης, χωρίς να σκοτώνουν τα κύτταρα αλλά και χωρίς να τα αφήνουν άθικτα. Παρατηρούμε ότι με την προσθήκη 30mg/ml D-galactose εμφανίζεται μια αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 κατά 10% σε σχέση με την συνθήκη control, στην οποία δεν έχει γίνει προσθήκη D-galactose και τα κύτταρα είναι υγιή. Αυτή η μικρή αύξηση στην συγκέντρωση της Bcl-2 ίσως υποδηλώνει ότι τα κύτταρα υφίστανται καταπόνηση λόγω της επαγωγής της γήρανσης, ωστόσο προσπαθούν να αντισταθούν στην μύηση της απόπτωσης, αυξάνοντας την μεταγραφή και την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2. Η αντί-αποπτωτική δράση της Bcl-2 ρυθμίζει μηχανισμούς που καταστέλλουν την απόπτωση και δίνει μια ευκαιρία στα κύτταρα να διορθώσουν τις βλάβες που έχουν δημιουργηθεί από την γήρανση. Ωστόσο η παρατηρούμενη αύξηση κυμαίνεται σε πολύ μικρό ποσοστό της τάξης των 10% και χρήζει περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να εκτιμηθεί εάν είναι στατιστικώς σημαντική. Στην συνέχεια παρατηρούμε ότι με την προσθήκη των 40mg/ml D-galactose τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bcl-2 μειώνονται κατά 30% σε σχέση με την συνθήκη control. Με την μείωση της συγκέντρωσης της Bcl-2 συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα έχουν υποστεί σοβαρές καταπονήσεις λόγω της κυτταρικής γήρανσης και περιορίζεται η αντί-αποπτωτική τους άμυνα, η οποία θα τους επέτρεπε να διορθώσουν τις βλάβες που έχουν προκληθεί. Συνεπώς για να μην διαιωνίσουν στους απογόνους τους τις βλάβες που έχουν, ενεργοποιούν τον μηχανισμό της απόπτωσης. Έτσι οι πρωτεΐνες που έχουν αντί-αποπτωτικές δράσεις εξαλείφονται ή απενεργοποιούνται, ώστε να δράσουν οι προ-αποπτωτικές. Με αυτό τον τρόπο η συγκέντρωση της Bcl-2 μειώνεται ώστε η αντί-αποπτωτική της δράση να μην εμποδίζει την έναρξη της απόπτωσης.



Εικόνα 11: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 48 ώρες. Πρωτεΐνες από κυτταρικά εκχυλίσματα C2C12 ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,22 μM με εφαρμογή Western Blot και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2. Η β-ακτίνη εμφανίζεται σε μοριακό βάρος 42kDa ενώ η Bcl-2 στα 28kDa. Οι λόγοι στην εικόνα προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης και στην συνέχεια ως προς την συνθήκη control των 48 ωρών, μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-2 ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 3: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 48 ώρες με διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης

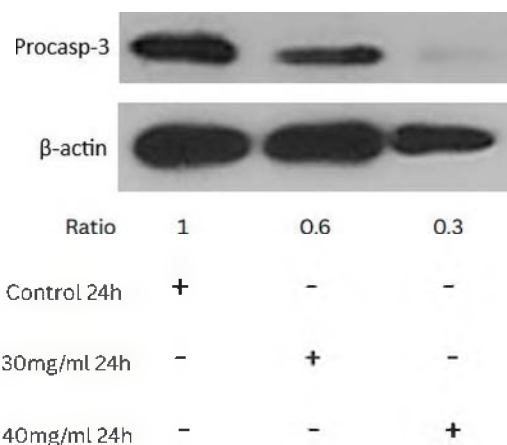
πρωτεϊνών κατά Western. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών της πρωτεΐνης Bcl-2 ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-2 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

3.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ PROCASPASE-3 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 24 ΩΡΕΣ

