

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο ρόλος της Sirt1 στο σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου:
πιθανή εμπλοκή στην κυτταρική γήρανση»**
**«The role of Sirt1 in the spindle assembly checkpoint: potential involvement in
cellular senescence»**

*Κουτσούμπα Δήμητρα
Του Βασιλείου*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (επιβλέπουσα): Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Ιατρικής Βιολογίας-Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής
(+30 2410 685624, vtrachana@uth.gr)

ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (συνεπιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής
Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας

ΔΑΜΑΛΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής
(+30 2410 685717, damalas@uth.gr)

Ευχαριστίες

Πριν την παρουσίαση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, την κυρία Τραχανά Βαρβάρα, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, την καθοδήγηση της και την ενθάρρυνση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας, καθώς υπήρξε καθοριστική για την επιτυχή ολοκλήρωση της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Ουτσκούνη Ζωζώ, για την αμέριστη βοήθεια, τις συμβουλές, τον χρόνο και την διάθεση της να με στηρίζει σε κάθε στάδιο υλοποίησης αυτής της προσπάθειας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Στάγκο Δημήτρη, για τις γνώσεις που μου παρείχε αυτά τα χρόνια, και τον κύριο Δαμαλά Αλέξανδρο για την πολύτιμη βοήθεια του.

Τέλος, στην προσπάθεια μου, όλων αυτών των χρόνων, οι σημαντικότεροι άνθρωποι ήταν η οικογένεια και οι φίλοι μου και τους χρωστώ το μεγαλύτερο ευχαριστώ.

Περίληψη

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια από τις πιο θεμελιώδεις διαδικασίες της ζωής των κυττάρων. Κατά την διαδικασία αυτή, τα κύτταρα εισέρχονται σε μία μόνιμη κατάσταση διακοπής του κυτταρικού κύκλου. Πρόκειται για έναν μηχανισμό που λειτουργεί αποτρεπτικά για την καρκινογένεση, ωστόσο η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων οδηγεί σε φλεγμονή που μπορεί να προωθή τον καρκίνο αλλά και την εμφάνιση ηλικιο-εξαρτώμενων παθήσεων. Η κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί είτε από την προοδευτική βράχυνση των τελομερών (αναδιπλασιαστική γήρανση) είτε από στρεσογόνους παράγοντες (Επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση– Stress Induced Premature Senescence-SIPS). Για την εγκαθίδρυση της γήρανσης, βασική προϋπόθεση είναι η ενεργοποίηση των βασικών σηματοδοτικών οδών p53/p21^{WAF1/CIP1} και p16INK4a/Prb που οδηγούν στην τελική αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης.

Κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας των κυττάρων παίζει το Σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint–SAC). Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει τη σύνδεση των χρωμοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου, πριν την έναρξη της ανάφασης, αποφεύγοντας τη δημιουργία ανευπλοειδών κυττάρων. Βασικές πρωτεΐνες αυτού του σημείου ελέγχου είναι οι Mad2, Bub1b, και Cdc20, που σχηματίζουν το σύμπλοκο του μιτωτικού σημείου ελέγχου (Mitotic Checkpoint Complex-MCC) που βασική του λειτουργία είναι η αναστολή του συμπλέγματος APC/C και παραμονή στη μετάφαση μέχρι να εξασφαλιστεί ότι όλοι οι κινητοχώροι των μεταφασικών χρωμοσωμάτων είναι συνδεδεμένοι με την άτρακτο. Η δυσλειτουργία του SAC οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια, ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, που έχει σχετιστεί και με την επαγωγή κυτταρικής γήρανσης.

Η Σιρτουίνη 1 (Sirt1) είναι μία NAD⁺ εξαρτώμενη ιστονική δεακετυλάση που ρυθμίζει μία πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης του DNA, του μεταβολισμού, της φλεγμονής και της γήρανσης. Η Sirt1 αποακετυλιώνει και ρυθμίζει την ενεργότητα κρίσιμων παραγόντων όπως οι p53, FoxO και NF-κβ, δρώντας συχνά ως προστατευτικός παράγοντας έναντι του κυτταρικού στρες. Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι η Sirt1 μπορεί να ρυθμίζει θετικά την έκφραση και τη λειτουργία της πρωτεΐνης Bub1b του SAC, θέτοντας την ως πιθανό κρίσιμο συνδετικό κρίκο μεταξύ της μιτωτικής ακρίβειας και της κυτταρικής γήρανσης.

Σε αυτό το πλαίσιο η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της Sirt1 και του SAC σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από τη Γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Πιο συγκεκριμένα μελετάται ο ρόλος της Sirt1 στη ρύθμιση των πρωτεϊνών του SAC (Bub1b, Mad2, Cdc20) και η πιθανή συμμετοχή της αλληλεπίδρασης αυτής στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί γηρασμένων και νεαρών κυττάρων που η μιτωτική διαδικασία διακόπηκε με νοκοδαζόλη.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναμένεται να διαφωτίσουν έναν νέο μοριακό μηχανισμό που συνδέει την μιτωτική ακρίβεια με την κυτταρική γήρανση, με πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές στην καρκίνο και τις ηλικιο-εξαρτώμενες διαταραχές.

Abstract

Cellular senescence represents one of the most fundamental processes in the life of cells. During this process, cells enter a permanent state of cell cycle arrest. This mechanism acts as a barrier to carcinogenesis; however, the accumulation of senescent cells leads to inflammation, which may promote cancer as well as the onset of age-related diseases. Cellular senescence may be induced either by progressive telomere shortening (replicative senescence) or by stress factors (Stress-Induced Premature Senescence – SIPS). For the establishment of senescence, a prerequisite is the activation of the key signaling pathways p53/p21^{WAF1/CIP1} and p16^{INK4a}/pRb, which ultimately lead to irreversible cell cycle arrest.

A central role in maintaining the genomic stability of cells is played by the **Spindle Assembly Checkpoint (SAC)**. This mechanism ensures the attachment of chromosomes to the microtubules of the mitotic spindle before the onset of anaphase, thus preventing the generation of aneuploid cells. Key proteins of this checkpoint are Mad2, Bub1b, and Cdc20, which form the **Mitotic Checkpoint Complex (MCC)**. The main function of this complex is to inhibit the APC/C complex and maintain cells in metaphase until all kinetochores of metaphase chromosomes are properly attached to the spindle. Dysfunction of the SAC results in chromosomal instability, a hallmark of cancer cells, which has also been associated with the induction of cellular senescence.

Sirtuin 1 (Sirt1) is a NAD⁺-dependent histone deacetylase that regulates a wide range of cellular processes, including DNA repair, metabolism, inflammation, and aging. Sirt1 deacetylates and modulates the activity of critical factors such as p53, FoxO, and NF- κ B, often acting as a protective agent against cellular stress. Recent studies suggest that Sirt1 may positively regulate the expression and function of the SAC protein Bub1b, highlighting it as a potential critical link between mitotic fidelity and cellular senescence.

In this context, the present thesis focuses on the investigation of the relationship between Sirt1 and the SAC in human mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly (WJ-MSCs). Specifically, it examines the role of Sirt1 in the regulation of SAC proteins (Bub1b, Mad2, Cdc20) and the potential involvement of this interaction in the establishment of cellular senescence. For this purpose, populations of senescent and young cells were used, in which the mitotic process was disrupted by nocodazole treatment.

The results of this study are expected to shed light on a novel molecular mechanism linking mitotic fidelity with cellular senescence, with potential therapeutic implications in cancer and age-related disorders.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	9
1. Βλαστοκύτταρα	9
1.1 Χαρακτηριστικά Βλαστοκυττάρων	9
1.2 Είδη βλαστοκυττάρων	11
1.3 Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα	11
1.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από τα Γέλη του Wharton	12
2. Κυτταρική Γήρανση	12
2.1 Ορισμός και βασικά χαρακτηριστικά	12
2.2 Μόρια Σηματοδότησης	15
2.3 Εκκριτικός Φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP)	17
2.4 Δείκτες Γήρανσης	18
3. Κυτταρικός Κύκλος	19
3.1 Κυτταρικός Κύκλος και Φάσεις	19
3.2 Χαρακτηριστικά Μίτωσης	20
3.3 Δομή και λειτουργία μιτωτικής ατράκτου	21
3.4 Σημεία Ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.....	22
3.5 SAC.....	23
3.6 Συνέπειες δυσλειτουργίας του.....	24
3.7 Σχέση με γήρανση	25
4. Σιρτουίνη	26
4.1 Λειτουργία.....	26
4.2 Ρόλος	28
4.3 Σχέση με γήρανση	29
4.4 Σχέση με SAC	30
5. Σκοπός Εργασίας	30
Πειραματικό Μέρος	31
6. Υλικά και μέθοδοι.....	31
6.1 Δείγματα Κυττάρων.....	31
6.2 Καλλιέργειες Wharton's Jelly	31
6.3 Προσδιορισμός δραστηριότητας SA-β-gal	33
6.4 Επίδραση με νοκοδαζόλη.....	34
6.5 Συλλογή μιτωτικού κλάσματος μέσω mitotic shake off.....	34
6.6 Απομόνωση Πρωτεϊνών	34

6.7 Ανίχνευση υποκυτταρικού εντοπισμού sirt1 με ανοσοφθορισμό.....	35
6.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS	37
7. Αποτελέσματα	41
7.1 Βιοδείκτες για την ένδειξη κυτταρικής γήρανσης.....	41
7.2 Αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Sirt1 στην γήρανση.....	43
7.3 Αξιολόγηση επιπέδων της πρωτεΐνης Κυκλίνης B1 σε κύτταρα που συλλέχθηκαν έπειτα από την επίδραση νοκοδαζόλης και ασύγχρονα κύτταρα.	44
7.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων Bub1b και Mad2 σε κύτταρα που συλλέχθηκαν έπειτα από επίδραση νοκοδαζόλης και ασύγχρονα κύτταρα.	45
7.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων SIRT1 σε κύτταρα που έχει συλλέχθηκαν έπειτα από την επίδραση νοκοδαζόλης και ασύγχρονα κύτταρα.....	46
7.6 Ανίχνευση υποκυτταρικού εντοπισμού sirt1	47
8. Συμπεράσματα-Συζήτηση	49
9. Βιβλιογραφία :.....	51

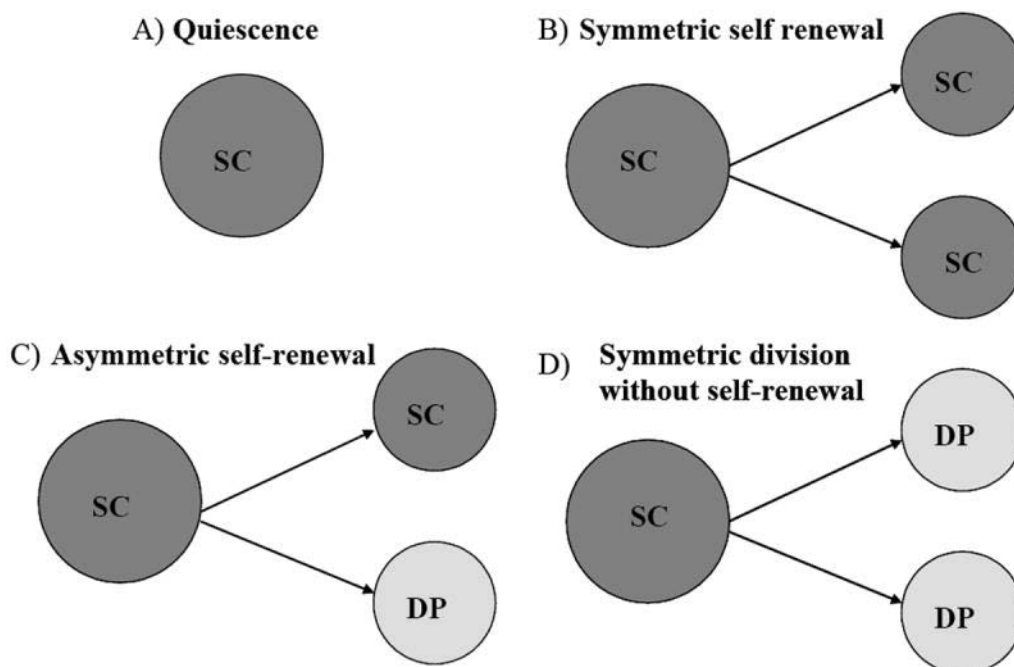
Εισαγωγή

1. Βλαστοκύτταρα

1.1 Χαρακτηριστικά Βλαστοκυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα ή αλλιώς βλαστοκύτταρα είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα που εντοπίζονται σε πολυκύτταρους οργανισμούς, τόσο σε ιστούς ενηλίκων όσο και σε εμβρυϊκούς. Υπάρχουν δύο βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να τηρεί ένα κύτταρο ώστε να χαρακτηριστεί ως βλαστικό, η ικανότητα αυτό-ανανέωσης και η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους όταν βρεθούν στο κατάλληλο περιβάλλον (Zeyu Tian, 2023).

Η ικανότητα αυτό-ανανέωσης είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί συμβάλλει στην διατήρηση της κυτταρικής ισορροπίας. Αυτό εξασφαλίζεται από την συμμετρική διαίρεση κατά την οποία ένα βλαστοκύτταρο θα διαιρεθεί και θα προκύψουν δύο θυγατρικά κύτταρα που θα είναι όμοια με το αρχικό. Εκτός από την συμμετρική διαίρεση, υπάρχει και η ασύμμετρη, κατά την οποία προκύπτουν δύο κύτταρα, το ένα εκ των οποίων είναι πιο εξειδικευμένο, βοηθώντας στην ανάπτυξη και την ανανέωση των αποθεμάτων των κυττάρων. Επιπλέον, ένα βλαστοκύτταρο μπορεί να μην διαιρεθεί καθόλου, ή τέλος, να διαφοροποιηθεί συμμετρικά αποδίδοντας δύο διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα. Οι τέσσερις αυτοί διαφορετικοί δίοδοι είναι αναγκαίοι ώστε να επιτευχθεί η διατήρηση και η ανάπτυξη της αποθήκης των βλαστοκυττάρων και η επιδιόρθωση ιστών (Biehl & Russell, 2009, Molofsky et al., 2004).



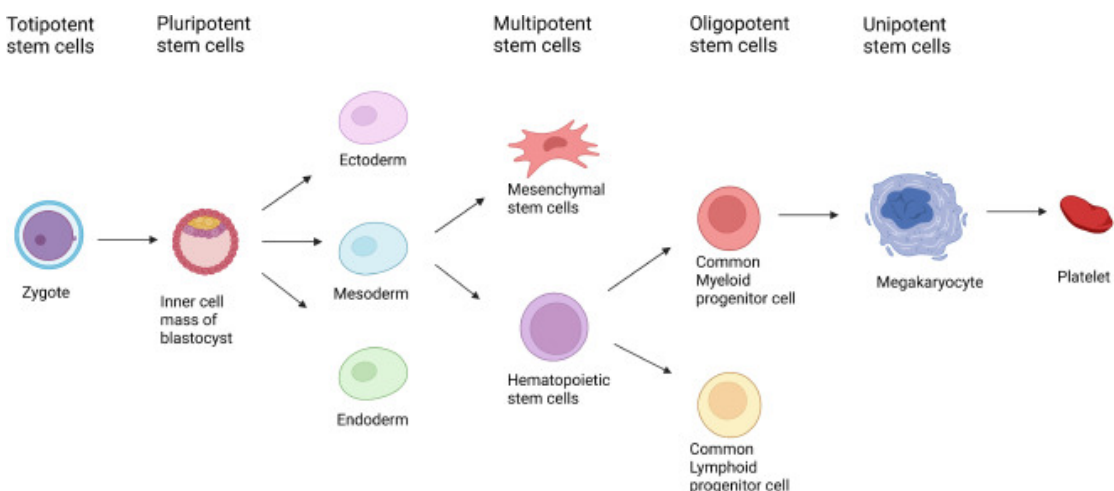
Ανάμεσα στα διαφορετικά είδη βλαστοκυττάρων υπάρχουν διαφορές στην ικανότητα διαφοροποίησης. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην διαφορετική ισχύ μεταξύ τους ή στο διαφορετικό δυναμικό διαφοροποίησης. Με βάση αυτό διακρίνονται σε πέντε διαφορετικές κατηγορίες.

Αρχικά, είναι τα **παντοδύναμα** βλαστοκύτταρα. Αυτά ορίζονται ως τα κύτταρα από τα οποία μπορεί να προκύψει ένας ολόκληρος οργανισμός και όλοι οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί. Ένα τέτοιο κύτταρο είναι το ζυγωτό, δηλαδή το γονιμοποιημένο ωάριο από ένα σπερματοζωάριο, καθώς και αυτά που προκύπτουν από τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις (Chagastelles et al. 2011).

Μετά τις πρώτες διαιρέσεις του ζυγωτού, τα κύτταρα χάνουν την παντοδυναμία τους και μετατρέπονται σε **ολοδύναμα**. Τα ολοδύναμα είναι κύτταρα ικανά να διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών στιβάδων (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) χωρίς να σχηματίζουν εξωεμβρυϊκές δομές όπως ο πλακούντας (AlisonandIslam, 2009). Οι βλαστικές στιβάδες είναι αποτέλεσμα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM) που ευθύνεται για την δημιουργία των ιστών και των οργάνων ενός εμβρύου (Chagastelles & Nardi, 2011).

Τα ολοδύναμα κύτταρα, προχωρώντας, χάνουν την ικανότητα τους να μετατρέπονται σε κύτταρα και των τριών βλαστικών στιβάδων. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται **πολυδύναμα** (multipotent). Τα πολυδύναμα κύτταρα διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κυτταρικούς τύπους μίας μόνο βλαστικής στιβάδας. Μετά από 14-15 μέρες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, το έμβρυο περνάει στο στάδιο της γαστριδίωσης. Εκεί εντοπίζονται τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και μπορούν να εξελιχθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο μέσα στην δική τους στιβάδα (BiehlandRussel, 2009).

Τέλος, τα **ολιγοδύναμα** βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την δυνατότητα τους να διαφοροποιούνται προς έναν περιορισμένο αριθμό διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα είναι περισσότερο εξειδικευμένα και μπορούν να διαφοροποιηθούν προς έναν μόνο τύπο κυττάρου. Αν και διαθέτουν την ικανότητα για επαναλαμβανόμενες διαιρέσεις η αξία τους για την αναγεννητική ιατρική είναι περιορισμένη συγκριτικά με τα πολυδύναμα ή ολοδύναμα βλαστοκύτταρα, τα οποία προσφέρουν ευρύτερες δυνατότητες εφαρμογής (Zakrzewski et al., 2019).



Εικόνα 2 : Ταξινόμηση βλαστικών κυττάρων με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης τους (Mesfin et al., 2023)

1.2 Είδη βλαστοκυττάρων

Ένας άλλος τρόπος διαχωρισμού των βλαστοκυττάρων είναι με βάση την προέλευση τους. Έτσι χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες : τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, τα περιγεννητικά βλαστοκύτταρα, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα καθώς και τα επαγόμενα ολοδύναμα κύτταρα (iPSCs).

Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, είναι ολοδύναμα κύτταρα που προέρχονται από την βλαστοκύστη, η οποία σχηματίζεται 5-6 μέρες αφού γίνει η γονιμοποίηση. Είναι ικανά να διαφοροποιούνται και προς τις τρεις βλαστικές στιβάδες και χαρακτηρίζονται από υψηλή δυνατότητα αυτοανανέωσης. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για μελέτες με επίκεντρο την ανθρώπινη ανάπτυξη, καθώς και για θεραπείες. Γενικότερα, εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων, κυρίως σε σχέση με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα, όμως υπάρχουν ηθικοί ενδοιασμοί για την χρήση τους. (Chagastelles and Nardi, 2011)

Τα περιγεννητικά βλαστοκύτταρα, χωρίζονται με την σειρά τους σε επιπλέον κατηγορίες, ανάλογα με τον ιστό που απομονώθηκαν. Για παράδειγμα υπάρχουν αυτά του αμνιακού υγρού, του πλακούντα και του ομφάλιου λώρου. Δεν μπορούν να διαιρούνται επ' αόριστον και είναι πολυδύναμα. Αυτά που προέρχονται από το αμνιακό υγρό δεν είναι ιδιαίτερα πρακτικά, σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο, λόγω του μέσου απομόνωσης τους (αμνιοπαρακέντηση). (Ilic and Polak, 2011, Ronser et al., 2023)

Τα ενήλικα ή αλλιώς σωματικά βλαστοκύτταρα απομονώνονται από διάφορους τύπους ιστών πλήρους αναπτυγμένου οργανισμού. Έχουν μειωμένη ικανότητα αυτοανέωσης σε σχέση με τα εμβρυϊκά και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε εξειδικευμένες κυτταρικές σειρές με βάση την προέλευση τους. Μπορούν να είναι είτε πολυδύναμα, είτε ολιγοδύναμα είτε ακόμα και μονοδύναμα. Έχουν χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία σε θεραπείες, όπως για παράδειγμα σε μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών, για κυτταρικές θεραπείες καθώς και για αποκατάσταση τραυματισμένων ιστών. Τέλος, δεν περιορίζεται η χρήση τους από τα ηθικά ζητήματα που τίθενται για τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Chagastelles & Nardi, 2011).

Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) μπορούν να προκύψουν από διάφορους τύπους σωματικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων μονοδύναμων και ολιγοδύναμων, μέσω επαναπρογραμματισμού με την εισαγωγή κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κυτταρικές σειρές όλων των βλαστικών στιβάδων καθώς και να διαιρούνται επ' αόριστον *in vitro*, καθιστώντας τα έτσι ιδανικά για να χρησιμοποιηθούν στην αναγεννητικής ιατρικής. Τέλος, παρακάμπτουν οποιαδήποτε ηθική εναντίωση (Ilic & Polak, 2011).

1.3 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα, ενήλικα κύτταρα που απομονώθηκαν αρχικά από τον μυελό των οστών (Friedenstein et al., 1974). Έχουν την ιδιότητα ότι μοιάζουν με ινοβλάστες και μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς τις

τρεις βλαστικές στιβάδες και πιο ειδικά σε χονδροβλάστες, λιποκύτταρα και οστεοβλάστες. Έχουν επίσης, σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση, καθώς εμφανίζουν και διάφορα αντιφλεγμονώδη οφέλη (Ridge, Sullivan and Glynn, 2017, Marinoetal 2019).

1.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από τα Γέλη του Wharton

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα για τα περιγεννητικά μεσεγχυματικά κύτταρα, δηλαδή αυτά που προέρχονται από περιγεννητικούς ιστούς είναι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από τη Γέλη του Wharton. Η γέλη του Wharton εντοπίζεται στο εσωτερικό του ομφάλιου λώρου και αποτελεί έναν βλεννοζελατινώδη ιστό (Aratikatla et al., 2023). Ο βασικός του ρόλος είναι υποστηρικτικός για τα αιμοφόρα αγγεία, ώστε να αποφεύγεται η συμπίεση τους. Είναι πλούσια πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων, αποδίδοντας την μεγαλύτερη ποσότητα MSCs, τα οποία απομονώνονται εύκολα και είναι πολυδύναμα. Η χρήση τους εμφανίζει διάφορα προτερήματα έχουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης ενώ εμφανίζουν μειωμένη ανοσολογική αντίδραση (Kassem and Kamal, 2020).

2. Κυτταρική Γήρανση

2.1 Ορισμός και βασικά χαρακτηριστικά

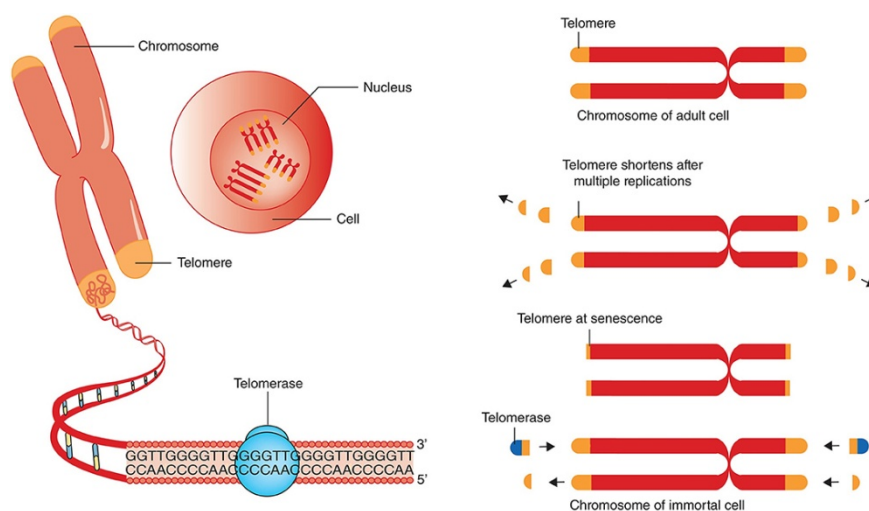
Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως η μη αναστρέψιμη κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται, δηλαδή γίνεται αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Θεωρείται πως έχει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου, καθώς πρόκειται για μια μόνιμη κατάσταση διακοπής των διαιρέσεων των κυττάρων. Μπορεί να οφείλεται είτε σε ενδογενείς παράγοντες, όπως η βράχυνση των τελομερών, ή και σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες.

Αναδιπλασιαστική Γήρανση

Το φαινόμενο κυτταρικής γήρανσης περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Hayflick και Moorhead το 1961 σε μια καλλιέργεια ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών. Ανακάλυψαν πως τα κύτταρα δεν είναι ικανά να διαιρούνται επ' άπειρον, αλλά χαρακτηρίζονται από έναν περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων. Μόλις τον ξεπεράσουν, ο κυτταρικός κύκλος αναστέλλεται ενώ τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά. Το όριο των αριθμών των διαιρέσεων, πριν την αναστολή του κύκλου, ονομάζεται όριο Hayflick (Hayflick, Moorhead, 1961). Το συγκεκριμένο είδος γήρανσης οφείλεται στην σταδιακή βράχυνση των τελομερών, η οποία προκαλείται από το πρόβλημα αντιγραφής του άκρου του DNA-τελομερές, γνωστό ως «end replication problem» (Wellinger, 2014).

Τα τελομερή αφορούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο τέλος των χρωμοσωμάτων πλούσιες σε G. Ο βασικός τους ρόλος είναι να βοηθούν στην διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, και μέσω της αποτροπής λανθασμένης σύντηξης του άκρου των χρωμοσωμάτων (Armanios, 2023). Η αντιγραφή του DNA γίνεται βάση του ημισυντηρητικού μηχανισμού και προχωράει μόνο προς την κατεύθυνση 5'-3'. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι DNA πολυμεράσεις να αδυνατούν να αντιγράψουν ολόκληρο το χρωμόσωμα, καθώς απαιτούν πάντα έναν εκκινητή με

διαθέσιμο ένα 3' άκρο, οδηγώντας στην σταδιακή βράχυνση των τελομερών που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Wellinger, 2014, Soudetet. al, 2014). Μόλις τα τελομερή έχουν μήκος ίσο με 4-7kb, το οποίο θεωρείται κρίσιμο μήκος, δίνουν έναυσμα για την ενεργοποίηση του DDR μηχανισμού (DNA Damage Response) που σταματά τον κυτταρικό κύκλο (Gu, Liu, et. al, 2024). Οι ερευνητές οδηγήθηκαν στην ανακάλυψη ενός ενζύμου, της τελομεράσης, η οποία επεκτείνει τα τελομερή προσθέτοντας τα επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των τελομερών. Το ένζυμο αυτό είναι ανενεργό στα περισσότερα σωματικά κύτταρα, παρουσιάζει μέτρια ενεργότητα στα ενήλικα βλαστοκύτταρα, υψηλή ενεργότητα στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και εξαιρετικά υψηλή ενεργότητα στα καρκινικά (Wang, et al., 2019).



Εικόνα 3 : Η φθορά των τελομερών και η δράση της τελομεράσης (Vaiserman, and Krasnienkov, 2021)

Επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση - SIPS

Πέρα από την βράχυνση των τελομερών, κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα, εξωγενή ή ενδογενή. Αυτά μπορεί να είναι είτε η ακτινοβολία, διάφοροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, μέταλλα, οξειδωτικό στρες και στέρση θρεπτικών συστατικών (Kumari, Jat 2021). Τα ερεθίσματα αυτά, έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του DDR, και αν δεν επιλυθούν άμεσα οδηγούν σε γήρανση. Αυτό ονομάστηκε επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση (SIPS). Σε αυτό το είδος γήρανσης δεν εμπλέκονται τα τελομερή και αποτελούν την καθοριστική διαφορά με την αναδιπλασιαστική γήρανση, ενώ το κοινό σημείο είναι η ενεργοποίηση του DDR, και η ομοιότητα στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Kumari and Jat, 2021, Toussaint, Remacle, et al., 2002, Debacq-Chainiaux, BenAmeur, et al., 2016).

Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στα γηρασμένα κύτταρα συνοδεύεται από κάποια μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που αποτελούν απόρροιά της. Δεν είναι αναγκαίο να εμφανίζονται όλα τα χαρακτηριστικά μαζί, αλλά κάποια από αυτά, στα γηρασμένα κύτταρα. Οι μορφολογικές αλλαγές των γηρασμένων κυττάρων περιλαμβάνουν αυξημένο μέγεθος, πεπλατυσμένο σχήμα, καθώς και τροποποιήσεις

στη δομή και στις λειτουργικές ιδιότητες της πλασματικής και της πυρηνικής μεμβράνης. Στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συγκαταλέγεται και η έκκριση παραγόντων που έχουν σχέση με την γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype-SASP), όπως και η υψηλή δραστικότητα του ενζύμου της β γαλακτοσιδάσης (Hernandez-Segura, Nehme et al., 2018).

Μορφολογία και μέγεθος

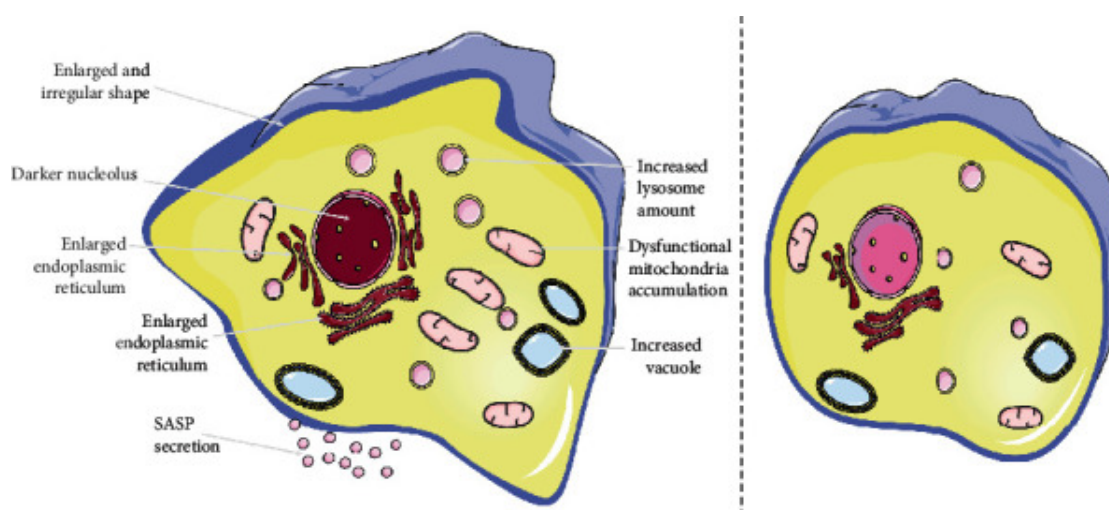
Ένα βασικό χαρακτηριστικό για τη διάκριση των γηρασμένων κυττάρων σε μία *in vitro* καλλιέργεια με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου, είναι το πεπλατυσμένο και ακανόνιστο σχήμα τους (Hernandez-Segura, Nehme et al., 2018). Η μορφολογική αυτή διαφοροποίηση έχει συσχετιστεί με την πρωτεΐνη σκαλωσιάς καβεολίνη-1, η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στην οργάνωση της μεμβράνης και στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού (Weng, Wang et al., 2022). Επιπλέον στη διαδικασία εμπλέκονται, οι FAK (Focal Adhesion Kinase), η ιντεγκρίνη β1 και οι GTPάσες Rho, Rac1 και Cdc42 (Herranz and Gil 2018). Παράλληλα, σημαντικό αντίκτυπο στη μορφολογία των κυττάρων έχει η απορρύθμιση του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) μέσω της απόκρισης σε μη ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR). Η ενεργοποίηση της UPR προκύπτει μέσω τριών πρωτεϊνών-αισθητήρων του στρες: PERK, ATF6α και IRE1α. Η διέγερση αυτών των παραγόντων οδηγεί σε διεύρυνση του ER και σε αυξημένη συσσώρευση κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Pluquet et al., 2014). Έχει αποδειχθεί ότι το μονοπάτι UPR, μέσω της ενεργοποίησης του ATF6α, ρυθμίζει αποκλειστικά τις αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων, χωρίς να επηρεάζει το μέγεθός τους· οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού των ενδιάμεσων νηματίων βιμεντίνης (Druelle et al., 2016). Αντίθετα, η αύξηση του μεγέθους των γηρασμένων κυττάρων οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση της κινάσης mTOR, η οποία διαδραματίζει καίριο ρόλο σε διεργασίες που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη (Blagosklonny, 2012).

Ανασύσταση Πλασματικής μεμβράνης

Η πλασματική μεμβράνη είναι ζωτικής σημασίας δομή για όλα τα κύτταρα βοηθώντας στην οριοθέτηση του κυττάρου, στην κυτταρική σηματοδότηση, επαφή καθώς και στην μεταφορά μορίων. Εξαιτίας της μεγαλειώδους σημασίας της, τροποποιήσεις σε αυτήν θα μπορούσαν να επηρεάσουν πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών (Ohno-Iwashita et al., 2010). Η πλασματική μεμβράνη παρουσιάζει χαρακτηριστικές εσοχές που συγκροτούνται από σύνθετη λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση. Από τις πιο αξιοσημείωτες είναι τα καβεόλια, λιπιδιακές μικροπεριοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια. Η δομή τους εξαρτάται κυρίως από την καβεολίνη-1, μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς που δεσμεύει τη χοληστερόλη και σταθεροποιεί τα καβεόλια (Cohen et al., 2004). Στα γηρασμένα κύτταρα, παρατηρούνται μεταβολές στα επίπεδα της καβεολίνης-1, γεγονός που αντανάκλα αλλοιώσεις στη μεμβρανική οργάνωση (Ohno-Iwashita et al., 2010). Επιπλέον, έχει αναφερθεί αύξηση της οξειδωμένης μορφής της βιμεντίνης, στοιχείο που συνδέεται με τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές του κυτταροσκελετού κατά τη γήρανση (Frescas et al., 2017).

Ανασύσταση πυρηνικής μεμβράνης και πυρήνα

Η σημαντικότερη αλλαγή που εντοπίστηκε στον πυρήνα των γηρασμένων κυττάρων είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, και πιο συγκεκριμένα οι εστίες ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με την γήρανση (SAHF). Η δομή αυτή της χρωματίνης είναι υψηλής οργάνωσης, εμποδίζει την ενεργή μεταγραφή, ενώ χαρακτηρίζεται από τους συνήθεις δείκτες ετεροχρωματίνης, την τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 στην ιστόνη 3 (H3K9me3) και την πρωτεΐνη HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Narita et al., 2003). Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στα γηρασμένα κύτταρα σχετίζεται κυρίως με τη μείωση της λαμίνης B1. Το πυρηνικό έλασμα αποτελεί δομή-ικρίωμα που στηρίζει την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη και καθοδηγεί την τοποθέτηση της χρωματίνης στον πυρήνα (Sadaie et al., 2013). Κατά την κυτταρική γήρανση, τα επίπεδα mRNA της λαμίνης B1 μειώνονται μέσω μηχανισμών που απαιτούν τη συμμετοχή των μονοπατιών p53 και pRB (Freund et al., 2012). Η απορρύθμιση αυτή οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της πυρηνικής μεμβράνης, αύξηση της διαπερατότητας του πυρηνικού φακέλου και εμφάνιση κυτταροπλασματικών θραυσμάτων χρωματίνης (CCF). Ο σχηματισμός των CCF εξαρτάται από τη λειτουργία των λυσοσωμάτων και την αυτοφαγία (Ivanov et al., 2013).



Εικόνα 4: Διαφορές στην μορφολογία γηρασμένων κυττάρων και φυσιολογικών (Zhang, Yuang et al.2020)

2.2 Μόρια Σηματοδότησης

Υπάρχουν δύο μονοπάτια που οδηγούν στην αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων στα θηλαστικά:

- Μονοπάτι p53/p21^{WAF1/CIP1}
- Μονοπάτι p16INK4a/Prb

Μονοπάτι p53/p21^{WAF1/CIP1}

Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό είναι οι p53 και p21^{WAF1/CIP1}. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός, ογκοκατασταλτικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Ενεργοποιείται ως απόκριση στις βλάβες

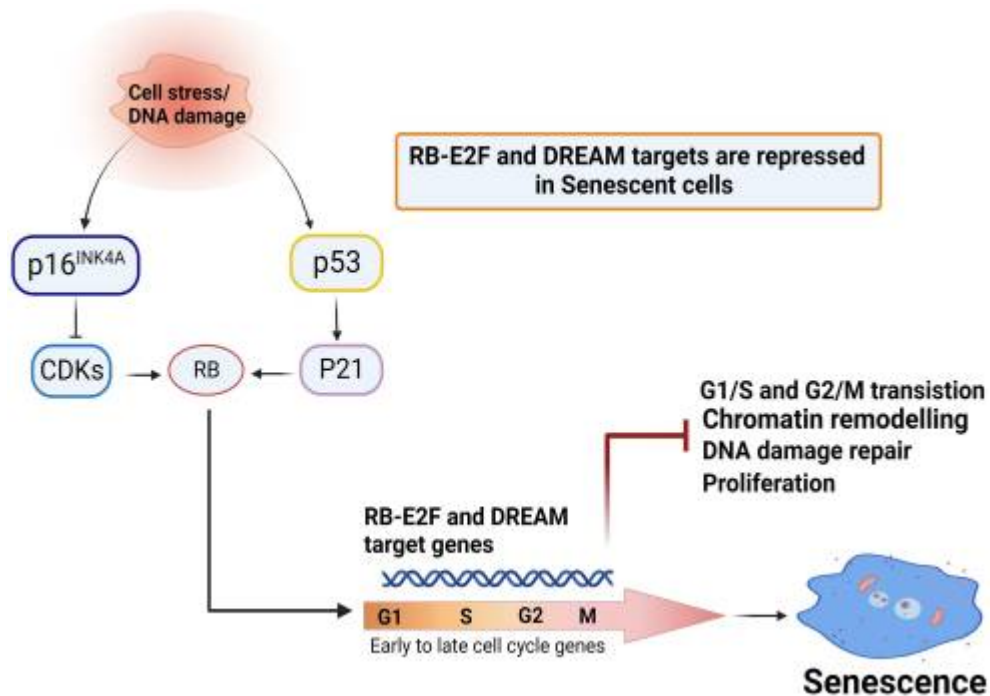
του DNA, και ρυθμίζει τις πρωτεΐνες που επάγουν την διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, τα επίπεδα της p53 είναι χαμηλά. Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης p53 με μία λιγάνη ουβικιτίνης, την MDM2. Η σύνδεση αυτών των δύο ενεργοποιεί την αποικοδόμηση της p53, με την μεσολάβηση του πρωτεασώματος (Nag, Qin et al., 2013). Ωστόσο, με την εμφάνιση βλαβών στο DNA, ενεργοποιούνται μηχανισμοί που αναστέλλουν την αποσταθεροποίηση της p53. Αυτό οφείλεται σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p53 που παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της με την Mdm2 και έτσι αποφεύγεται η αποικοδόμηση της (Michael, D., & Oren, M. 2003). Όταν δημιουργούνται βλάβες στο DNA, υπεύθυνες για την αναγνώρισή τους είναι διάφορες πρωτεΐνες-βιοαισθητήρες που έχουν σαν στόχο την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related kinase). Οι πρωτεΐνες-βιοαισθητήρες που ανιχνεύουν βλάβες στο DNA περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη RPA, η οποία δεσμεύει περιοχές μονόκλωνου DNA, και το σύμπλεγμα MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), το οποίο αναγνωρίζει δίκλωνες ρήξεις. Οι κινάσες ATM και ATR ενεργοποιούνται στο σημείο της βλάβης και φωσφορυλιώνουν την ιστόνη H2AX στη σερίνη 139, δημιουργώντας τη μορφή γH2AX. Η γH2AX δρα ως σηματοδότης της βλάβης, διευκολύνοντας την περαιτέρω πρόσδεση και συσσώρευση μορίων ATM/ATR και άλλων παραγόντων αποκατάστασης. Στη συνέχεια, οι κινάσες ATM και ATR φωσφορυλιώνουν τις CHK1 και CHK2, οι οποίες με τη σειρά τους τροποποιούν την p53, αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή της με την MDM2 (Kumari and Jat, 2021). Ένας άμεσος μεταγραφικός στόχος της ενεργοποιημένης p53 είναι η p21WAF1/CIP1, η οποία ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CDKIs). Η p21 αναστέλλει τα σύμπλοκα CDK1/2-κυκλίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας έτσι σε παύση του κυτταρικού κύκλου (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Kumari and Jat, 2021).

Μονοπάτι p16^{INK4a}/pRB

Η πρωτεΐνη p16INK4a αποτελεί ένα από τα τρία κύρια προϊόντα του γενετικού τόπου INK4/ARF και κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2A. Σε αντίθεση με την p21WAF1/CIP1, η οποία ενεργοποιείται στα αρχικά στάδια της γήρανσης και είναι απαραίτητη για την επαγωγή της, η p16INK4a ενεργοποιείται στα επόμενα στάδια και συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής γήρανσης (Kulaberoglu, Gundogdu and Hergovich, 2016). Όπως η p21, η p16INK4a δρα ως αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), συγκεκριμένα των CDK4 και CDK6. Η δέσμευσή της οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της pRB και στην παρεμπόδιση του σχηματισμού συμπλόκων με την κυκλίνη D (Serra and Chetty, 2018). Η αποφωσφορυλίωση της pRB εμποδίζει τη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων E2F, προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S, καθώς οι E2F είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των γονιδίων αυτού του σταδίου (Poron and Petron, 2014; Dyson, 1998).

Τα υπόλοιπα προϊόντα του γενετικού τόπου INK4/ARF, τα p12 και p16-γ, λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο ως αναστολείς συμπλόκων CDKs. Το τελευταίο προϊόν του CDKN2A, η p14ARF, έχει διαφορετική λειτουργία· αλληλεπιδρά με τον MDM2, ο οποίος προάγει την αποικοδόμηση της p53, αναστέλλοντας έτσι την αποικοδόμησή της. Η p14ARF

αποτελεί κρίκο μεταξύ των μονοπατιών p53/p21WAF1/CIP1 και p16INK4a/pRB (Delmonico, Moreira, et al., 2015).



Εικόνα 5 : Τα δυο μονοπάτια που εμπλέκονται στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (Kandhaya-Pillai, Renuka et al.2023)

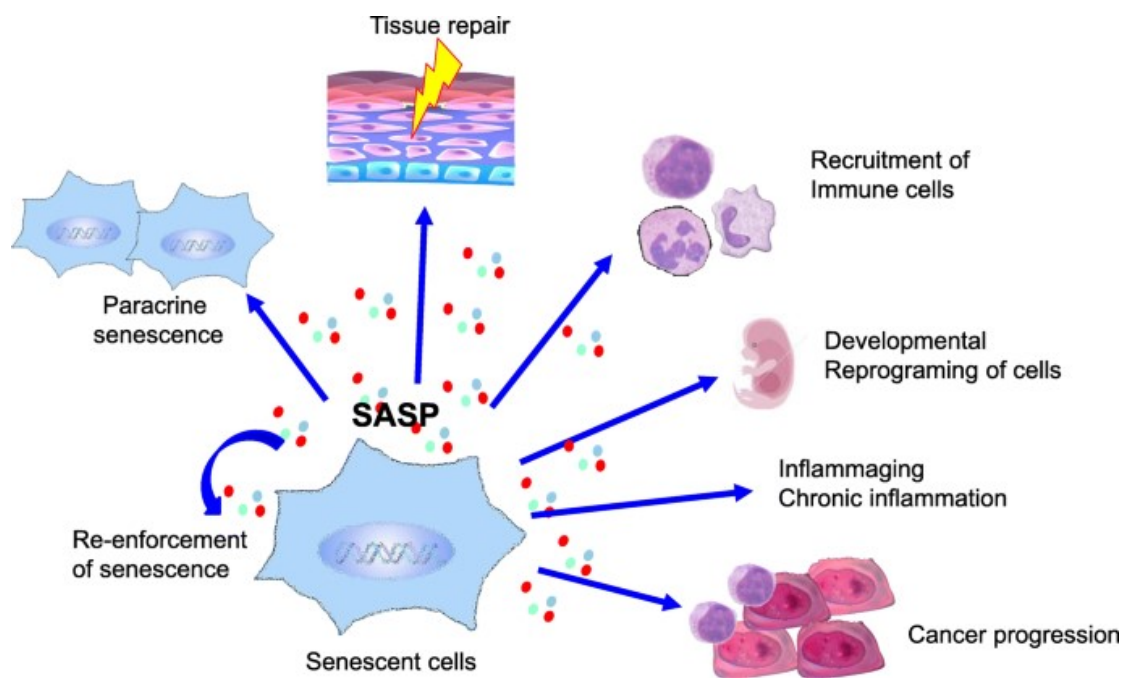
2.3 Εκκριτικός Φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP)

Τα κύτταρα που έχουν εισέλθει στη φάση της κυτταρικής γήρανσης παραμένουν μεταβολικά ενεργά παρά την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, εκκρίνοντας πλήθος παραγόντων που συνθέτουν τον εκκριτικό φαινότυπο σχετιζόμενο με τη γήρανση (SASP). Ο SASP περιλαμβάνει διαλυτά μόρια όπως φλεγμονώδεις κυτοκίνες, χημειοκίνες, ρυθμιστές ανάπτυξης και μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας μήτρας (MMPs). Η ενεργοποίηση του SASP ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κΒ και C/EBPβ, ενώ τα παραγόμενα μόρια δημιουργούν θετική ανατροφοδότηση ενισχύοντας την παραγωγή αυτών των παραγόντων (Chien, Scudiero, et al., 2011).

Τα κύρια μόρια του SASP περιλαμβάνουν αρχικά τις ιντερλευκίνες IL-6 και IL-1, οι οποίες συνδέονται με υποδοχείς σε γειτονικά κύτταρα και επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Χημειοκίνες όπως CXCL-8, GROα, GROβ, καθώς και σχεδόν όλα τα μέλη της οικογένειας IGFBPs, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κατά τη γήρανση. Ο SASP επάγεται μόνο όταν έχουν προκληθεί βλάβες στο DNA, όχι απλά λόγω αναστολής του κυτταρικού κύκλου (Corré et al., 2010).

Τα μόρια του SASP μπορούν να επάγουν γήρανση παρακρινώς, μεταδίδοντας το φαινότυπο από ένα γηρασμένο κύτταρο σε γειτονικά του, με σημαντικό ρόλο να φαίνεται να κατέχει ο TGFβ (Acosta, Banito, et al., 2013). Αντίθετα, οι IL-6, IL-8 και GROα δρουν αυτοκρινώς, ενισχύοντας το μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες του DNA και αναστέλλοντας τις κινάσες MEK-ERK (Kuilman et al., 2008).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του SASP είναι η επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης μέσω της έκκρισης κυτοκινών και ιντερλευκινών, που προσελκύουν κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως μακροφάγα, κύτταρα NK και ουδετερόφιλα (McHugh and Gil, 2018). Επιπλέον, ο SASP συμμετέχει στην επούλωση ιστών μέσω του αυξητικού παράγοντα PDGF-AA, που προέρχεται από τα αιμοπετάλια. Τέλος, ο SASP φαίνεται να έχει διττό ρόλο στην καρκινογένεση: αρχικά ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση συμβάλλοντας στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων και στη διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης (T.-W. Kang et al., 2011b), ενώ παράλληλα, μέσω παραγόντων όπως το VEGF, μπορεί να προάγει την αγγειογένεση και ενδεχομένως την καρκινογένεση (Corré et al., 2006).



Εικόνα 6: Λειτουργίες του εκκριτικού φαινοτύπου σχετιζόμενου με την γήρανση (Ohtani, Naoko, 2022)

2.4 Δείκτες Γήρανσης

Ο πιο διαδεδομένος και ανιχνεύσιμος δείκτης για τον εντοπισμό της κυτταρικής γήρανσης είναι η ανίχνευση της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης και είναι από τους πρώτους που τέθηκαν σε χρήση. Κατά την κυτταρική γήρανση παρατηρείται αύξηση των λυσοσωμικών ενζύμων και κατ' επέκταση του λυσοσωμικού φορτίου. Το ένζυμο αυτό λειτουργεί φυσιολογικά σε Ph 4-4,5, όμως κατά τη γήρανση ανιχνεύεται σε Ph 6 (Lee, Han, et al., 2006). Για να ανιχνευθεί απαιτείται η διάσπαση του τεχνητού χρωμογόνου 5-βρόμο-4-χλώρο-3-ινδολύλιο-β-D-γαλακτοσιδάση (X-gal). Η διάσπαση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα ένα μπλε χρώμα το οποίο είναι ανιχνεύσιμο (Dimri, Lee, et al., 1995).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η κυτταρική γήρανση επιτυγχάνεται μέσω δύο διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα μονοπάτια αυτά είναι τα $p53/p21^{WAF1/CIP1}$ και $p16INK4a/Prb$, με την δράση κυρίως των μορίων $p21^{WAF1/CIP1}$ και $p16INK4a$ που αναστέλλουν την δράση κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Έτσι βασικός δείκτης για να

επαληθεύσουμε την επαγωγή κυτταρικής γήρανσης είναι η μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων τους.

3. Κυτταρικός Κύκλος

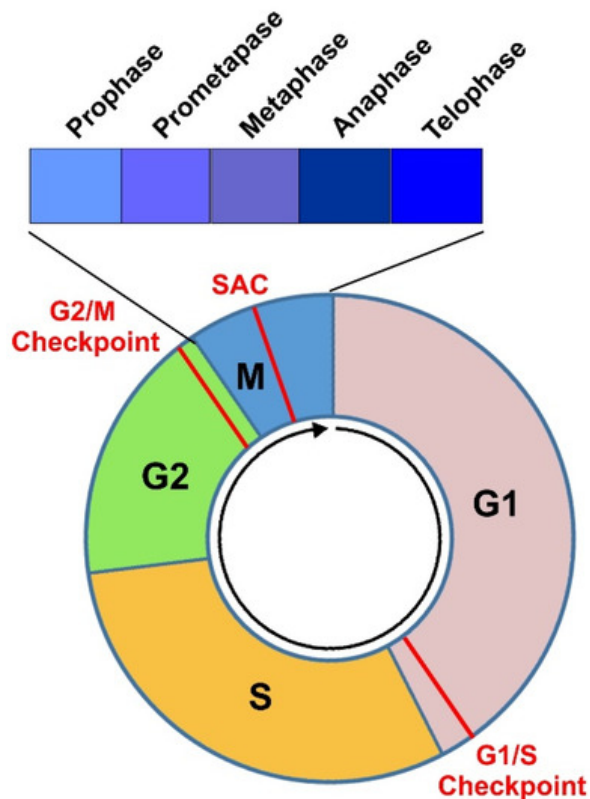
3.1 Κυτταρικός Κύκλος και Φάσεις

Κυτταρικός κύκλος ονομάζεται η σειρά των γεγονότων που ακολουθούν το ένα το άλλο μέχρι ένα κύτταρο να διπλασιάσει το γενετικό του υλικό και να διαιρεθεί σε δύο νέα θυγατρικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή χωρίζεται σε δύο διακριτές φάσεις, στην Φάση M (Μίτωση) και την μεσόφαση, που με την σειρά τους χωρίζονται σε επιμέρους φάσεις (Schäfer 1998). Κατά τη φάση M (Μίτωση) ο πυρήνας διαιρείται, και κατά την κυτταροκίνηση, και το κυτταρόπλασμα δίνοντας τα νέα θυγατρικά κύτταρα. Ανάμεσα σε δύο φάσεις M, υπάρχει η μεσόφαση. Η μεσόφαση στην συνέχεια χωρίζεται σε 3 διακριτές φάσεις, την G1, την S και την G2 (Gap phase 1, DNA synthesis, Gap phase 2) (Wang, 2021).

Η φάση G1 βρίσκεται μεταξύ των φάσεων M και S. Στα στάδιο αυτό το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος και κάνει όλες τις απαραίτητες προετοιμασίες για να προχωρήσει στην αντιγραφή του γενετικού του υλικού και είναι ιδιαίτερα σημαντική. Παρατηρείται εκτός από κυτταρική αύξηση, έντονη μεταβολική δραστηριότητα καθώς και επιδιόρθωση. Ο χρόνος που θα διαρκέσει δεν είναι σταθερός, αλλά εξαρτάται από τα εξωκυτταρικά σήματα που θα δεχτεί το κύτταρο. Τα κύτταρα όταν οι συνθήκες επιβίωσης τους δεν είναι ιδανικές, καθυστερούν την είσοδο τους στην φάση S (Wang 2022). Ακόμη, είναι δυνατό, αντί να προχωρήσουν προς την κατεύθυνση της διαίρεσης, να εισέλθουν σε μία κατάσταση ηρεμίας, γνωστή και ως G0. (Liu et al., 2019). Στην φάση αυτή, τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά, μπορούν να παραμείνουν εκεί για μικρά ή μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο, ανάλογα τους εξωτερικούς παράγοντες (Reddy, 1994). Ένα από τα πιο σημαντικά γεγονότα της φάσης G1 ονομάζεται «αδειοδότηση σημείου εκκίνησης αντιγραφής» (origin licensing). Κατά το μοριακό συμβάν αυτό, «φορτώνονται» χιλιάδες σύμπλοκα συντήρησης (MCM) στο DNA, ώστε να τις προετοιμάσει και να ξεκινήσει η αντιγραφή του γενετικού υλικού (Fleifel and Cook, 2023). Εάν οι συνθήκες που πραγματοποιείται η διαίρεση είναι ευνοϊκές, γίνεται η μετάβαση από την φάση G1 στην S.

Στην φάση S, δηλαδή στην φάση όπου γίνεται η σύνθεση του DNA, γίνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού που αποτελεί και το κύριο συμβάν της φάσης αυτής. Οι αδειοδοτημένες θέσεις από την G1 ενεργοποιούνται, και τα MCM μετατρέπονται σε ενεργές DNA ελικάσες για να ξεκινήσει η αντιγραφή του DNA (Mei and Cook, 2022).

Στην φάση G2 ξεκινάει η προετοιμασία του κυττάρου για την επερχόμενη μιτωτική διαίρεση στην φάση M. Τελειώνει ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού, συνεχίζει η πρωτεϊνοσύνθεση και πραγματοποιείται διάσπαση του συμπλέγματος Golgi. Το κύτταρο επιδιορθώνει τυχόν βλάβες που έχουν προκύψει κατά την αντιγραφή του DNA και παρατηρούνται αλλαγές στη δομή και την οργάνωση του πυρήνα (Ren, Tang, et al., 2018). Μετά ακολουθεί η μίτωση που θα αναλυθεί παρακάτω.



Εικόνα 7 : Φάσεις του κυτταρικού κύκλου και ρύθμιση (Wang, 2021)

3.2 Χαρακτηριστικά Μίτωσης

Η μίτωση με την σειρά της χωρίζεται σε πέντε επιμέρους φάσεις, την πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και την τελόφαση. Αρχικά, στην πρόφαση συμπυκνώνεται οι χρωματίνες, αποδιοργανώνεται η πυρηνική μεμβράνη και απομακρύνονται τα κεντροσωμάτια με στόχο την δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου. Η πρόφαση σταματά την αποσυναρμολόγηση του περιβλήματος του πυρήνα. Σειρά έχει η προμετάφαση, κατά την οποία τα χρωμοσώματα είναι πλέον ελεύθερα για να συνδεθούν με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Τα χρωμοσώματα αρχίζουν να κινούνται προς το κέντρο του κυττάρου και ευθυγραμμίζονται στον ισημερινό της ατράκτου. Αυτό προετοιμάζει το κύτταρο για να εισέλθει στην μετάφαση. Στην μετάφαση τα χρωμοσώματα έχουν ευθυγραμμιστεί πλήρως στην πλάκα της μετάφασης που σχηματίστηκε. Για να παραμείνουν στις θέσεις τους, κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη κινητήριων πρωτεϊνών καθώς και αυξομειώσεις του μήκους που έχουν οι μικροσωληνίσκοι. Μόλις όλα είναι σωστά ευθυγραμμισμένα, η συνοχή μεταξύ των αδελφών χρωματίδων διασπάται, επιτρέποντάς τους να απομακρυνθούν και να κινηθούν προς αντίθετους πόλους, γεγονός που σηματοδοτεί την είσοδο του κυττάρου στην ανάφαση. Σε αυτό το στάδιο, κάθε χρωματίδα λειτουργεί πλέον ως ανεξάρτητο χρωμόσωμα. Ο διαχωρισμός των χρωματίδων επιτυγχάνεται λόγω της απομάκρυνσης των κοεζινών, πρωτεϊνών που συνδέουν και συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες κατά τη μετάφαση. Το τελευταίο στάδιο της μίτωσης, είναι η τελόφαση. Στο στάδιο αυτό τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και δημιουργείται πάλι πυρηνικό περίβλημα. Έτσι ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των δύο πυρήνων. Η φάση M θα ολοκληρωθεί με το

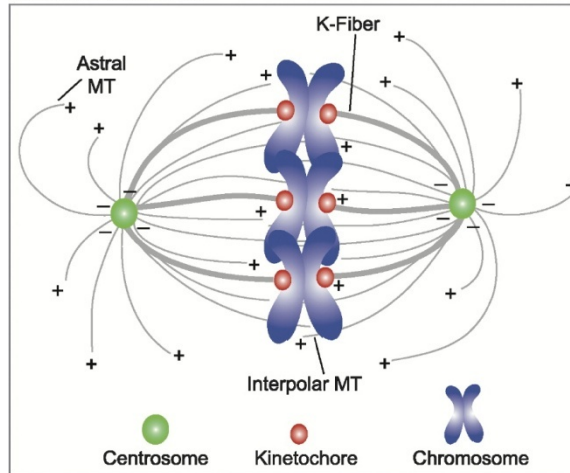
στάδιο της κυτταροκίνησης. Εκεί διαχωρίζεται το κυτταρόπλασμα του κυττάρου για να προκύψουν τα δύο νέα θυγατρικά κύτταρα. Για την ολοκλήρωση της φάσης, πρέπει να σχηματιστεί ο συσταλτικός δακτύλιος αποτελούμενος από νημάτια ακτίνης και μυσίνης. (Wang, 2021).