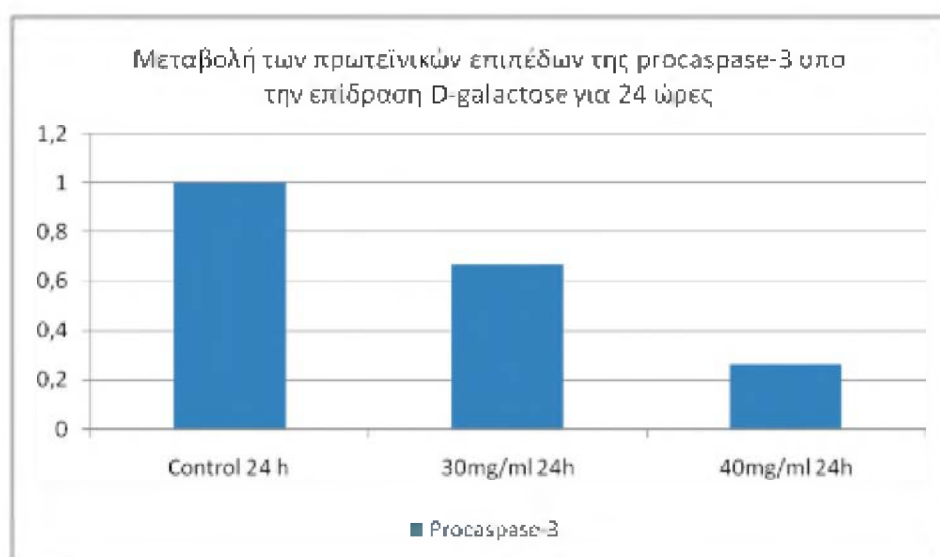
Επόμενος στόχος του πειράματος ήταν η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκάσπασης-3 σε κύτταρα C2C12 που επώαστηκαν με D-galactose για 24 ώρες. Η προκάσπαση-3 αποτελεί την πρόδρομη, ανενεργή μορφή της εκτελεστικής κασπάσης-3. Η ενεργοποίηση είτε του εξωκυττάριου είτε του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού της απόπτωσης, οδηγεί στην αυτοκατάλυση της προκάσπασης-3 και την μετατροπή της στην ενεργή μορφή της κασπάσης-3. Η κασπάση-3 με την σειρά της θα πραγματοποιήσει διεργασίες, όπως η διάσπαση των πρωτεϊνών του κυττάρου, που τελικά θα οδηγήσουν στην απόπτωσή του. Η μελέτη των επιπέδων της προκάσπασης-3 θα αποκαλύψει την πορεία που ακολουθεί το κύτταρο όταν εκτεθεί σε παράγοντες καταπόνησης όπως η κυτταρική γήρανση.

Για την επίτευξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με στόχο την ανίχνευση των μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκάσπασης-3 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με D-galactose για 24 ώρες. Αρχικά κύτταρα C2C12 (35.000 κύτταρα/well) επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας, σε θρεπτικό υλικό DMEM και επώαστηκαν για 48 ώρες. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη της D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της κυτταρικής γήρανσης, που επάγεται σε διάστημα 24 ωρών, στην συγκέντρωση της προκάσπασης-3.

Στην Εικόνα 12 και στο Διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η επίδραση που έχει στις συγκεντρώσεις της προκάσπασης-3, η επώαση των κυττάρων με D-galactose, για 24 ώρες. Οι συγκεντρώσεις D-galactose που χρησιμοποιήθηκαν είναι 30mg/ml και 40mg/ml, καθώς αποδείχτηκε από την δοκιμασία MTT ότι επάγουν κυτταρική γήρανση. Παρατηρούμε ότι με την προσθήκη 30mg/ml D-galactose εμφανίζεται μια μείωση κατά 40% στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκάσπασης-3 σε σύγκριση με την συνθήκη control. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα υφίστανται σοβαρές βλάβες λόγω της επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης και προετοιμάζονται για να ενεργοποιήσουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς. Συνεπώς για να ξεκινήσουν λειτουργίες όπως η πέψη των πρωτεϊνών των κυττάρων πρέπει να ενεργοποιηθούν οι πρόδρομες μορφές των κασπασών. Έτσι η μείωση της συγκέντρωσης της προκάσπασης-3 είναι αναμενόμενη καθώς είναι αναγκαία η ενεργοποίηση και η μετατροπή της σε κασπάση-3. Αντίστοιχα στα κύτταρα που επώαστηκαν με 40mg/ml D-galactose, παρατηρείται ακόμη μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα της προκάσπασης-3, κατά 70%. Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα D-galactose ενεργοποιεί ακόμη περισσότερο τον μηχανισμό της απόπτωσης.