3.3 Δομή και λειτουργία μιτωτικής ατράκτου

Η μιτωτική άτρακτος είναι μία διάταξη του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων και η σημασία της είναι καίρια για την ζωή. Είναι υπεύθυνη για την διασφάλιση της ίσης κατανομής των χρωμοσωμάτων στα δύο νέα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση. Συμμετέχει στην ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων προφυλάσσοντας από χρωμοσωμική αστάθεια και ανευπλοειδία (Elting et al., 2018). Ξεκινάει να δημιουργείται κατά την πρόφαση της μίτωσης και συμβάλλει στην ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων. Η βασική δομή για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, είναι οι μικροσωληνίσκοι καθώς και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτούς (MAPs). Αυτοί, είναι διμερή α και β τουμπουλίνης που ενώνονται διαδοχικά σχηματίζοντας πολωμένα νημάτια. Οι μικροσωληνίσκοι, είναι ικανοί να αλλάζουν διαμόρφωση ξαφνικά, φαινόμενο που ονομάζεται «δυναμική αστάθεια». Η σταθερότητα τους εξαρτάται από το θετικό άκρο που έχει GTP-τουμπουλίνη. Αν το GTP υδρολυθεί σε GDP ο μικροσωληνίσκος θα μεταβεί σε μία κατάσταση αποπολυμερισμού. Αντίθετα, αν ανακτήσει το GTP «διασώζεται» και συνεχίζει την ανάπτυξη του (Helmke, Heald, Wilbur, 2013). Άρα, οι μικροσωληνίσκοι είναι αντιπαράλληλα διατεταγμένοι με τα θετικά άκρα να βρίσκονται προ το εσωτερικό και τα αρνητικά προς το εξωτερικό. Ο διπολικός άξονας που σχηματίζουν οι μικροσωληνίσκοι εκφύεται από τα κεντροσώματα.

Υπάρχουν τρεις διακριτοί πληθυσμοί μικροσωληνίσκων κατά την κατασκευή της μιτωτικής ατράκτου. Ο πρώτος πληθυσμός είναι οι κινετοχωρικοί μικροσωληνίσκοι ή ίνες K. Αυτοί συνδέονται με τις αδελφές χρωματίδες στον κινετοχώρο (μια πρωτεϊνική περιοχή στο εσωτερικό του κεντρομερούς που προσδένονται οι μικροσωληνίσκοι) και σχηματίζουν σταθερές δομές με στόχο της ευθυγράμμιση και τον τελικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Ο δεύτερος πληθυσμός είναι οι μεσοπολικοί μικροσωληνίσκοι που αλληλοεπικαλύπτονται στο κέντρο της μιτωτικής ατράκτου και σταθεροποιούν την δομή. Ο τελευταίος πληθυσμός, είναι οι αστρικοί μικροσωληνίσκοι που εκτείνονται ακτινωτά από τα κεντροσώματα. Δεν συνδέονται με τα χρωμοσώματα, αλλά κατέχουν σπουδαίο ρόλο στον προσανατολισμό και την σωστή τοποθέτηση της ατράκτου εντός του κυττάρου (Kline Smith and Walczack 2004).

MITOTIC SPINDLE



Εικόνα 8 : Τα βασικά συστατικά της μιτωτικής ατράκτου (Kline Smith and Walczack 2004)

3.4 Σημεία Ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Όλες οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου που περιγράφηκαν παραπάνω, πρέπει να υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο, ώστε να διασφαλιστεί η δημιουργία δύο πανομοιότυπων κυττάρων και να μην συσσωρευτούν και διαδοθούν λάθη κατά την διαδικασία της αντιγραφής. Άρα, η διαίρεση των κυττάρων περιλαμβάνει και ειδικά σημεία, γνωστά και ως σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Υπάρχουν βασικά 3 διαφορετικά σημεία ελέγχου, G1/S, G2/M και στην φάση M το spindle checkpoint.

Τα μόρια που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό κύκλο είναι οι κυκλίνες και οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs). Οι τελευταίες είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης που δεσμεύονται στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, τις κυκλίνες. Κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στην γονιδιακή έκφραση. Αυτές οι αυξομειώσεις, που λαμβάνουν χώρα με περιοδικό τρόπο, είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση των CDKs, συμβάλλοντας στην είσοδο, εξέλιξη και ολοκλήρωση του κύκλου με ακριβή μεταπίδηση από την μία φάση στην άλλη (Wang, 2021, Bertoli, Skotheim and de Bruijn 2015). Η δράση που έχουν οι CDKs στην φάση G1, είναι υπεύθυνη ώστε να αρχίσει η αντιγραφή του γενετικού υλικού αλλά και η δέσμευση στην είσοδο του κύκλου. Στην G2 οι CDKs είναι απαραίτητες για να προετοιμάσουν το κύτταρο για τον επερχόμενο διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων.

Για κάθε διαφορετικό βήμα του κυτταρικού κύκλου, απαιτείται και ένα διαφορετικό σύμπλοκο κυκλίνης-CDK. Στην φάση G1, δημιουργείται το G1-CDK σύμπλοκο που προωθεί το κύτταρο στην φάση S. Αρχικά το σύμπλοκο CyclinE-CDK2 είναι υπεύθυνο για την μεταβίβαση στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Όταν εντοπισθεί βλάβη στο DNA ενεργοποιείται μια γρήγορη απόκριση από την κινάση ATM, που συμμετέχει μέσω φωσφορυλίωσης των p53 και Chk2. Όταν υπάρχει βλάβη, ενεργοποιείται η ATM, φωσφορυλιώνει την Chk2 που με την σειρά της φωσφορυλιώνει την p53. Έτσι, η p53 θα λειτουργήσει σαν μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας την σύνθεση της p21 που είναι αναστολέας των CDK. Η p21 δεσμεύεται στο CDK2 απενεργοποιεί το σύμπλοκο CyclinE-CDK2 και δεν μπορεί το κύτταρο να προχωρήσει στην φάση S (Matsuoka, Ballif, et al., 2007, Hyun and Jang, 2015).

Το σημείο ελέγχου που ακολουθεί, αφορά την μεταβίβαση από την φάση G2 στην φάση M. Για την αλλαγή αυτή απαιτείται το σύμπλοκο M-Cdk (CyclinB-Cdk1) το οποίο θα φωσφορυλιωθεί από την κινάση Wee1 στην τυροσίνη 15 (Y15) της CDK1. Η φωσφορυλίωση αυτή είναι ανασταλτική και απενεργοποιήσει το σύμπλοκο, καθιστώντας την μεταβίβαση στην μίτωση. Η επανεργοποίηση του συμπλόκου έρχεται από τις φωσφατάσες CDC25, που εξουδετερώνουν την δράση του Wee1 και αποφωσφορυλιώνουν το σύμπλοκο.

Το τελευταίο σημείο ελέγχου είναι το SAC που θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο.

3.5 SAC

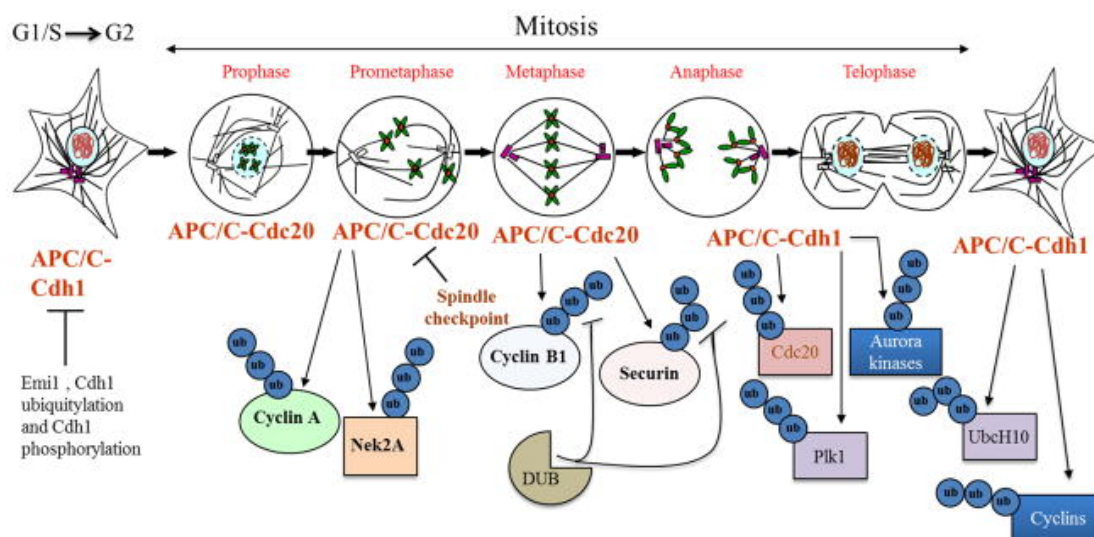
Το τελευταίο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι το Σημείο Ελέγχου Συναρμολόγησης της Μιτωτικής Ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint – SAC), το οποίο ρυθμίζει την έξοδο του κυττάρου από τη μίτωση. Το SAC διασφαλίζει τη σωστή σύνδεση των κινητοχώρων (kinetochores) με τους μικροσωληνίσκους από τους αντίθετους πόλους της ατράκτου και τον ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Όταν ένας κινητοχώρος παραμένει ασύνδετος, το SAC ανιχνεύει το σήμα και σχηματίζεται το Μιτωτικό Σύμπλεγμα Σημείου Ελέγχου (Mitotic Checkpoint Complex – MCC) μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Matthews, Bertoli, and de Bruin, 2022).

Οι κινητοχώροι είναι ειδικές δομές πάνω στα χρωμοσώματα που λειτουργούν ως σημεία πρόσδεσης με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Αποτελούνται από εσωτερικό τμήμα, που συνδέεται με το κεντρομερίδιο, και εξωτερικό τμήμα, το οποίο ελέγχει την ορθή σύνδεση των μικροσωληνίσκων και ενεργοποιεί το SAC. Η Aurora B, μία πρωτεϊνική κινάση μέλος του συμπλέγματος επιβατών χρωμοσωμάτων (Chromosomal Passenger Complex – CPC), παίζει καίριο ρόλο στη διόρθωση λανθασμένων συνδέσεων φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες τόσο του εσωτερικού όσο και του εξωτερικού τμήματος των κινητοχώρων. Όταν η σύνδεση είναι λανθασμένη, η Aurora B αυξάνει τη φωσφορυλίωση για αποσταθεροποίηση και επαναδιόρθωση· όταν η σύνδεση είναι σωστή, η φωσφορυλίωση μειώνεται και η σύνδεση σταθεροποιείται (Welburn, Vleugel et al., 2010).

Ένα ακόμη κρίσιμο μόριο για το SAC είναι η Mps1, η οποία στρατολογείται από την Aurora B. Η Mps1 συμμετέχει στον διπλασιασμό των πολικών σωμάτων και αναστέλλει τη μετάβαση της μίτωσης σε περίπτωση λανθασμένων συνδέσεων (Stucke, Silljé et al., 2002). Στον κινητοχώρο, η Mps1 φωσφορυλιώνει το Knl1 σε θέσεις MELT (Met-Glu-Leu-Thr), δημιουργώντας σημεία πρόσδεσης για άλλα κρίσιμα μόρια του SAC, όπως τα σύμπλοκα BUB1 και BUB3. Η φωσφορυλίωση του BUB1 οδηγεί στην πρόσδεση των Mad2, Mad3 και Cdc20, σχηματίζοντας το MCC. Το Cdc20 λειτουργεί ως συνεργαζόμενο μόριο του συμπλέγματος APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome). Το MCC εμποδίζει το APC/C να ουβικιτινιλιώσει τα υποστρώματά του, παρεμποδίζοντας την πρόωρη μετάβαση στην ανάφαση (Musacchio, 2015; Yamaguchi, VanderLinden et al., 2016).

Το APC/C είναι μια ουβικιτινική E3 λιγάση που παραμένει ενεργή καθ' όλη τη διάρκεια της μίτωσης και ρυθμίζει τη μεταφορά από τη μετάφαση στην ανάφαση μέσω χρονικά

ελεγχόμενης ουβικιτινίωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, εξασφαλίζοντας την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 9 :Η ουβικιτιλίωση από το APC/C σε συγκεκριμένες φάσεις, συμβάλλοντας στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Sivakumar, Gprbsky, 2015)

Για να προχωρήσει ο κύκλος στην ανάφαση απαιτείται η αποικοδόμηση των βασικών μορίων, όπως η κυκλίνη B1 και η σεκιουρίνη. Το σύμπλεγμα APC/C ενεργοποιείται από την Cdc20, και έτσι πυροδοτείται η ουβικιτινίωση των άλλων 2 ενεργοποιώντας την σεπαράση (Cirilli, Young, et al., 2024). Η σεπαράση είναι μία κυστεϊνική πρωτεάση, με σκοπό την διάσπαση της κοχεσίνης που είναι υπεύθυνη για την σύνδεση των αδελφών χρωματίδων (Holland, Taylor, 2006). Αυτό συμβαίνει μόνο όταν τα χρωμοσώματα είναι προσκολλημένα με σωστό τρόπο στην άτρακτο. Όταν οι κινητοχώροι είναι μη προσδεδμεμένοι το MCC, αναστέλλει τη δράση του APC/C με αποτέλεσμα την διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην μετάφαση (Shepperd, Meadows, et al., 2012). Άρα συνολικά, η είσοδος στην ανάφαση εξαρτάται από την ενεργοποίηση της σεπαράσης που συμβαίνει λόγω απενεργοποίησης του SAC και ενεργοποίησης του APC/C.

3.6 Συνέπειες δυσλειτουργίας του

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η σωστή κατανομή των χρωμοσωμάτων στα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι κρίσιμη. Το Σημείο Ελέγχου Διαμόρφωσης της Μιτωτικής Ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint – SAC) επιβλέπει αν τα χρωμοσώματα έχουν συνδεθεί ορθά με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Σε περίπτωση μη ορθής σύνδεσης, η διαδικασία αναστέλλεται, εμποδίζοντας την είσοδο στην ανάφαση μέσω αναστολής της πρωτεόλυσης της κυκλίνης B. Έτσι, το SAC εξασφαλίζει την ακριβή κατανομή του γενετικού υλικού, και η δυσλειτουργία του μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες.

Οποιαδήποτε ανωμαλία στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο SAC οδηγεί σε ανευπλοειδία, δηλαδή σε αλλοίωση του ακριβούς αριθμού χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα. Κάθε κύτταρο πρέπει να λαμβάνει ακριβώς ένα αντίγραφο κάθε χρωμοσώματος, και η αδυναμία του SAC να διασφαλίσει αυτό μπορεί να προκαλέσει

χρωμοσωμική αστάθεια, η οποία αποτελεί βασικό μηχανισμό καρκινογένεσης (Teixeira, Silva et al., 2014).

Το SAC ελέγχει τη σωστή αμφιτελική προσκόλληση, δηλαδή τη σύνδεση κάθε ζεύγους αδελφών χρωματιδίων με μικροσωληνίσκους και από τους δύο πόλους. Ωστόσο, μπορεί να προκύψουν σφάλματα όπως: συνθετική προσκόλληση (και οι δύο αδελφές χρωματίδες συνδέονται με τον ίδιο πόλο), μεροτελική προσκόλληση (ένας κινητοχώρος συνδέεται με τους δύο πόλους ταυτόχρονα) ή μονοτελική προσκόλληση (μόνο μία χρωματίδα συνδέεται). Το SAC ανιχνεύει αποτελεσματικά μόνο τους κινητοχώρους που δεν έχουν καμία σύνδεση, ενώ τα υπόλοιπα σφάλματα μπορεί να παραμείνουν, οδηγώντας σε ανευπλοειδία και αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης (Pun, North, 2025). Παράλληλα, η δυσλειτουργία του SAC μπορεί να ενεργοποιήσει και την απόπτωση. Η αδυναμία ρύθμισης του αναστολέα της ανάφασης Pds1, που ελέγχει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Mcd1, οδηγεί στην ενεργοποίηση του κυτταρικού θανάτου μέσω του καρβοξυτελικού θραύσματος της Mcd1 (Ren, Liou et al., 2012). Ορισμένα κύτταρα, όμως, μπορούν να αποφύγουν την απόπτωση μέσω του φαινομένου της «μιτωτικής ολίσθησης», κατά την οποία εξέλθουν της μίτωσης σε ενδιάμεση φάση με λανθασμένο αριθμό χρωμοσωμάτων. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει λόγω προοδευτικής αποικοδόμησης της κυκλίνης B και οδηγεί σε ανευπλοειδία και αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης (Zeng, Xu et al., 2019).

3.7 Σχέση με γήρανση

Η κυτταρική γήρανση λειτουργεί ως μηχανισμός προστασίας έναντι της καρκινογένεσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μειωμένη λειτουργικότητα των μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, και ειδικότερα του Spindle Assembly Checkpoint (SAC), οδηγεί σε ανωμαλίες στη σωστή κατανομή των χρωμοσωμάτων, προκαλώντας χρωμοσωμική αστάθεια και ανευπλοειδία. Παράλληλα, ορισμένα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του SAC συνδέονται με την πρόωρη κυτταρική γήρανση.

Σημαντικά σε αυτό το πλαίσιο είναι τα γονίδια Bub3 και Rae1, τα οποία συμμετέχουν στο SAC και εξασφαλίζουν τον ορθό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Η απώλεια ενός μόνο αντιγράφου οποιουδήποτε από αυτά τα γονίδια δεν προκαλεί πρόωρη γήρανση ή καρκινογένεση. Ωστόσο, η απλοανεπάρκεια και των δύο οδηγεί σε χρωμοσωμικά λάθη και προκαλεί πρόωρη κυτταρική γήρανση, όπως έχει παρατηρηθεί σε πειράματα σε ποντίκια, συνοδευόμενη από συσσώρευση δεικτών γήρανσης όπως p16, p21, 53BP1 και αυξημένη δραστηριότητα SA-β-gal.

Η πρωτεΐνη p53 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Η δυσλειτουργία του SAC προκαλεί απορρύθμιση του συμπλέγματος APC/C και πρόωρη ενεργοποίησή του. Ένα από τα υποστρώματα του APC/C είναι η σεκουρίνη, η οποία δρα και ως αρνητικός ρυθμιστής της p53. Επομένως, η μείωση της σεκουρίνης οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της p53, η οποία ενεργοποιεί την p21, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου και ένταξη των κυττάρων σε πρόωρη γήρανση (Dai, Wang, 2006).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη Mad2 αποτελεί κρίσιμο μοριακό συνδετικό κρίκο του SAC, καθυστερώντας τη μετάβαση στην ανάφαση μέσω αναστολής του APC/C έως ότου τα χρωμοσώματα ευθυγραμμιστούν σωστά. Η δυσλειτουργία της Mad2 συνδέεται με

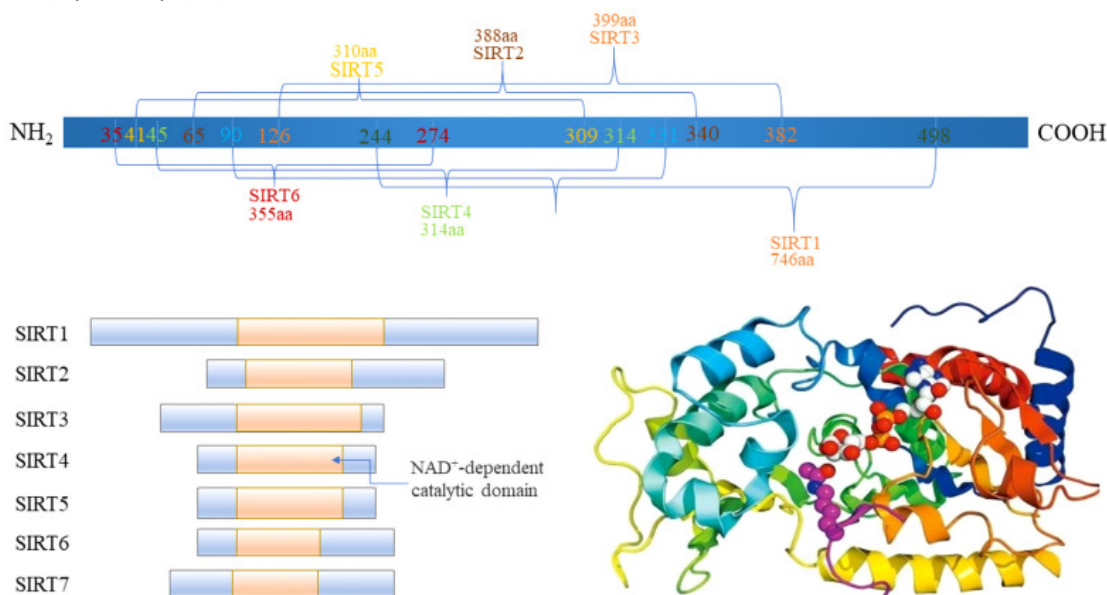
καρκινογένεση και, σε γηρασμένα κύτταρα, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης (Prencipe, Fitzpatrick et al., 2009). Παράλληλα, η μείωση της Mad2 σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα IL-6 και IL-8, παραγόντων του SASP (Corré, Patil et al., 2008).

Η είσοδος των κυττάρων σε πρόωρη γήρανση ενισχύεται μέσω της p53. Η μείωση της Mad2 δημιουργεί κυτταρικό στρες που ενεργοποιεί την p53, η οποία αυξάνει την έκφραση της p21 και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο. Παράλληλα, ενεργοποιείται η p14ARF, η οποία σταθεροποιεί περαιτέρω την p53, ενισχύοντας την πρόωρη γήρανση (Lentini, Barra et al., 2012).

4. Σιρτουΐνη

4.1 Λειτουργία

Η πρωτεϊνική οικογένεια των σιρτουϊνών ανακαλύφθηκε πριν σχεδόν 40 χρόνια στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ως η πρωτεΐνη Sir2 (silent information regulator 2). Οι σιρτουΐνες είναι συντηρημένες πρωτεΐνες και συμπεριλαμβάνονται στις ιστονικές δεακετυλάσες κατηγορίας III (HDACs) (Wu, Zhang, et al., 2022). Έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα οργανισμών από βακτήρια μέχρι ανθρώπους και είναι εξαρτώμενες από το νικοτινοαδενινοδινουκλεοτίδιο (NAD) και ADP ριβοζυλοτρανσφεράσες. Στα θηλαστικά πιο συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί 7 ισομορφές (SIRT1-SIRT7), που είναι υπεύθυνες για πληθώρα βιολογικών διεργασιών, με αυτές να καταλαμβάνουν διακριτές θέσεις στα χρωμοσώματα αλλά και να έχουν διαφορετικά μήκη.

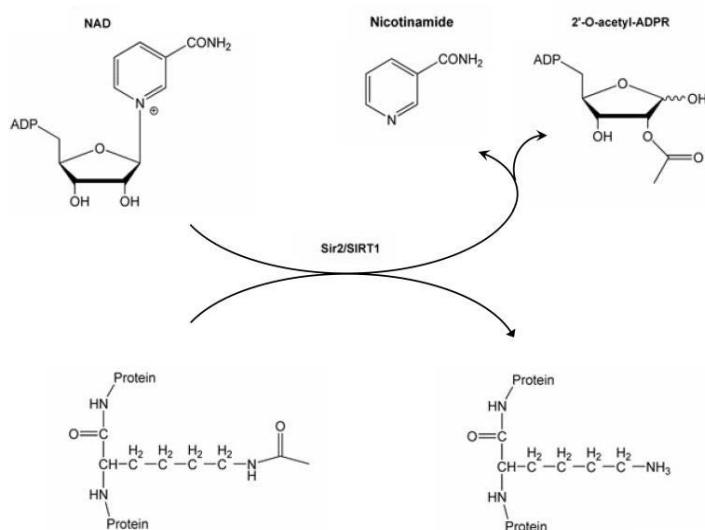


Εικόνα 10 :Το Κράτος των Σιρτουϊνών (Yu, Li, Song, et al., 2024)

Οι σιρτουΐνες διαθέτουν έναν ιδιαίτερα συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα που έχει μήκος περίπου 270 αμινοξέα. Ο πυρήνας που αποτελείται από δύο βασικές περιοχές, έχει ευθύνη για την δέσμευση του NAD⁺ και του ακετυλιωμένου υποστρώματος. Ο μεγάλος τομέας εμφανίζει την Rossmann-fold α/β δομή, που ευθύνεται για την δέσμευση του NAD⁺. Ο πιο μικρός τομέας περιλαμβάνει μοτίβα σύνδεσης ψευδαργύρου, συμβάλλοντας έτσι στην σταθερότητα της δομής. Συνδετικοί βρόγχοι

ενώνουν τους δύο αυτούς τομείς. Η ένωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό «ρωγμών» που λειτουργούν ως σημεία εισόδου το NAD⁺. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται μεταξύ των δύο δομικών περιοχών που οι αντιδρόντες ομάδες θα αλληλεπιδράσουν με το NAD⁺ και το υπόστρωμα για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική αντίδραση. Εκτός από τον καταλυτικό πυρήνα, οι σιρτουίνες περιέχουν και κάποιες μεταβλητές περιοχές στα αμινοξυτελικά και καρβοξυτελικά άκρα. Αυτές διαφέρουν στο μήκος, την αλληλουχία και την δευτεροταγή δομή τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προκύπτουν διαφορές και στον υποκυτταρικό εντοπισμό των ισομορφών (Tao, Jin, et al., 2023, Wu, Zhang, et al., 2022).

Οι σιρτουίνες δρουν αφαιρώντας μία ακετυλομάδα από τις πρωτεΐνες στόχους τους όπως η p53, Ku70/Bax, FOXO και άλλες. Πιο συγκεκριμένα αφαιρούν την ομάδα από την ε-αμινομάδα καταλοίπων λυσίνης των στόχων τους. Το τελικό προϊόν από αυτή την αντίδραση είναι η απελευθέρωση νικοτιναμίδιου (NAM), μίας 2'-Ο-ακετυλο-ADP-ριβόζη και του αποακετυλιωμένου υποστρώματος (Sanders, Jackson, & Marmorstein, 2010). Η αντίδραση που καταλύουν αποτελείται από 2 βήματα. Το πρώτο, ξεκινά με την διάσπαση του NAD⁺ απελευθερώνοντας τον νικοτιναμίδιο και το ενδιάμεσο μόριο, το πεπτιδίο-ιμιδικό ADP ριβόζη. Το τελευταίο, στην συνέχεια, διασπάται περαιτέρω δίνοντας Ο-ακετυλο-ADP-ριβόζη (AADPR). Η αρχική υδρόλυση του NAD⁺ τροφοδοτεί με την απαιτούμενη ενέργεια την αντίδραση.



Εικόνα10: Η αντίδραση που καταλύεται από την Sirt1 (Canto, & Auwerx, 2013).

Από όλα τα μέλη της οικογένειας των σιρτουινών η SIRT1 είναι εκείνη που έχει μελετηθεί περισσότερο. Αποτελείται από 747 αμινοξέα και μία συντηρημένη καταλυτική περιοχή με άκρα το καρβοξυτελικό και το αμινοξυτελικό άκρο. 25 αμινοξέα αποτελούν το C- άκρο και κατέχει καίριο ρόλο για την δράση του μορίου. Από εκεί σχηματίζεται μία δομή φουρκέτας αποκαλύπτοντας την περιοχή που δεσμεύεται το NAD⁺. Από την άλλη, το N- τελικό άκρο βοηθάει στην καταλυτική δραστηριότητα του μορίου. Τέλος, η SIRT1 μπορεί να εντοπιστεί και στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα, και αυτό εξαρτάται από τον τύπο του εκάστοτε ιστού (Singh & Ubaid, 2020).

4.2 Ρόλος

Οι σιρτουίνες και πιο συγκεκριμένα η SIRT1 εμπλέκεται σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών με το να αποκετυλώνει ιστόνες. Αρχικά, επηρεάζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την απόπτωση αλλά και την επιδιόρθωση του DNA. Παράλληλα, εμφανίζεται στην αυτοφαγία, στα μονοπάτια γήρανσης, στην ομοιόσταση της γλυκόζης και της ινσουλίνης. (Hubbard, Sinclair, 2014).

Η σιρτουίνη 1 έχει εντοπιστεί στον πυρήνα και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ρύθμιση του κυττάρου σε επιγενετικό επίπεδο. Επηρεάζει την κατάσταση της χρωματίνης, και πιο συγκεκριμένα ευθύνεται για την αποακετυλίωση των ιστονών στην H1 λυσίνη 26 (H1K26ac), την H3 λυσίνη 9 (H3K9ac) και την H4 λυσίνη 16 (H4K16ac). Εκτός από αυτά, επηρεάζει και την αποακετυλίωση μη ιστονών, όπως οι πρωτεΐνες p53, οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης Ku70 και FoxO, η PGC1-α που σχετίζεται με την οξείδωση λιπαρών οξέων και η οδός σηματοδότησης NF-κβ. Με αυτόν τον τρόπο, αποακετυλιώνοντας αυτά τα μόρια, επηρεάζει και διαφορετικές λειτουργίες. Σε φυσιολογικά κύτταρα ο έλεγχος της SIRT1 γίνεται από τις πρωτεΐνες p53, TSPYL2, CHK2, HIC1 και CCAR2 (Alves-Fernandes, & Jasiulionis, 2019).

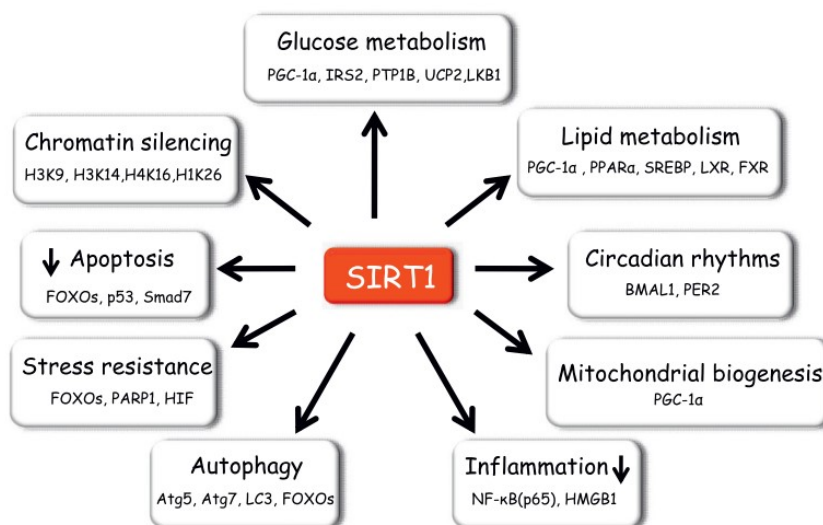
Η SIRT1 φαίνεται να επηρεάζει και την αυτοφαγία. Αρχικά, η αυτοφαγία είναι ένας κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός καθώς συμβάλλει στην απομάκρυνση δυσλειτουργικών μορίων, που σχηματίζονται σε συνθήκες στρες, μέσω των λυσοσωμάτων, τα ανακυκλώνει για να παράγει νέα προϊόντα. Η SIRT1 αποακετυλιώνει σημαντικά μόρια της αυτοφαγίας όπως οι πρωτεΐνες ATG5, ATG7, Beclin-1 και LC3 σε υπολείμματα λυσίνης ενεργοποιώντας την διαδικασία στα χονδροκύτταρα (Parageorgiou, Goutas, 2021). Παράλληλα, η SIRT1 φαίνεται να συμμετέχει στην αυτοφαγία μέσω της AMP κινάσης (AMPK). Αυτή είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που λειτουργεί σαν αισθητήρας των επιπέδων AMP και ADP, που αυξάνονται όταν εξαντλείται το ATP. Αποδείχθηκε ότι η AMPK προκαλεί αύξηση την συγκέντρωσης NAD⁺ ενδοκυτταρικά ενεργοποιώντας την SIRT1. Αυτή με την σειρά της αποακετυλιώνει τα μόρια που αναφέρθηκαν παραπάνω (Salminen, & Kaarniranta 2012).

Ένα βασικό κομμάτι που εμπλέκεται η sirt1 είναι η δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Η AMPK και η SIRT1 είναι στενά συνδεδεμένες και ρυθμίζουν τον παράγοντα PGC-1α. Ο PGC-1α είναι ένας συνεργοποιητής και από τους βασικούς ρυθμιστές που οδηγεί στην μιτοχονδριακή βιογένεση, αναπνοή καθώς και γλυκονεογένεση. Στα θηλαστικά παρατηρήθηκε, πως σε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης, το NAD⁺ αυξάνεται, ενεργοποιείται η SIRT1 και αποακετυλιώνει τον PGC-1α σε περιοχές του υποκινητή (Gerhart-Hines, Rodgers, et al., 2007).

Βασικό στόχο της οικογένειας των σιρτουινών αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO. Αυτοί είναι υπεύθυνοι για την προσαρμογή του κυττάρου σε στρεσογόνες καταστάσεις, συμπεριλαμβανόμενου του οξειδωτικού στρες καθώς και της απουσίας θρεπτικών συστατικών. Η SIRT1 αποακετυλιώνει τα FoxOs, όμως το αποτέλεσμα θα καθοριστεί από τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί πως η SIRT1 συμβάλλει στην δημιουργία οστού ενισχύοντας την σηματοδότηση μέσω Wnt. Αποακετυλιώνει τα FoxOs εμποδίζοντας την σύνδεσή τους με την β-κατενίνη. Ενισχύεται με αυτό τον τρόπο η σηματοδότηση Wnt και αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός των οστεοβλαστών. Τώρα, στους οστεοκλάστες, η αποακετυλίωση από την SIRT1 και

κατ' επέκταση η ενίσχυση της μεταγραφής των FoxoS προκαλούν αναστολή της παραγωγής ATP στα κύτταρα μιτοχονδρίων και την συσσώρευση ROS (Almeida, & Porter, 2019).

Τέλος, η SIRT1 δρα προστατευτικά έναντι της φλεγμονής. Αυτό το πετυχαίνει με την επίδραση με τον παράγοντα NF-Κβ. Αυτός, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που ενεργοποιείται και συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η φλεγμονή και η ανοσολογική απόκριση απελευθερώνοντας διάφορες κυτοκίνες, όπως ο TNF-α (Zhang, Sun, 2015, Ali, Hassanein, et al., 2021). Η SIRT1 αποακετυλιώνει τον NF-Κβ στην υπομονάδα p65 και πιο συγκεκριμένα στην λυσίνη 310 του RelA/p65, και τον απενεργοποιεί ελαττώνοντας έτσι την φλεγμονώδη απόκριση (Bishr, Atwa, et al., 2025).



Εικόνα 12: Οι βιολογικοί ρόλοι της Sirt1 (Kitada, Ogura, & Koya, 2016).

4.3 Σχέση με γήρανση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η κυτταρική γήρανση είναι ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζεται από αναστολή του κυτταρικού κύκλου μέσω βράχυνσης τελομερών ή από στρες. Η SIRT1 είναι ένα μόριο που επηρεάζει σημαντικά την γήρανση και τον κυτταρικό θάνατο, και συμβάλλει στην προστασία από ηλιακιο-εξαρτώμενες ασθένειες. Η SIRT1 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε μικρότερες ηλικίες, ενώ μειώνεται σταδιακά με την αύξηση της ηλικίας, και φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην παράταση της ζωής. Όλα αυτά τα πετυχαίνει στοχεύοντας γονίδια όπως το p53, FoxOs και NF-Κβ που αναλύθηκαν παραπάνω (Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., & Min, K. J. 2019).

Το γονίδιο p53 αποτελεί και την πρώτη πρωτεΐνη-στόχο που ανακαλύφθηκε. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η p53 ενεργοποιεί την p21, μέλος των CDKIs. Αυτή αναστέλλει την κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και κατ' επέκταση προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η p53 ακετυλιώνεται από την SIRT1 προκαλώντας την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων. Αυτό έχει αντίκτυπο στον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση αλλά και την καταστολή όγκου (Lee, & Gu, 2013). Η SIRT1 αποακετυλιώνει την p53 στο C- τελικό άκρο και πιο συγκεκριμένα στην K382. Έτσι αναστέλλει την ενεργοποίηση της p53 και κατ' επέκταση της p21. Έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα με ελαττωμένη ρύθμιση της SIRT1 εμφανίζουν πρόωρα τον φαινότυπο της κυτταρικής

γήρανσης, καθώς η p53 ακετυλιώνεται περισσότερο. Αντίθετα, αυξημένα επίπεδα της SIRT1 προστατεύουν ενάντια στην κυτταρική γήρανση (Yi, & Luo, 2010).

Παράλληλα, η SIRT1 ρυθμίζει την έκφραση των συστατικών της SASP μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων των γονιδίων που κωδικοποιούν τους παράγοντες IL-6 και IL-8. Η SIRT1 και το SASP είναι αντιστρόφως ανάλογα, με την SIRT1 να μειώνεται κατά την γήρανση και το SASP να αυξάνεται. Η SIRT1 δεσμεύεται στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων, αποακετυλώνει τις ιστόνες H3 (K9) και H4 (K16), καταστέλλοντας την έκφραση τους. Όταν προκληθεί γήρανση, η SIRT1 αποχωρεί από αυτές, ακετυλιώνοντας τις και ενεργοποιώντας τους παράγοντες του SASP.

Η SASP συνδέει την κυτταρική γήρανση με την έλλειψη λειτουργικότητας ιστών και με ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις. Άρα η SIRT1 είναι αρνητικός ρυθμιστής του εκκριτικού φαινοτύπου και ελέγχει την έκφραση γονιδίων μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων και απώλεια λειτουργίας, ενισχύοντας έτσι το προφλεγμονώδες προφίλ των γηρασμένων κυττάρων (Hayakawa, Iwai, et al., 2015).

4.4 Σχέση με SAC

Μία από τις πιο κρίσιμες πρωτεΐνες του Spindle Assembly Checkpoint (SAC) είναι η Bub1b/BubR1. Συμμετέχει στη συγκρότηση του Mitotic Checkpoint Complex (MCC) μαζί με τις Mad2, Bub3 και Cdc20. Η BubR1 συνδέεται με την Cdc20, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με το APC/C, και αναστέλλει τη δραστηριότητά του μέχρι να διασφαλιστεί η σωστή ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων, αποτρέποντας την πρόωρη είσοδο στην ανάφαση.

Τα επίπεδα έκφρασης της Bub1b/BubR1 φαίνεται να ρυθμίζονται από την Sirt1. Συγκεκριμένα, η Sirt1 συνδέεται με τον προαγωγέα του γονιδίου Bub1b/BubR1 και αυξάνει την έκφρασή του, πιθανά αποακετυλιώνοντας ιστόνες ή συνδεδεμένες πρωτεΐνες-ρυθμιστές της χρωματίνης στο προαγωγέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα συμπίκνωση ή χαλάρωση της χρωματίνης, επηρεάζοντας τη μεταγραφή: στην περίπτωση του Bub1b/BubR1, η αποακετυλίωση από την Sirt1 οδηγεί σε ενίσχυση της μεταγραφής, ενισχύοντας έτσι τη σταθερότητα του SAC και διασφαλίζοντας την ακριβή κατανομή των χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, η Sirt1 φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τη μιτωτική καταστροφή, μια διαδικασία κατά την οποία κύτταρα με ανώμαλη μίτωση οδηγούνται σε απόπτωση ή άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου (Zhao, Wang et al., 2022).

Συνοπτικά, η Sirt1 επηρεάζει τη λειτουργία του SAC μέσω της αύξησης των επιπέδων της Bub1b/BubR1, συμβάλλοντας στην ορθή προώθηση της μίτωσης και στην προστασία από ανευπλοειδία ή άλλα ανώμαλα μιτωτικά συμβάντα (mitotic defects) (Goutas, Outskouni et al., 2023, ; Zhao, Wang et al., 2022).

5. Σκοπός Εργασίας

Όπως αναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση μεταξύ της Sirt1 και του Spindle Assembly Checkpoint (SAC) είναι πολύπλοκη και παραμένει σχετικά ανεξερευνήτη. Η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην διερεύνηση της σχέσης Sirt1–SAC και στον τρόπο με τον οποίο αυτή η σχέση επηρεάζει την κυτταρική γήρανση. Για την παραγωγή γηρασμένων κυττάρων, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε πολλαπλές ανακαλλιέργειες (high

passage), ώστε να εξαντληθεί σχεδόν η αναδιπλασιαστική τους ικανότητα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε νοκοδαζόλη για να παγιδευτούν στη μίτωση, επιτρέποντας τη μελέτη βασικών πρωτεϊνών του SAC, όπως οι Bub1b, Mad2 και Cdc20, καθώς και των επιπέδων της Sirt1. Επιπλέον, για την απόκτηση λεπτομερούς εικόνας της κυτταρικής κατανομής της Sirt1, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία, προκειμένου να εντοπιστεί η θέση της Sirt1 στα κύτταρα που βρίσκονται στη μιτωτική φάση.