Εικόνα 12: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της procaspase-3 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 24 ώρες. Πρωτεΐνες από κυτταρικά εκχυλίσματα C2C12 ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,22 μM με ανοσοαποτύπωση κατά Western, και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της procaspase-3. Η β-ακτίνη εμφανίζεται σε μοριακό βάρος 42kDa ενώ η procaspase-3 στα 35kDa. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης και στην συνέχεια ως προς την συνθήκη control των 24 ωρών, μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της procaspase-3 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 4: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της procaspase-3 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 24 ώρες με διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά

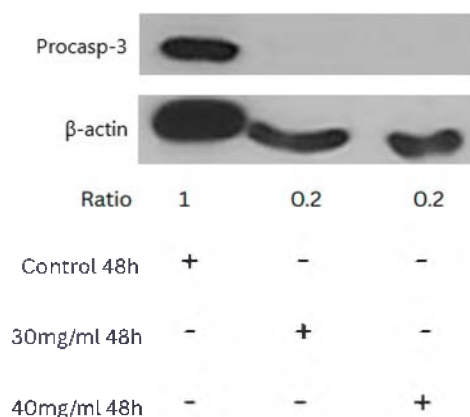
Western. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών της πρωτεΐνης procaspase-3 ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της procaspase-3 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

3.5 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ PROCASPASE-3 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12 ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΕΠΩΑΣΤΕΙ ΜΕ D-GALACTOSE ΓΙΑ 48 ΩΡΕΣ

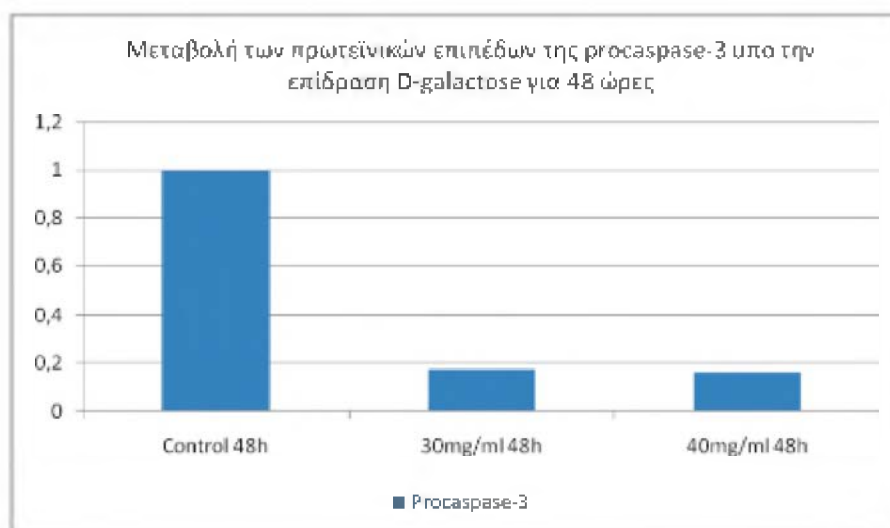
Ταυτόχρονα ήταν απαραίτητη η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 σε κύτταρα C2C12 που επώαστηκαν με D-galactose για 48 ώρες, με στόχο την σύγκρισή τους με αυτών των 24 ωρών. Αυτή η σύγκριση θα αποκαλύψει αν η παραμονή των κυττάρων σε συνθήκες γήρανσης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επάγει μια εντονότερη ανάγκη απόπτωσης ή παραμένει ίδια με αυτή που μυείται κατά την επώαση των 24 ωρών.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με στόχο την ανίχνευση των μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με D-galactose για 48 ώρες. Αρχικά κύτταρα C2C12 (35.000 κύτταρα/well) επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας, με θρεπτικό υλικό DMEM και επώαστηκαν για 48 ώρες. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη της D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της κυτταρικής γήρανσης, που επάγεται σε διάστημα 48 ωρών, στην συγκέντρωση της προκασπάσης-3.

Στην Εικόνα 13 και στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η επίδραση που έχει στις συγκεντρώσεις της προκασπάσης-3, η επώαση των κυττάρων με D-galactose, για 48 ώρες. Οι συγκεντρώσεις D-galactose που χρησιμοποιήθηκαν είναι 30mg/ml και 40mg/ml, καθώς αποδείχτηκε από την δοκιμασία MTT ότι επάγουν κυτταρική γήρανση. Παρατηρούμε ότι με την προσθήκη 30mg/ml D-galactose εμφανίζεται μια μείωση κατά 80% στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3 σε σύγκριση με την συνθήκη control. Αυτή η μεγάλη μεταβολή στην συγκέντρωση της προκασπάσης-3 υποδηλώνει ότι το κύτταρο υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες, προωθούμενες από την κυτταρική γήρανση, τις οποίες δεν μπορεί να επιδιορθώσει, και συνεπώς προετοιμάζεται να ενεργοποιήσει τον μηχανισμό της απόπτωσης. Έτσι η μείωση των επιπέδων της προκασπάσης-3 είναι αναμενόμενη, καθώς το κύτταρο έχοντας την ανάγκη να μυήσει τις αντιδράσεις της απόπτωσης, την μετατρέπει στην ενεργή κασπάση-3. Ταυτόχρονα η προσθήκη D-galactose σε συγκέντρωση 40mg/ml προκαλεί την ίδια μείωση, στα επίπεδα της προκασπάσης-3, με την συνθήκη των 30mg/ml κατά 80%.



Εικόνα 13: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της procaspase-3 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 48 ώρες. Πρωτεΐνες από κυτταρικά εκχυλίσματα C2C12 ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,22 μM με δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western, και μελετήθηκαν ως προς τις μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της procaspase-3. Η β-ακτίνη εμφανίζεται σε μοριακό βάρος 42kDa ενώ η procaspase-3 στα 35kDa. Οι λόγοι προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης και στην συνέχεια ως προς την συνθήκη control των 48 ωρών, μέσω του προγράμματος Image J. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων της procaspase-3 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).



Διάγραμμα 5: Διερεύνηση της επίδρασης της κυτταρικής γήρανσης, επαγόμενης με D-galactose σε συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της procaspase-3 σε κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν με D-galactose για 48 ώρες με διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών της πρωτεΐνης procaspase-3 ως προς την ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών

επιπέδων της procaspase-3 ως την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης στη συνθήκη μάρτυρα (control).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια απόκριση των κυττάρων στην έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες όπως η υποξία, η στέρηση θρεπτικών ουσιών και η ενεργοποίηση ογκογονιδίων (Calcinotto et al., 2019). Οι παράγοντες αυτοί δημιουργούν βλάβες στο DNA και αναγκάζουν τα κύτταρα να διακόψουν τον κυτταρικό τους κύκλο, ώστε να μην διαιωνίσουν το κατεστραμμένο γενετικό υλικό στα θυγατρικά τους κύτταρα. Παράλληλα τα γερασμένα κύτταρα εμφανίζουν σημαντικά χαρακτηριστικά-βιοδείκτες που διευκολύνουν τον εντοπισμό τους ανάμεσα στα υγιή κύτταρα. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, ο εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με την γήρανση (SASP), η αυξημένη έκκριση β-γαλακτοσιδάσης, η μεταβολική απορρύθμιση, οι μακρομοριακές βλάβες και η αντίσταση στην απόπτωση αποτελούν ορισμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που υφίστανται γήρανση (Herranz et al., 2018). Αν το κύτταρο καταφέρει να επιδιορθώσει τις βλάβες που έχουν προκληθεί, εισέρχεται ξανά στον κυτταρικό κύκλο και επανακτά την λειτουργικότητά του. Αν δεν τα καταφέρει ενεργοποιεί τους μηχανισμούς της απόπτωσης και "αυτοκτονεί" (Wang, 1995).