Συμπερασματικά, ο σκοπός της εργασίας είναι να διερευνηθεί ο ρόλος της Sirt1 στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC) σε μεσεγχυματικά κύτταρα και να εκτιμηθεί η πιθανή εμπλοκή του ρόλου αυτού στην διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης.

Πειραματικό Μέρος

6. Υλικά και μέθοδοι

6.1 Δείγματα Κυττάρων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα από την γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστική μορφολογία που προσομοιάζει αυτή των ινοβλαστών, και κατά την διάρκεια της καλλιέργειας τους αναπτύσσονται σε μονοστιβάδα (Mc Elreavey et al., 1991). Τα WJ-MSCs έχουν αυξημένο δυναμικό διαφοροποίησης και μικρότερο χρόνο αναδιπλασιασμού. Για την ανάπτυξη τους, απαραίτητη κρίνεται η ύπαρξη γειτονικών κυττάρων και η επαφή μεταξύ τους. Όταν αναπτύσσονται και καλύψουν την επιφάνεια σε μεγάλο ποσοστό (πάνω από 90%), εκκρίνουν παράγοντες που αναστέλλουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των γειτονικών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό και ως contact inhibition (Karahuseyinoglu et al., 2007). Για να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα, χρειάζεται να πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια όταν θα έχουν καλύψει το 80% της επιφάνειας του καλλιεργητικού μέσου.

6.2 Καλλιέργειες Wharton's Jelly

Θρεπτικό Μέσο Καλλιέργειας

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των WJ-MSCs είναι το Dulbecco's Modified Eagle Medium από την εταιρεία Biowest (DMEM BioWest L0103-500). Για να είναι πιο πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες, έγινε προσθήκη ορού εμβρύου βοός με αναλογία 10%v/v (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco). Τέλος, προστέθηκαν επιπλέον τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, με σκοπό την προστασία του θρεπτικού μέσου από μολύνσεις.

Διάλυμα Hank's Balanced Solution

Έγινε χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Solution (PBS, Lonza). Είναι ένα υδατικό διάλυμα αλάτων, απαραίτητο για την καλλιέργεια των κυττάρων και για την διατήρηση της σταθερότητας του PH. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Θρυψίνη

Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, απαραίτητο για την καλλιέργεια των κυττάρων. Έχει την ιδιότητα να διασπά τους δεσμούς που δημιουργούν τα κύτταρα με την επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας, συμβάλλοντας έτσι στην αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την χρήση της είναι 37°C, ενώ η διατήρηση της γίνεται στους 4°C.

Συνθήκες καλλιέργειας

Με σκοπό την αποφυγή μολύνσεων από εξωτερικούς παράγοντες και την διατήρηση ασηπτικών συνθηκών, όλες οι διαδικασίες χειρισμού πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής τάξης II. Παράλληλα, η ανάπτυξη των WJ-MSCs έγινε με την βοήθεια φλασκών πολυστυρενίου. Αυτές, διαθέτουν ένα ειδικό φίλτρο, εξασφαλίζοντας έτσι την ανταλλαγή αερίων και την απαραίτητη οξυγόνωση των κυττάρων, συμβάλλοντας ακόμη, στην αποτροπή μολύνσεων. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση CO₂ 5%.

Πρωτόκολλα καλλιέργειας

Τα WJ-MSCs αφού απομονωθούν από τον ανθρώπινο ομφάλιο λώρο των δοτών, αποθηκεύονται σε τράπεζες υγρού αζώτου στους -150°C. Αυτό γίνεται ώστε να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η διαδικασία ψύξης τους αποτελείται από την μεταφορά τους σε cryovials σε συγκέντρωση $4 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml θρεπτικού (DMEM). Σε αυτά τα φιαλίδια γίνεται προσθήκη FBS 30% v/v καθώς και Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 20% v/v. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο, βοηθώντας στην σταδιακή ψύξη των κυττάρων. Επιδιώκεται ο αργός ρυθμός ψύξης, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο σχηματισμού κρυστάλλων πάγου που είναι βλαβεροί για τα κύτταρα.

Πρωτόκολλο απόψυξης κυττάρων

- Σε falcon των 15ml γίνεται προσθήκη 2 ml πλήρους θρεπτικού DMEM.
- Το cryovial που εμπεριέχει τα βλαστοκύτταρα μεταφέρεται στο υδατόλουτρο στους 37°C για 10-15 δευτερόλεπτα.
- Απόχυση του περιεχομένου του cryovial στο falcon με το θρεπτικό μέσο.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25°C).
- Το υπερκείμενο αφαιρείται με προσοχή, καθώς περιέχει το DMSO.
- Επαναδιάλυση ιζήματος με την προσθήκη 5 ml PBS.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25°C).
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου με προσοχή.
- Προσθήκη 2ml νέου πλήρους θρεπτικού DMEM και επαναδιάλυση του ιζήματος.
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκες από πολυστυρένιο.
- Προσθήκη 3ml νέου πλήρους θρεπτικού DMEM.
- Επώαση στον κλίβανο στους 37°C.

Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας κυττάρων (passage)

Όταν η ανάπτυξη των κυττάρων είναι ίση περίπου με το 80% της φλάσκας, απαιτείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε 2 νέες φλάσκες. Αυτό εξασφαλίζει την σωστή ανάπτυξη τους.

- Αφαίρεση του υπάρχοντος θρεπτικού.
- Πλύση των κυττάρων με 5ml διαλύματος RBS για δύο φορές.
- Προσθήκη 1,5ml θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο για 3 λεπτά.
- Παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης με σκοπό τη διαπίστωση της αποκολλητικής δράσης της θρυψίνης.
- Προσθήκη 5ml από το νέο πλήρες θρεπτικό με σκοπό την απενεργοποίηση της θρυψίνης.
- Τα 5ml που περιέχει η φλάσκα μεταφέρονται σε falcon των 15ml.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25oC).
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml διαλύματος PBS.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25oC).
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Επανεναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 10ml νέου πλήρες θρεπτικού μέσου.
- Μεταφορά 5ml των κυττάρων σε δύο καινούριες φλάσκες.
- Προσθήκη 5ml νέου πλήρες θρεπτικού μέσου μέχρι τελικό όγκο 10ml.
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο.

6.3 Προσδιορισμός δραστικότητας SA-β-gal

Για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων χρησιμοποιείται η δοκιμή προσδιορισμού της δραστικότητας της β γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal). Τα κύτταρα στην γήρανση εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάσης. Η μέθοδος αυτή, θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες και βασίζεται στη χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος 5-βρόμο-3ινδολυλ-4χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal), το οποίο σε pH 6 διασπάται από την β γαλακτοσιδάση και απελευθερώνει μπλε χρώμα.

Υλικά Μεθόδου SA-β-gal

- Διάλυμα μονιμοποίησης : 0,2% φορμαλδεΐδη/0,2%γλουταραλδεΐδη διαλυμένα σε PBS
- Διάλυμα Χρώσης : Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM Κιτρικό οξύ/Φωσφορικό Νάτριο pH 6, 5 mM C6N6FeK4, 5 mM C6N6FeK3, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl2, 1 mg/ml 5-βρόμο 3ινδολυλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal,Sigma Aldrich:B4252 250MG)

Πρωτόκολλο προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal

- Καλλιεργούνται 0,5 – 3 x 10⁵ σε 6 well plate

- Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο
- Πλύση δύο φορές με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με το διάλυμα μονιμοποίησης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- Πλύση δύο φορές με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Τα κύτταρα χρωματίζονται με 1-2ml από το διάλυμα χρώσης
- Επώαση σε κλίβανο χωρίς CO₂ για 16-24 ώρες
- Αφαιρείται το διάλυμα χρώσης
- Τρεις πλύσεις των κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Λήψη φωτογραφιών με οπτικό μικροσκόπιο

6.4 Επίδραση με νοκοδαζόλη

Έχοντας ως στόχο την μελέτη των βλαστοκυττάρων στην μίτωση χρησιμοποιήθηκε το φάρμακο νοκοδαζόλη. Χρησιμοποιείται με σκοπό την αναστολή σχηματισμού μιτωτικής ατράκτου, ώστε όλα τα κύτταρα να συγχρονιστούν και να μελετηθούν. Τα βλαστοκύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM, έγινε πλύση με PBS και προστέθηκε νέο θρεπτικό που περιείχε νοκοδαζόλη σε συγκέντρωση 500nm.

6.5 Συλλογή μιτωτικού κλάσματος μέσω mitotic shake off

Μετά την επίδραση με νοκοδαζόλη για 18 ώρες, τα βλαστοκύτταρα που εγκλωβίστηκαν στην μίτωση συλλέχθηκαν με ήπιο κούνημα (mitotic shake off), όπου λόγω της αλλαγής στη διαμόρφωση ανασηκώθηκαν από την επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου. Έπειτα, ακολούθησε λύση των κυττάρων και απομόνωση των πρωτεϊνών.

6.6 Απομόνωση Πρωτεϊνών

Υλικά απομόνωσης :

- Διάλυμα Λύσης (Lysis Buffer)
30Mm Tris (Invitrogen)
10% Glycerol (Invitrogen)
150nM NaCl (Sharlau)
1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς Πρωτεασών
- PBS (Lozna)
- Θρυψίνη (BioWest)

Πρωτόκολλο Απομόνωσης πρωτεϊνών από φλάσκα:

- Απόρριψη θρεπτικού
- Πλύση με PBS
- Προσθήκη θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο για 3 λεπτά
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν αποκολλήθηκαν τα κύτταρα
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού για απενεργοποίηση θρυψίνης

- Το εσωτερικό της φλάσκας μεταφέρθηκε σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση (1750 στροφές, 6 λεπτά, 25°C)
- Απόρριψη υπερκλειμένου
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml PBS
- Μεταφορά σε erpendorf των 2 ml
- Φυγοκέντρηση (5000 στροφές, 5 λεπτά, 25°C)
- Απόρριψη υπερκλειμένου
- Στο ίζημα προστέθηκαν 100μl από το διάλυμα λύσης για κάθε 10⁶ κύτταρα
- Ανάδευση σε vortex ανά 5 λεπτά ενώ τα δείγματα διατηρούνται σε πάγο για 40 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκλειμένου σε νέο erpendorf
- Αποθήκευση στους -20°C

Υπολογισμός απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνών – μέθοδος Bradford:

Η δοκιμασία Bradford βοηθάει στην ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με την βοήθεια μίας χρωστικής ουσίας, της Coomassie Brilliant Blue G-250. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην σύνδεση της χρωστικής στην πρωτεΐνη μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Δεσμεύεται σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα και αλλάζει την μέγιστη απορρόφηση από τα 460nm στα 595nm. Είναι απαραίτητη η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης με πρωτεΐνες γνωστών συγκεντρώσεων, για τον υπολογισμό των δειγμάτων με άγνωστες συγκεντρώσεις.

Διαδικασία παραγωγής πρότυπης καμπύλης :

- Κατασκευάζονται δείγματα αλβουμίνης του ορού του βοός (BSA) γνωστής συγκέντρωσης αραιωμένα σε ddH₂O από 0,25 μg/μl έως 1,5 μg/μl (0-0,25-0,5-0,75-1-1,5)
- Προστίθενται 25μl από κάθε δείγμα με γνωστή συγκέντρωση BSA σε 96-well plate ή 5μl άγνωστης συγκέντρωσης
- Προσθήκη 200μl χρωστικής σε όλα τα δείγματα
- Επώση στον κλίβανο για 30 λεπτά
- Ήπια ανάδευση
- Φωτομέτρηση στα 595nm
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης (OD/συγκέντρωση)
- Υπολογισμός αγνώστων συγκεντρώσεων

6.7 Ανίχνευση υποκυτταρικού εντοπισμού sirt1 με ανοσοφθορισμό

Διαδικασία πριν τον ανοσοφθορισμό

- Καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν στο 6-well-plate ώστε πάνε σε αυτές να αναπτυχθούν τα κύτταρα
- Το 6 well late και οι καλυπτρίδες αποστειρώθηκαν με UV ακτινοβολία για 20 περίπου λεπτά
- Σημείωση του 6 well plate
- Προσθήκη 2 ml από πλήρες σε θρεπτικό σε κάθε well
- 2×10^5 κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κάθε well
- Το 6 well plate τοποθετήθηκε στον κλίβανο μέχρι 80% confluency

Πρωτόκολλο μονιμοποίησης κυττάρων

- Το θρεπτικό αφαιρείται από τα well
- 300μl από παγωμένη μεθανόλη προστέθηκαν σε αυτά
- Το 6 well plate τοποθετείται στους -20°C για 10 λεπτά
- Αφαιρείται το διάλυμα μεθανόλης
- Γίνεται πλύση με 1ml PBS και αφαίρεση του
- Αποθήκευση του 6well plate στους -20°C αφού πριν σκεπαστεί με αλουμινόχαρτο

Ανοσοφθορισμός

Υλικά :

1. 1% Triton-X-100 σε PBS
2. 0,02% Tween20 σε PBS
3. Blocking buffer: 0,02% Tween20 σε PBS και 1% BSA για να δεσμευτούν μη ειδικές θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων

Πρωτόκολλο:

- Πλύση τρεις φορές από πέντε λεπτά των κυττάρων στα wells με 1ml PBS
- Προστίθενται 50μl από το διάλυμα 1% Triton-X-100 σε PBS σε κάθε καλυπτρίδα και επώσθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Τα κύτταρα πλύθηκαν με 1ml από το διάλυμα 0,02% Tween20 σε PBS για 5 λεπτά με συνεχή ανάδευση
- Προστέθηκε 1ml Blocking Buffer σε κάθε well για 10 λεπτά και μετά αφαιρείται
- Προσθήκη 50μl από το πρωτοταγές αντίσωμα σε κάθε well για 1 ώρα
- Αφαίρεση αντισώματος
- Τα κύτταρα πλύθηκαν με 1ml από το διάλυμα 0,02% Tween20 σε PBS για 5 λεπτά με συνεχή ανάδευση
- Προσθήκη 50μl δευτεροταγούς αντισώματος και το 6 well plate τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα
- Τα κύτταρα πλύθηκαν με 1ml από το διάλυμα 0,02% Tween20 σε PBS για 5 λεπτά με συνεχή ανάδευση
- Γίνεται προσθήκη 10μl από την χρωστική DAPI ώστε να χρωματιστούν οι πυρήνες των κυττάρων
- Οι καλυπτρίδες αφού γυριστούν ανάποδα τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες
- Μονιμοποίηση των καλυπτρίδων στις πλάκες

- Αποθηκεύονται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C
- Παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού

Πρωτοταγές Αντίσωμα	Δευτεροταγές Αντίσωμα
anti-SIRT1 (1:100, Cell Signaling Technology, Rabbit #2496)	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, 1:500 (#A11001)

6.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS

Με στόχο τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, γίνεται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Αυτό αποτελεί το δεύτερο στάδιο για την ανίχνευση των πρωτεϊνών που θα μελετηθούν. Η ηλεκτροφόρηση SDS χρησιμοποιεί πύκνωμα πολυακρυλαμιδίου ως μέσο διαχωρισμού. Βασίζεται στην μετακίνηση των φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (U) εξαρτάται από την ένταση του εκάστοτε ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f). Η σχέση αυτών συνοψίζεται στον τύπο: $u = (E \times z) / f$.

Αρχικά, το μείγμα των πρωτεϊνών διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που βοηθάει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και προσδίδοντας τους αρνητικό φορτίο. Η αναλογία σύνδεσης του στις πρωτεΐνες είναι ένα μόριο SDS ανά δύο αμινοξέα. Αυτό δημιουργεί ένα σύμπλοκο που το φορτίο του είναι ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μεγάλες πρωτεΐνες μετακινούνται με αργό ρυθμό, ενώ οι μικρότερες με πιο γρήγορο.

Υλικά για ηλεκτροφόρηση

- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS ((NuPage NovexTris – Acetate MiniGels, Invitrogen)
- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (SampleBuffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer Scientific)
- Δις απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X : 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10X (NuPageMES Running buffer) με 900ml ddH₂O

6.8.1 Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Με σκοπό τον επιτυχή διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, πρέπει πρώτα να αποδιαταχτούν οι πρωτεΐνες στην πρωτοταγή από την τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή τους. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μg ενώ το διάλυμα για την αποδιάταξη περιείχε:

1. 4 μL Sample Buffer 6X: περιέχει Reducing buffer και Loading buffer
2. X μL πρωτεΐνης για να επιτευχθεί συγκέντρωση 15μg

3. Υ μL dd H₂O για τελικό όγκο V_{τελ}=20μL

Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών έλαβε χώρα στους 95°C για 5 λεπτά σε θερμικό κυκλοποιητή.

6.8.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών περιλαμβάνει δύο διαδοχικά πηκτώματα. Το πρώτο είναι το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Στο πρώτο τοποθετούνται τα δείγματα και το δεύτερο συγκεντρώνει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή για να ξεκινήσουν όλες ταυτόχρονα τον διαχωρισμό στο separating gel.

Υλικά

Separating gel 10%	Separating gel 12%	Stacking gel 3,9%
1,67 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide	2 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide	0,65 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide
1,25 mL 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	1,25 mL 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	1,25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8
2,083mL H ₂ O	1,75 mL H ₂ O	3,05 mL H ₂ O
0,05 mL 10%(w/v) ammonium persulfate	0,05 mL 10%(w/v) ammonium persulfate	25 μL 10%(w/v) ammonium persulfate
0,01 mL TEMED	0,01 mL TEMED	5 μL TEMED

Διαδικασία

- Στήσιμο ειδικής συσκευής για ηλεκτροφόρηση από την εταιρεία BioRad
- Προστίθενται 600ml Running Buffer IX στο μπροστινό και στο οπίσθιο μέρος της συσκευής
- Το gel πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται στο μεσαίο μέρος της συσκευής
- 200ml Running Buffer προστίθενται στο μεσαίο μέρος της συσκευής
- Τα δείγματα και ο ladder με γνωστά μοριακά βάρη φορτώνονται στο gel με τον ladder να φορτώνεται στο πρώτο πηγαδάκι
- Η ένταση του ρεύματος ρυθμίζεται στα 70Volt για 15 λεπτά και ξεκινάει η ηλεκτροφόρηση
- Με το τέλος των 15 λεπτών τα volt αυξάνονται στα 180 για τα επόμενα 40 λεπτά

6.8.3 Μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη

PVDF

Υλικά :

Διαλύματα	Υλικά
Transfer buffer:	Μεμβράνη PVDF
100 ml Transfer Buffer 10X (NuPage, Invitrogen)	Χαρτί τύπου Whitman

200 ml Μεθανόλη 1% (Applichem)	Ειδικά σφουγγαράκια
700 ml ddH ₂ O	Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, ThermoScientific)

Διαδικασία :

- Στήνεται η ειδική συσκευή Trans-blot Wet Transfer Cell (BioRad)
- Ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF στην οποία θα μεταφερθούν οι πρωτεΐνες με μεθανόλη για 15 λεπτά
- Το gel πολυακρυλαμίδης, η μεμβράνη PVDF και τα χαρτάκια Whittman επάζονται σε Transfer buffer για 20 λεπτά
- Φτιάχνεται η δομή «sandwich» και τοποθετείται στην συσκευή. Η δομή αυτή αποτελείται από τα παραπάνω υλικά με συγκεκριμένη σειρά . πρώτα τοποθετείται το σφουγγαράκι, μετά ένα χαρτάκι Whittman, σειρά έχει η ενεργοποιημένη πλέον μεμβράνη PVDF, το gel πολυακρυλαμιδίου, ένα επιπλέον χαρτάκι Whittman και τέλος ένα ακόμη σφουγγαράκι.
- Το sandwich τοποθετείται με προσοχή στην ειδική συσκευή
- Η συσκευή ενεργοποιείται και τα Volt ορίζονται στα 100V για 60 λεπτά ώστε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το gel στην μεμβράνη PVDF
- Για να επιβεβαιωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών, ακολουθεί χρώση με Ponceau. Αυτό είναι μία κόκκινη χρωστική που αποκαλύπτει τις μπάντες στην μεμβράνη. Επίσης, γίνεται και χρήση με Coomassie για να ξαναεπιβεβαιωθεί η μεταφορά
- Ακολουθούν τρεις πλύσεις με TBS-T για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση

6.8.4 Blocking της μεμβράνης PVDF για να καλυφτούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων

Υλικά :

1. Διάλυμα πλύσης TBS-T (Tris-buffered Saline, Tween) 1L:
 - a. 100 ml TBS 10X
 - b. 900 ml H₂O
 - c. 1ml Tween2
2. Διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων σύνδεσης αντισωμάτων 5% (Blocking buffer)
 - a. 2,5 gr non fat dry milk powder
 - b. 50 ml TBS-T

Διαδικασία :

- το Blocking Buffer 5% προστίθεται στην μεμβράνη για μία ώρα, με στόχο να καλυφτούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος, και μετά απομακρύνεται

6.8.5 Επώαση της μεμβράνης με πρωτοταγή και δευτεροταγή αντισώματα

Αντισώματα:

Πρωτοταγή Αντισώματα	Δευτεροταγή Αντισώματα
p21 ^{Waf/Cip1} (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, p21 ^{Waf/Cip1} Rabbit #2947)	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)
CDC20 (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, CDC20 Rabbit #14866)	Goat anti-mouse HRP, 1:10000 (Boster, BA1050-1)
Bub1b/BubR1 (1:1000 dilution, BD Transduction Laboratories, Mouse #612503)	
Cyclin B1 (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc, Mouse #sc-245)	
Mad2 (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc, Mouse #sc-47747)	
β-actin (1:3000 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc, Mouse #)	
anti-SIRT1 (1:500, Cell Signaling Technology, Rabbit #2496)	

Διαδικασία :

- Η μεμβράνη επώάζεται με το πρωτοταγές αντίσωμα, αφού πρώτα έχει διαλυθεί σε κατάλληλο blocking buffer, στους 4°C, για όλο το βράδυ υπό συνεχή ανάδευση
- Τρεις πλύσεις με διάλυμα TBS-T για 10 επτά υπό συνεχή ανάδευση
- Επώαση με δευτεροταγές αντίσωμα για μία ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου
- Τρεις πλύσεις με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση

Αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων

Για να ολοκληρωθεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων μέσω αυτοραδιογραφίας, η μεμβράνη πρέπει να επωαστεί με ενισχυτικό σήματος (ECL) για 3 λεπτά. Έπειτα, αυτό απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί. Τέλος η μεμβράνη θα μεταφερθεί σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance) που με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα δοθεί το σήμα από τα αντισώματα.

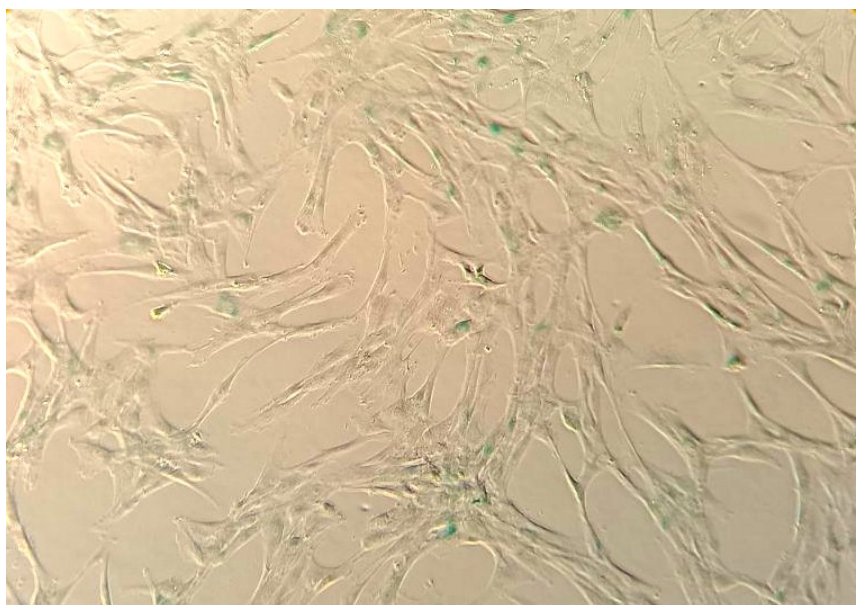
7. Αποτελέσματα

7.1 Βιοδείκτες για την ένδειξη κυτταρικής γήρανσης

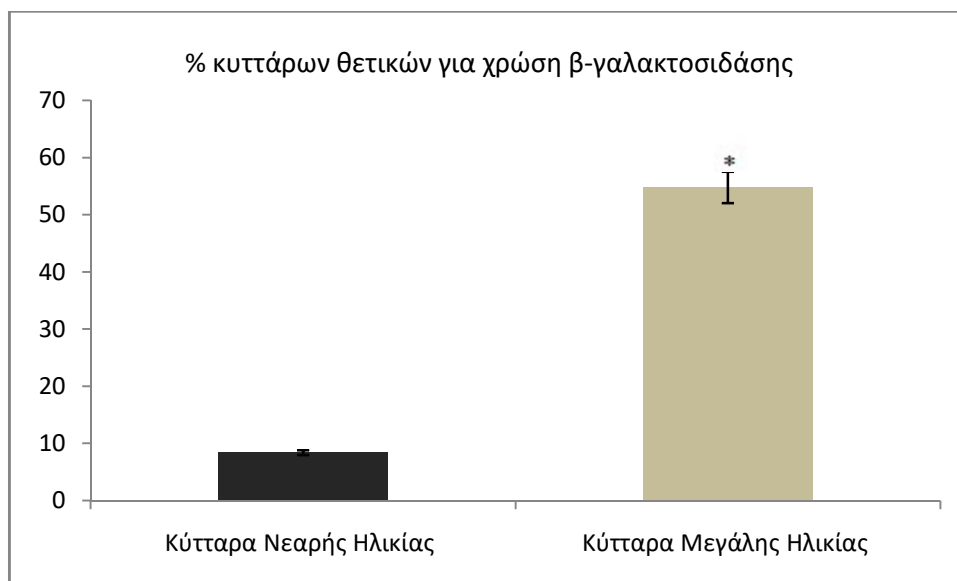
Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων έγινε προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα είναι η σύγκριση γηρασμένων και νέων κυττάρων.



Εικόνα 13: Κύτταρα νεαρής ηλικίας

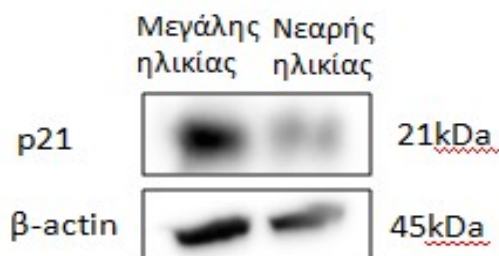


Εικόνα 14: Κύτταρα μεγάλης ηλικίας



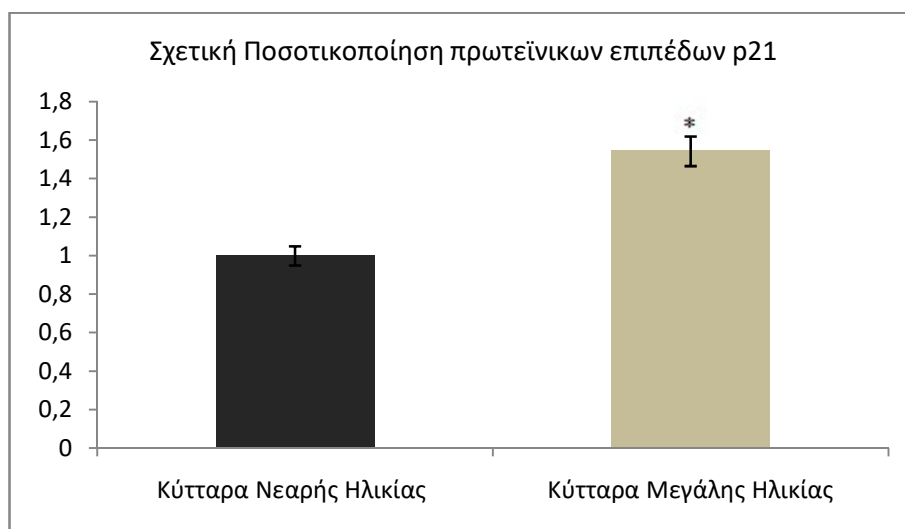
Διάγραμμα 1: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε νεαρά κύτταρα και σε κύτταρα μεγάλης ηλικίας που έχει επέλθει γήρανση.

- Τα κύτταρα νεαρής ηλικίας δεν έχουν βαφτεί μπλε.
- Ποσοστό άνω του 50% στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας έχουν βαφτεί μπλε, άρα έχουν εισέλθει σε κυτταρική γήρανση.



Εικόνα 14 : Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη p21 σε Νεαρά και Μεγάλης Ηλικίας κύτταρα. Χρήση β-ακτίνης ως loading control.

Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων της πρωτεΐνης p21

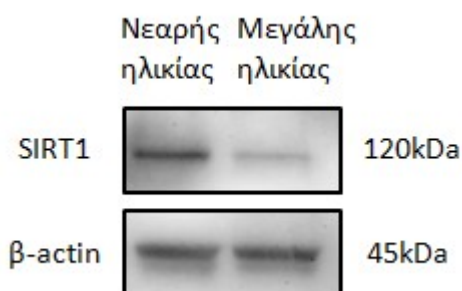


Διάγραμμα 2: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p21 σε σχέση με την β-ακτίνη σε νεαρά και μεγάλης ηλικίας κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως Loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

- Τα κύτταρα μεγάλης ηλικίας παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21 σε σχέση με τα κύτταρα νεαρής ηλικίας.

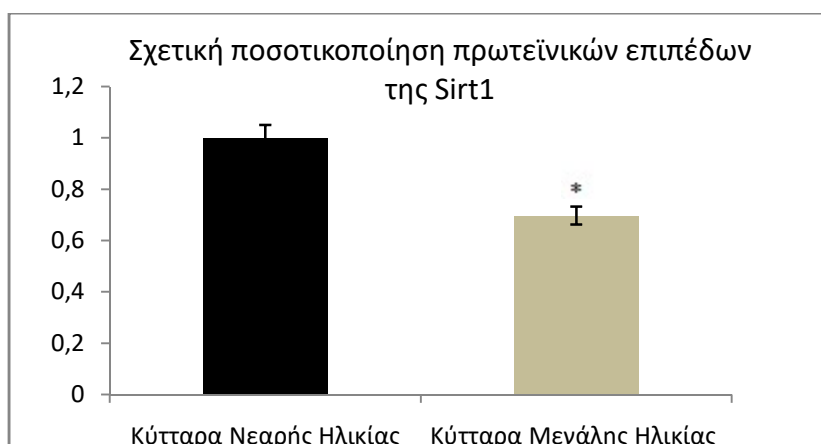
7.2 Αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων Sirt1 στην γήρανση.

Στη συνέχεια θέλαμε να ελέγξουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Sirt1 σε κύτταρα νεαρής και μεγάλης ηλικίας.



Εικόνα 15: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη SIRT1 σε νεαρής και μεγάλης ηλικίας κύτταρα που βρίσκονται στην γήρανση. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων πρωτεΐνης SIRT1 σε κύτταρα νεαρής και μεγάλης ηλικίας.

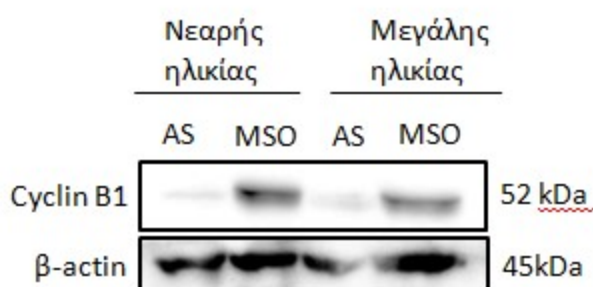


Διάγραμμα 3: Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων της πρωτεΐνης Sirt1 σε σχέση με την β-ακτίνη, σε κύτταρα που επάχθηκε μίτωση. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως Loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

- Στα κύτταρα νεαρής ηλικίας ανιχνεύονται υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης SIRT1 σε σχέση με αυτά μεγάλης ηλικίας.

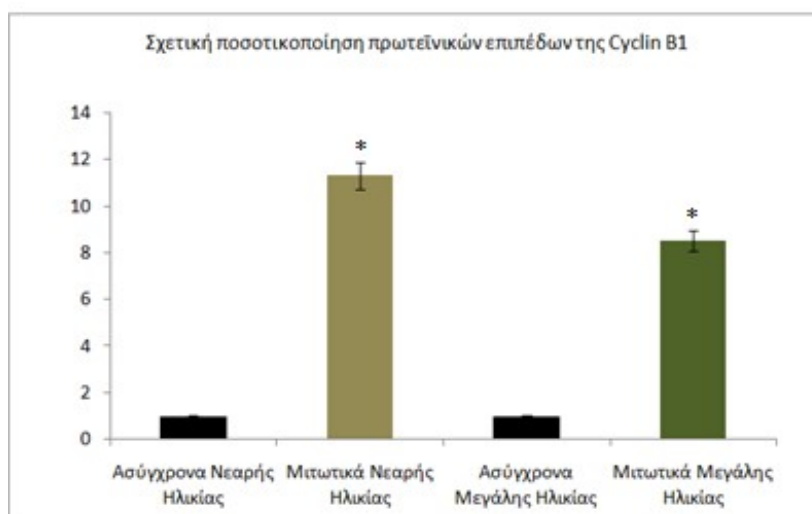
7.3 Αξιολόγηση επιπέδων της πρωτεΐνης Κυκλίνης B1 σε κύτταρα που συλλέχθηκαν έπειτα από την επίδραση νοκοδαζόλης και ασύγχρονα κύτταρα.

Για να μελετηθεί το SAC, αρχικά έπρεπε να γίνει επαγωγή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη μίτωση. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα εκτέθηκαν σε νοκοδαζόλη για 18 ώρες, και τα βλαστοκύτταρα που εγκλωβίστηκαν στην μίτωση συλλέχθηκαν με ήπιο κούνημα (mitotic shake off). Για να ελέγξουμε αν η μίτωση διεκόπη τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα κύτταρα, ελέγξαμε τα επίπεδα της κυκλίνης B1.



Εικόνα 16: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη CyclinB1 σε Νεαρά και Μεγάλης Ηλικίας κύτταρα (AS= Ασύγχρονα, MSO=Μιτωτικά). Χρήση β-ακτίνης ως loading control.

Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων της πρωτεΐνης Κυκλίνης B1

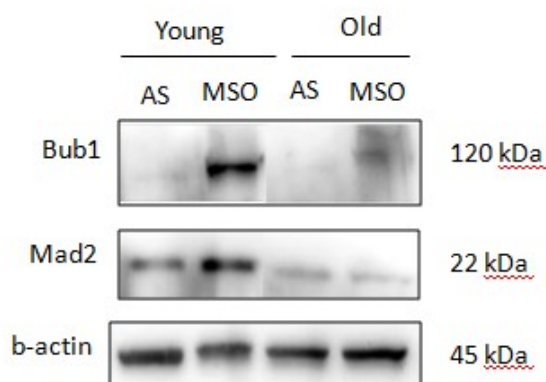


Διάγραμμα 4: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης cyclinB1 σε σχέση με την β-ακτίνη σε νεαρά και μεγάλης ηλικίας κύτταρα, ασύγχρονα και μιτωτικά. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως Loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

- Τα κύτταρα νεαρής ηλικίας και μεγάλης εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα της κυκλίνης B1 σε σχέση με τα ασύγχρονα έπειτα από την επίδραση της νοκοδαζόλης (παύση του κυτταρικού κύκλου).
- Τα κύτταρα μεγάλης ηλικίας εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα της κυκλίνης B1 σε σχέση με αυτά νεαρής ηλικίας .

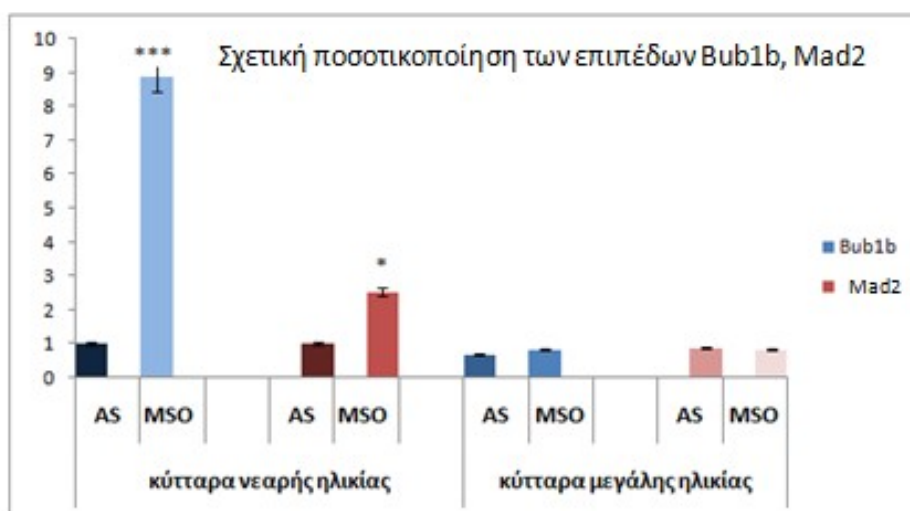
7.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων Bub1b και Mad2 σε κύτταρα που συλλέχθηκαν έπειτα από επίδραση νοκοδαζόλης και ασύγχρονα κύτταρα.

Στην συνέχεια ελέγξαμε τις βασικές πρωτεΐνες του σημείου ελέγχου της μίτωσης, SAC.



Εικόνα 17: Ανοσοαποτύπωση Western για τις πρωτεΐνες Bub1b και Mad2 σε μιτωτικά κύτταρα νεαρής και μεγάλης ηλικίας. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

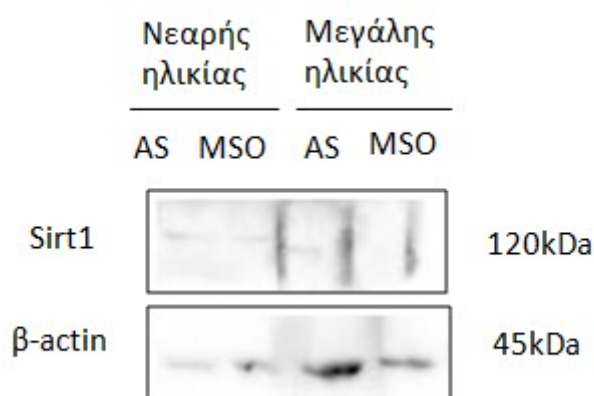
Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων των πρωτεϊνών Bub1b, Mad2.



Διάγραμμα 5: Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων των πρωτεϊνών Bub1b, Mad2, Cdc20 σε σχέση με την β-ακτίνη, σε κύτταρα που επάχθηκε μίτωση. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως Loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

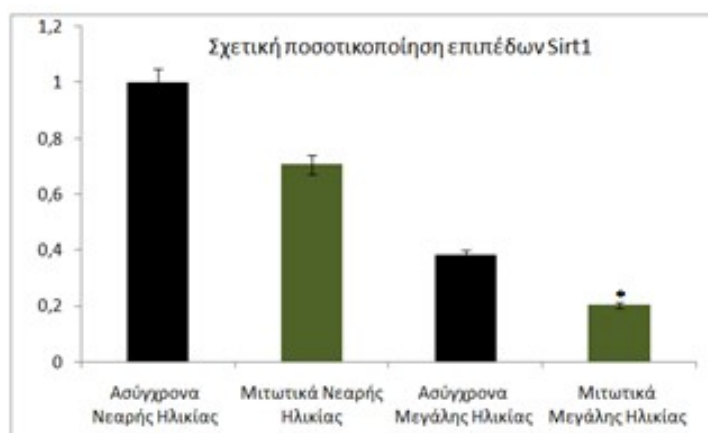
- Στα μιτωτικά κύτταρα νεαρής ηλικίας, παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών Bub1b, Mad2, σε σχέση με τα ασύγχρονα κύτταρα.
- Αντίθετα, στα μιτωτικά κύτταρα μεγαλύτερης ηλικίας αυτή η αύξηση δεν παρατηρείται. Ιδιαίτερα η Bub1b εμφανίζει μείωση σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα υποδηλώνοντας πιθανή διαταραχή της λειτουργικότητας του SAC.