Η απόπτωση αποτελεί μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, κατά την οποία κύτταρα που έχουν συσσωρεύσει βλάβες ή δεν είναι πλέον απαραίτητα, εξαλείφονται χωρίς την δημιουργία φλεγμονής στους γύρω ιστούς (Mustafa et al., 2024). Τα αποπτωτικά κύτταρα υφίστανται αλλαγές στην μορφολογία τους όπως κατάρρευση του πυρήνα, πέψη πρωτεϊνών, συμπύκνωση χρωματίνης και μετατροπή της κυτταρικής μεμβράνης σε φυσαλίδες. Τελικά το κύτταρο μετατρέπεται σε κυστίδια, τα αποπτωτικά σωματίδια (ApoBDs) με τελικό προορισμό τα λυσοσώματα όπου και πέπτονται (Xu, Lai, & Hua, 2019). Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί με δύο τρόπους, ο καθένας από τους οποίους χρησιμοποιεί διαφορετικούς μηχανισμούς, οι οποίοι ωστόσο επιφέρουν το ίδιο αποτέλεσμα. Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται από την πρόσδεση ειδικών προσδετών σε υποδοχείς-θανάτου της κυτταρικής μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων (Zhou, Jiang, Liu, et al., 2017). Η σύνδεση αυτή επάγει την στρατολόγηση ενός συμπλόκου που τελικά θα ενεργοποιήσει την εναρκτήρια κασπάση-8, η οποία με την σειρά της θα ενεργοποιήσει τις εκτελεστικές κασπάσες -3, -6, -7 που θα μύησουν την απόπτωση. Το ενδογενές σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται λόγω έκθεσης του κυττάρου σε παράγοντες καταπόνησης. Έτσι ενεργοποιούνται προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, οι οποίες απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια (Elmore, 2007). Το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί την πρωτεάση Araf-1 η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση-9, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Στην συνέχεια ενεργοποιούνται οι εκτελεστικές κασπάσες -3, -6, -7 που οδηγούν σε απόπτωση του κυττάρου.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η μελέτη της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων αποπτωτικών μορίων σε μυϊκά κύτταρα που υφίστανται γήρανση. Αρχικός μας στόχος ήταν ο χαρακτηρισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης

D-galactose που επιτυγχάνει τις βέλτιστες συνθήκες γήρανσης χωρίς να σκοτώνει τα κύτταρα. Για την πραγματοποίηση του στόχου αυτού αξιοποιήθηκε η δοκιμασία MTT, στην οποία κύτταρα C2C12 επωάστηκαν με συγκεντρώσεις 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml D-galactose για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα του MTT έδειξαν ότι στις συνθήκες στις οποίες είχε προστεθεί 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose, επάγονται επαρκή ποσοστά μείωσης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια επαγωγής γήρανσης των κυττάρων. Η συγκέντρωση των 20mg/ml δεν επέφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς τα περισσότερα κύτταρα παρέμεναν ζωντανά, ενώ η συνθήκη των 60mg/ml σκότωνε τα περισσότερα κύτταρα. Ο χαρακτηρισμός αυτών των δύο συγκεντρώσεων ως τους κατάλληλους επαγωγείς κυτταρικής γήρανσης, έρχεται σύμφωνος με την αντίστοιχη βιβλιογραφία (Heidari et al., 2018).

Επόμενος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση των μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της προκασπάσης-3 σε μυϊκά κύτταρα που επωάστηκαν με συγκεντρώσεις D-galactose 30mg/ml και 40mg/ml για 24 και 48 ώρες. Όσον αφορά την αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, η επώαση των κυττάρων με D-galactose συγκέντρωσης 30mg/ml για 24 ώρες δεν εμφάνισε καμία μεταβολή στην συγκέντρωσή της σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα, ενώ η επώαση για 48 ώρες με την ίδια συγκέντρωση D-galactose, απέδωσε μια αύξηση στα πρωτεϊνικά της επίπεδα κατά 10%. Αυτή η μικρή αύξηση δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική ωστόσο θα μπορούσε να εξηγηθεί. Η επαγωγή γήρανσης για μεγαλύτερη χρονική περίοδο δημιουργεί σοβαρές κυτταρικές βλάβες, όμως δίνει τον χρόνο στο κύτταρο να αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας. Ένας από αυτούς είναι η αύξηση της πρωτεΐνης Bcl-2 η οποία αντιστέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης και επιτρέπει στο κύτταρο να διορθώσει τις πιθανές βλάβες και εν τέλει να ξεφύγει από την συνθήκη της γήρανσης. Ταυτόχρονα η επώαση των κυττάρων με D-galactose συγκέντρωσης 40mg/ml για 24 ώρες οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-2, ενώ η επώαση στην ίδια συγκέντρωση για 48 ώρες οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της Bcl-2 κατά 30% σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα. Η αύξηση των 10% οφείλεται στην προσπάθεια του κυττάρου να αντισταθεί στην ενεργοποίηση της απόπτωσης και να καταπολεμήσει τον παράγοντα καταπόνησης. Ωστόσο παρατηρούμε ότι η επαγωγή γήρανσης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα οδηγεί σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-2. Τα κύτταρα δεν μπορούν να διορθώσουν τις βλάβες που έχουν δημιουργηθεί λόγω της γήρανσης, και συνεπώς δεν μπορούν να συνεχίσουν να ζουν. Για να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της απόπτωσης θα πρέπει να απομακρυνθούν όλα τα εμπόδια, και ένα από αυτά είναι η αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Έτσι είναι απαραίτητη η μείωση της Bcl-2, ώστε να κύτταρα να καταφέρουν να ενεργοποιήσουν την απόπτωση και να μην διαιωνίσουν τις βλάβες τους στα θυγατρικά κύτταρα.

Ταυτόχρονα ήταν απαραίτητη και η μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3. Συγκεκριμένα η επώαση των κυττάρων με D-galactose συγκέντρωσης 30mg/ml για 24 ώρες, οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της προκασπάσης-3 κατά 40%, ενώ για 48 ώρες κατά 80% σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα. Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι και στις δύο συνθήκες υπάρχει επαγωγή της

απόπτωσης, καθώς τα επίπεδα της προκασπάσης-3 πρέπει να μειωθούν ώστε να μετατραπεί στην ενεργή κασπάση-3. Η μικρότερη μείωση των επιπέδων στην συνθήκη των 24 ωρών οφείλεται στο γεγονός ότι το κύτταρο έχει υποστεί γήρανση για λιγότερο χρόνο και έτσι προετοιμάζει τον μηχανισμό της απόπτωσης, ενώ στην συνθήκη των 48 ωρών οι βλάβες λόγω της παρατεταμένης γήρανσης είναι μη αναστρέψιμες και η απόπτωση είναι μονόδρομος. Παράλληλα η επώαση των κυττάρων με D-galactose συγκέντρωσης 40mg/ml για 24 ώρες οδήγησε σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 κατά 70% ενώ η επώαση στην ίδια συγκέντρωση για 48 ώρες οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της κατά 80%, σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα. Αυτές οι δύο μεταβολές είναι σχεδόν όμοιες και μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μείωση κατά 80% ίσως αντιστοιχεί στην μέγιστη μείωση της συγκέντρωσης της προκασπάσης-3 ώστε να ενεργοποιηθεί πλήρως ο μηχανισμός της απόπτωσης, καθώς παρατηρήθηκε και στις δύο συγκεντρώσεις D-galactose, αλλά και στις δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους επώασης.

Εν τέλη οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι, η επαγωγή γήρανσης, παρά τις αρχικές προσπάθειες των κυττάρων να αντισταθούν στον θάνατό τους, οδηγεί στην ενεργοποίηση της απόπτωσης και την "αυτοκτονία" των κυττάρων. Η επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με την D-galactose, επάγει εντονότερες συνθήκες γήρανσης από αυτή των 24 ωρών και έτσι παρατηρούνται διαφορές στις μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων ανάμεσα στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης, ωστόσο απαιτούνται περισσότερες βιολογικές και πειραματικές επαναλήψεις για την επιβεβαίωση των συγκεκριμένων ιδιοτήτων. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν από τις συνθήκες επαγωγής γήρανσης με προσθήκη D-galactose η συνθήκη επώασης 24 ωρών με συγκέντρωση D-galactose 40 mg/ml, καθώς και η συνθήκη 48 ωρών με συγκέντρωση D-galactose 30 mg/ml, προσομοιάζουν καλύτερα συνθήκες γήρανσης, δεδομένου ότι ενεργοποιούνται περισσότερο αντί-αποπτωτικοί μηχανισμοί με χαμηλότερα επίπεδα επαγωγής απόπτωσης. Επόμενοι μας στόχοι είναι η βελτιστοποίηση των συνθηκών επαγωγής γήρανσης με περαιτέρω διερεύνηση περισσότερων αντί-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών μορίων ώστε επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και να επιτευχθούν συνθήκες επαγωγής γήρανσης με περιορισμένη κατά το δυνατό επαγωγή κυτταρικής απόπτωσης. Παράλληλα η μελέτη περισσότερων προ-αποπτωτικών μορίων θα μας βοηθήσει να αποκτήσουμε μια πιο πλήρη εικόνα της επαγωγής της απόπτωσης, της πορείας κάθε πρωτεΐνης, των μηχανισμών που ενεργοποιούνται σε κάθε χρονική φάση της γήρανσης, καθώς και του σηματοδοτικού μονοπατιού που εμπλέκεται. Η διερεύνηση του πλήρους μηχανισμού που οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, όταν αυτά υφίστανται γήρανση, θα ανοίξει δρόμους στην κατανόηση της λειτουργίας των μυϊκών κυττάρων σε άτομα που πάσχουν από παθολογικές και αυτοάνοσες ασθένειες του μυϊκού συστήματος, στον εντοπισμό του παράγοντα που τα παρεκτρέπει από την φυσιολογική δραστηριότητά τους, και τελικά στην ανάπτυξη κατάλληλων θεραπειών που θα μπορέσουν να καταπολεμήσουν αυτές τις σύνθετες ασθένειες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2014). Cell death and repair in lung disease. In *Pathobiology of human disease: A dynamic encyclopedia of disease mechanisms* (pp. 2558–2574). Elsevier.
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Chapter Four – Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In R. Donev (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 125, pp. 73–120). Elsevier.
- J. Puccini, S. Kumar, 2016, Caspases, Encyclopedia of Cell Biology, Academic Press, Editors: Ralph A. Bradshaw, Philip D. Staid, p. 364-373.
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047–1078.
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246.
- Astier, A.L.P. (2021) Necrosis and apoptosis - what are the differences and their significances", AndreasAstier. Available at: <https://www.andreasastier.com/blog/necrosis-and-apoptosis-what-are-the-differences-and-their-significances>.
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121.
- Mustafa, M., Ahmad, R., Tantry, I. Q., Ahmad, W., Siddiqui, S., Alam, M., Abbas, K., Moinuddin, Hassan, M. I., Habib, S., & Islam, S. (2024). Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells*, 13(22), 1838.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.³⁷
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592.
- Zimmermann, K. C., & Green, D. R. (2001). How cells die: Apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4, Suppl), S99–S103.

- Kantari, C., & Walczak, H. (2011). Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(4), 558–563.
- Schug, Z. T., Gonzalvez, F., Houtkooper, R. H., Vaz, F. M., & Gottlieb, E. (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death & Differentiation*, 18(3), 538–548.
- Yanumula, A., & Cusick, J. K. (2023). *Biochemistry, extrinsic pathway of apoptosis*. In StatPearls.
- Sayers, T. J. (2011). Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8), 1173–1180.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.-j., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491–501.
- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320–7326.
- Inoue, S., Browne, G., Melino, G., & Cohen, G. M. (2009). Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death & Differentiation*, 16(7), 1053–1061.
- Edlich, F. (2018). BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(1), 26–34.
- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Ralph, D. J., Celtek, S., Musumeci, G., Giunta, S., ... *et al.* (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *BioMed Research International*, 2014, Article 616149.
- Shawi, M., & Autexier, C. (2008). Telomerase, senescence and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(1–2), 3–10
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., ... Demaria, M. (2019). Cellular senescence: Defining a path forward. *Cell*, 179(4), 813–827.
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556.
- Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509, 439–446.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–724
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: Dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139–1153.
- Sin, J., Andres, A. M., Taylor, D. J. R., Weston, T., Hiraumi, Y., Stotland, A., ... & Gustafsson, Å. B. (2016). Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy*, 12(2), 369–380.
- Moustogiannis, A., Philippou, A., Taso, O., Zevolis, E., Pappa, M., Chatzigeorgiou, A., & Koutsilieris, M. (2021). The effects of muscle cell aging on myogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3721.

- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113(Pt 20), 3613–3622.
- Sasaki, M., Kumazaki, T., Takano, H., Nishiyama, M., & Mitsui, Y. (2001). Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(15), 1695–1706.
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 397–408.
- Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 81–94.
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahr, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I., & Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7, Article 11190.
- Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2014). Cell death and repair in lung disease. In *Pathobiology of human disease: A dynamic encyclopedia of disease mechanisms* (pp. 2558–2574). Elsevier.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1541–1548.
- Rampal, G., Khanna, N., Thind, T. S., Arora, S., & Viga, A. P. (2012). Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. *Medicinal Chemistry & Drug Discovery*, 3(2), 79–93.
- Meerloo, J. van, Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237–245). Springer.
- Ona, S. (n.d.). *MTT Assay Principle*. BioRender. <https://app.biorender.com/templates/figure-6494f616bd359d0019f73cbd-mtt-assay-principle>
- Heidari, S., Mehri, S., Shariaty, V., & Hosseinzadeh, H. (2018). *Preventive effects of crocin on neuronal damages induced by D-galactose through AGEs and oxidative stress in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y)*. *Journal of Pharmacopuncture*, 21(1), 18–25.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια της παρούσας πτυχιακής εργασίας, δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την πολύτιμη ευκαιρία που μου προσέφερε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα. Της είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για τη σταθερή υποστήριξη, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και γνώσεις που απλόχερα μοιράστηκε μαζί μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον δρ. Δημήτριο Λεωνίδα και την δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, για την εποικοδομητική συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή τους τόσο στην παρούσα εργασία όσο και κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Σταυρούλα Σουϊλεμεζή, μεταπτυχιακή φοιτήτρια στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την εκπαίδευση, την συνεχή καθοδήγηση, την στήριξη και την υπομονή καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την συνεχή ψυχική και ηθική στήριξη καθώς και για την αμέριστη υπομονή τους καθόλα τα χρόνια των σπουδών μου. Τους είμαι ευγνώμων για την συμβολή τους στην εκπλήρωση των στόχων μου.