7.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων SIRT1 σε κύτταρα που έχει συλλέχθουν έπειτα από την επίδραση νοκοδαζόλης και ασύγχρονα κύτταρα..



Εικόνα 18: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη Sirt1 σε μιτωτικά κύτταρα νεαρής και μεγάλης ηλικίας. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

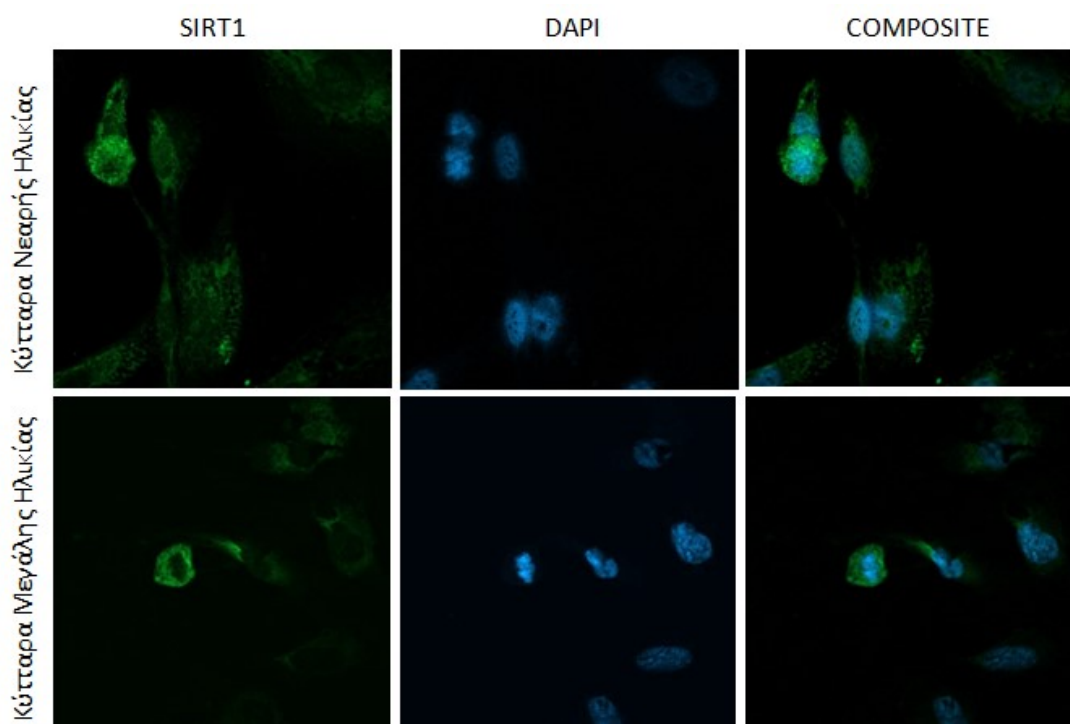
Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων πρωτεΐνης Sirt1 σε κύτταρα που επάχθηκε μίτωση



Διάγραμμα 6: Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων της πρωτεΐνης Sirt1 σε σχέση με την β-ακτίνη, σε κύτταρα που έχει επαχθεί μίτωση (ασύγχρονα και μιτωτικά). Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως Loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

- Στα νεαρής ηλικίας κύτταρα τα μιτωτικά εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα από τα ασύγχρονα όπως και της μεγάλης ηλικίας.
- Τα μιτωτικά μεγάλης ηλικίας εμφανίζουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα σε σχέση με της νεαρής ηλικίας.

7.6 Ανίχνευση υποκυτταρικού εντοπισμού sirt1



Εικόνα 19 : Εικόνες μικροσκοπίου μετά από έμμεσο ανοσοφθορισμό σε νεαρής και μεγάλης ηλικίας κύτταρα υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας. Με πράσινο εμφανίζεται η Sirt1 ενώ με DAPI έγινε χρώση των πυρήνων.

- Μείωση της έντασης της Sirt1 σε κύτταρα μεγάλης ηλικίας σε σχέση με τα κύτταρα νεαρής ηλικίας.
- Στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας η τοπολογία της είναι λιγότερο έντονη στον πυρήνα κατά την μίτωση σε σχέση με τα κύτταρα νεαρής ηλικίας

8. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η σχέση της Sirt1 με το Spindle Assembly Checkpoint (SAC) και η πιθανή επίδραση της σχέσης αυτής στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης αποτελεί αντικείμενο εν εξελίξει μελέτης. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η διερεύνηση αυτής της σχέσης. Αρχικά, η ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων επιβεβαιώθηκε μέσω μέτρησης της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία ήταν σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας. Παράλληλα, εξετάστηκε η έκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21, η οποία επίσης ήταν αυξημένη στα γηρασμένα κύτταρα.

Για την παύση των κυττάρων στη μίτωση χρησιμοποιήθηκε νοκοδαζόλη για να διακοπεί η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Fang et al., 1998). Η επιτυχής διακοπή της μίτωσης επαληθεύτηκε με τη μέτρηση των επιπέδων της Κυκλίνης B1, ενός καθιερωμένου δείκτη της μιτωτικής φάσης. Στα μιτωτικά κύτταρα νεαρής ηλικίας παρατηρήθηκε αύξηση της Κυκλίνης B1, ενώ στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας τα επίπεδα ήταν χαμηλότερα, υποδεικνύοντας αποτυχία παύσης του κυτταρικού κύκλου, και ένδειξη πιθανής δυσλειτουργίας του SAC.

Μία προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι το οξειδωτικό στρες (OS) μπορεί να υπερβεί το Spindle Assembly Checkpoint (SAC) (V. D'angiolella, et al., 2007). Δεδομένης της αύξησης του OS στην μεγάλη ηλικία των κυττάρων είναι πιθανό η δυσλειτουργία που παρατηρήθηκε να οφείλεται σε αυτό, όπως και προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας έχει δείξει (Goutas, Outskouni et al., 2023).

Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα κύτταρα μεγάλης ηλικίας εμφανίζουν μειωμένη έκφραση της Sirt1, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., & Min, K. J. 2019). Μελετήθηκε επιπλέον, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Sirt1 με ανοσοφθορισμό σε μιτωτικά κύτταρα νεαρής και μεγάλης ηλικίας. Στα νεαρά μιτωτικά κύτταρα, η Sirt1 εμφανίστηκε έντονη και κυρίως εντοπισμένη στον πυρήνα, ενώ στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας παρατηρήθηκε μειωμένος φθορισμός και περιορισμένη κατανομή μέσα στο κύτταρο, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των πρωτεϊνικών μετρήσεων.

Η μελέτη του SAC επικεντρώθηκε στις πρωτεΐνες Bub1b και Mad2, βασικά στοιχεία του MCC, που ρυθμίζουν την πρόοδο της μίτωσης. Στα μιτωτικά κύτταρα νεαρής ηλικίας παρατηρήθηκε αύξηση των δύο πρωτεϊνών, ενώ στα μιτωτικά κύτταρα μεγάλης ηλικίας καταγράφηκε σημαντική μείωση, ιδιαίτερα της Bub1b. Η Bub1b/BubR1 υπόκειται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση, sumoylation, ουβικιτινίωση και ακετυλίωση. Η ακετυλίωση από την CREB Binding Protein λειτουργεί ως σήμα για την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος (Fang et al., 2006). Έχει δειχθεί ότι η Sirt2 αποακετυλιώνει την Bub1b/BubR1, προστατεύοντάς την από αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος και ενισχύοντας τη λειτουργία της στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (North et al., 2014).

Κατά τη γήρανση όμως, η λειτουργία του πρωτεασώματος μειώνεται, ενώ αυξάνει η αυτοφαγία. Η Bub1b διαθέτει την περιοχή xLIR (LC3-interacting region), που την καθιστά πιθανό υπόστρωμα της αυτοφαγίας. Αυτή η μετατόπιση από το πρωτεάσωμα στην αυτοφαγία επιβάλλει ένα νέο μηχανισμό ρύθμισης ως ασφαλιστική δικλίδα για την διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας και καθώς θα κύτταρα γερνούν. Η Sirt1 θα μπορούσε να προσφέρει έναν τέτοιο μηχανισμό: να

αναλαμβάνει την επιλεκτική αποακετυλίωση κατά την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων προστατεύοντας από την αυτοφαγική αποικοδόμηση-που αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας- το Bub1b, εμποδίζοντας την αναγνώρισή της από το αυτοφαγικό σύστημα. Ωστόσο, η μείωση της Sirt1 στα γηρασμένα κύτταρα, και ιδιαίτερα η σημαντικότερη μείωση κατά την μίτωση, πιθανά να οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα της Bub1b λόγω διατήρησης της ακετυλίωσης των ιστονών στην περιοχή του προαγωγέα της και άρα μειωμένης έκφρασης.

Η δραματική μείωση στα επίπεδα Bub1b κατά τη μίτωση των μεγάλων σε ηλικία κυττάρων που παρατηρούμε πιθανά οφείλεται και σε έναν επιπλέον μηχανισμό: το Bub1b πιθανά μετατρέπεται σταδιακά σε υπόστρωμα της Sirt1 ώστε να προστατευτεί από την αυτοφαγία μέσω αποακετυλίωσης και τελικά γίνεται υπόστρωμά της όταν τα επίπεδα της Sirt1 μειωθούν σημαντικά.

Συμπερασματικά, ο μηχανισμός που προτείνουμε υποστηρίζει ότι η αποδυνάμωση του SAC μέσω μειωμένης Bub1b λειτουργεί ως μηχανισμός προστασίας, προκαλώντας σοβαρά μιτωτικά λάθη που επιταχύνουν την εγκαθίδρυση της γήρανσης αποτρέποντας την καρκινογένεση.

Μελλοντικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί η άμεση αλληλεπίδραση της Sirt1 με την Bub1b μέσω συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-immunoprecipitation). Παράλληλα, η χρήση ενισχυτών ή αναστολέων της Sirt1 θα μπορούσε να αξιολογήσει την επίδρασή της στη μίτωση και στη λειτουργία του SAC. Τέλος, η στοχευμένη σίγηση της Sirt1 θα επέτρεπε την εκτίμηση της συμβολής της στη μιτωτική διαδικασία και στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης.

9. Βιβλιογραφία :

- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., ... Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*, 15(8), 978–990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Alison, M. R., & Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. *The Journal of pathology*, 217(2), 144–160. <https://doi.org/10.1002/path.2498>
- Almeida, M., & Porter, R. M. (2019). Sirtuins and FoxOs in osteoporosis and osteoarthritis. *Bone*, 121, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.01.018>
- Alves-Fernandes, D. K., & Jasiulionis, M. G. (2019). The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3153. <https://doi.org/10.3390/ijms20133153>
- Aratikatla, A., Maffulli, N., Gupta, M., Potti, I. A., Potty, A. G., & Gupta, A. (2024). Wharton's jelly and osteoarthritis of the knee. *British medical bulletin*, 149(1), 13–31. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldad030>
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & de Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 24(2), 98–105. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Bishr, A., Atwa, A. M., El-Mokadem, B. M., & El-Din, M. N. (2025). Canagliflozin potentially promotes renal protection against glycerol-induced acute kidney injury by activating the AMPK/SIRT1/FOXO-3a/PGC-1α and Nrf2/HO-1 pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 10.1007/s00210-025-04017-x. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00210-025-04017-x>
- Blagosklonny M. V. (2012). Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging*, 4(3), 159–165. <https://doi.org/10.18632/aging.100443>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacological reviews*, 64(1), 166–187. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney international supplements*, 1(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premrurit, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., & Lowe, S. W. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-κB promotes senescence and enhances

chemosensitivity. *Genes & development*, 25(20), 2125–2136.
<https://doi.org/10.1101/gad.17276711>

Cirillo, L., Young, R., Veerapathiran, S., Roberti, A., Martin, M., Abubacar, A., Perosa, C., Coates, C., Muhammad, R., Roumeliotis, T. I., Choudhary, J. S., Alfieri, C., & Pines, J. (2024). Spatial control of the APC/C ensures the rapid degradation of cyclin B1. *The EMBO journal*, 43(19), 4324–4355. <https://doi.org/10.1038/s44318-024-00194-2>

Cohen S. (2004). Social relationships and health. *The American psychologist*, 59(8), 676–684.
<https://doi.org/10.1037/0003-066X.59.8.676>

Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), 29568–29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12), 2853–2868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>

D'Angiolella, V., Santarpia, C., & Grieco, D. (2007). Oxidative stress overrides the spindle checkpoint. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.), 6(5), 576–579.
<https://doi.org/10.4161/cc.6.5.3934>

Debacq-Chainiaux, F., Ben Ameer, R., Bauwens, É., Dumortier, É., Toutfaire, M., & Toussaint, O. (2016). Stress-Induced (Premature) Senescence. In S. Rattan, & L. Hayflick (Eds.), *Cellular Ageing and Replicative Senescence* (Vol. 4, pp. 243). (Healthy Aging and Longevity; Vol. 4). Springer.

Delmonico, L., Moreira, A. dos S., Franco, M. F., Esteves, E. B., Scherrer, L., Gallo, C. V., do Nascimento, C. M., Ornellas, M. H., de Azevedo, C. M., & Alves, G. (2015). CDKN2A (p14(ARF)/p16(INK4a)) and ATM promoter methylation in patients with palpable breast lesions. *Human pathology*, 46(10), 1540–1547.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.06.016>

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., Vercamer, C., Hot, D., Pourtier, A., Chevet, E., Abbadie, C., & Pluquet, O. (2016). ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in

human fibroblasts. *Oncotarget*, 7(42), 67699–67715.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11505>

Dyson N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & development*, 12(15), 2245–2262. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2245>

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817–825. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90500-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90500-p)

Elting, M. W., Prakash, M., Udy, D. B., & Dumont, S. (2017). Mapping Load-Bearing in the Mammalian Spindle Reveals Local Kinetochore Fiber Anchorage that Provides Mechanical Isolation and Redundancy. *Current biology : CB*, 27(14), 2112–2122.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.018>

Fang, G., Yu, H., & Kirschner, M. W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & development*, 12(12), 1871–1883. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1871>

Fleifel, D., & Cook, J. G. (2023). G1 Dynamics at the Crossroads of Pluripotency and Cancer. *Cancers*, 15(18), 4559. <https://doi.org/10.3390/cancers15184559>

Frescas, D., Roux, C. M., Aygun-Sunar, S., Gleiberman, A. S., Krasnov, P., Kurnasov, O. V., Strom, E., Virtuoso, L. P., Wrobel, M., Osterman, A. L., Antoch, M. P., Mett, V., Chernova, O. B., & Gudkov, A. V. (2017). Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9), E1668–E1677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614661114>

Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, 23(11), 2066–2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4), 331–340. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>

Goutas, A., Outskouni, Z., Papathanasiou, I., Georgakopoulou, A., Karpetas, G. E., Gonos, E. S., & Trachana, V. (2023). The establishment of mitotic errors-driven senescence depends on autophagy. *Redox biology*, 62, 102701. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102701>

Gu, L., Liu, M., Zhang, Y., Zhou, H., Wang, Y., & Xu, Z. X. (2024). Telomere-related DNA damage response pathways in cancer therapy: prospective targets. *Frontiers in pharmacology*, 15, 1379166. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1379166>

- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805–816. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-g)
- HAYFLICK, L., & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hayakawa, T., Iwai, M., Aoki, S., Takimoto, K., Maruyama, M., Maruyama, W., & Motoyama, N. (2015). SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PloS one*, 10(1), e0116480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116480>
- Helmke, K. J., Heald, R., & Wilbur, J. D. (2013). Interplay between spindle architecture and function. *International review of cell and molecular biology*, 306, 83–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407694-5.00003-1>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Holland, A. J., & Taylor, S. S. (2006). Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *Journal of cell science*, 119(Pt 16), 3325–3336. <https://doi.org/10.1242/jcs.03083>
- Hubbard, B. P., & Sinclair, D. A. (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 35(3), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>
- Hyun, S. Y., & Jang, Y. J. (2015). p53 activates G₁ checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest. *Oncotarget*, 6(7), 4804–4815. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3103>
- Ilic, D., & Polak, J. M. (2011). Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British medical bulletin*, 98, 117–126. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr012>
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *The Journal of cell biology*, 202(1), 129–143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Jin, Y., Li, S., Yu, Q., Chen, T., & Liu, D. (2023). Application of stem cells in regeneration medicine. *MedComm*, 4(4), e291. <https://doi.org/10.1002/mco2.291>

- Kamal, M. M., & Kassem, D. H. (2020). Therapeutic Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for Diabetes: Achievements and Challenges. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00016>
- Kang, T. W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., ... Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10599>
- Kline-Smith, S. L., & Walczak, C. E. (2004). Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Molecular cell*, 15(3), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.012>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kulaberoglu, Y., Gundogdu, R., & Hergovich, A. (2016). The role of p53/p21/p16 in DNA-damage signaling and DNA repair. In *Genome Stability* (pp. 243–256). [Εκδότης]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803309-8.00015-X>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Lee, J. T., & Gu, W. (2013). SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes & cancer*, 4(3-4), 112–117. <https://doi.org/10.1177/1947601913484496>
- Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., & Min, K. J. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB reports*, 52(1), 24–34. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.290>
- Lentini, L., Barra, V., Schillaci, T., & Di Leonardo, A. (2012). MAD2 depletion triggers premature cellular senescence in human primary fibroblasts by activating a p53 pathway preventing aneuploid cells propagation. *Journal of cellular physiology*, 227(9), 3324–3332. <https://doi.org/10.1002/jcp.24030>
- Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A., & Sicinski, P. (2019). The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nature cell biology*, 21(9), 1060–1067. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0384-4>
- Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic

Potential. *International journal of stem cells*, 12(2), 218–226. <https://doi.org/10.15283/ijsc18034>

Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P., & Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), 1160–1166. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>

Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 23(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>

McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of cell biology*, 217(1), 65–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>

Mei, L., Kedziora, K. M., Song, E. A., Purvis, J. E., & Cook, J. G. (2022). The consequences of differential origin licensing dynamics in distinct chromatin environments. *Nucleic acids research*, 50(17), 9601–9620. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac003>

Michael, D., & Oren, M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in cancer biology*, 13(1), 49–58. [https://doi.org/10.1016/s1044-579x\(02\)00099-8](https://doi.org/10.1016/s1044-579x(02)00099-8)

Molofsky, A. V., Pardal, R., & Morrison, S. J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Current opinion in cell biology*, 16(6), 700–707. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.004>

Musacchio A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current biology : CB*, 25(20), R1002–R1018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.051>

Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of biomedical research*, 27(4), 254–271. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030>

Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x)

Ohtani N. (2022). The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis?. *Inflammation and regeneration*, 42(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00197-8>

Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Hayashi, M., & Inomata, M. (2010). Plasma membrane microdomains in aging and disease. *Geriatrics & gerontology international*, 10 Suppl 1, S41–S52. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2010.00600.x>

- Papageorgiou, A. A., Goutas, A., Trachana, V., & Tsezou, A. (2021). Dual Role of SIRT1 in Autophagy and Lipid Metabolism Regulation in Osteoarthritic Chondrocytes. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(11), 1203. <https://doi.org/10.3390/medicina57111203>
- Pluquet, O., Pourtier, A., & Abbadie, C. (2015). The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *American journal of physiology. Cell physiology*, 308(6), C415–C425. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2014>
- Popov, B., & Petrov, N. (2014). pRb-E2F signaling in life of mesenchymal stem cells: Cell cycle, cell fate, and cell differentiation. *Genes & diseases*, 1(2), 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.007>
- Prencipe, M., Fitzpatrick, P., Gorman, S., Tosetto, M., Klinger, R., Furlong, F., Harrison, M., O'Connor, D., Roninson, I. B., O'Sullivan, J., & McCann, A. (2009). Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness in vitro. *British journal of cancer*, 101(11), 1900–1908. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605419>
- Pun, R., & North, B. J. (2025). Role of spindle assembly checkpoint proteins in gametogenesis and embryogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 12, 1491394. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1491394>
- Reddy G. P. (1994). Cell cycle: regulatory events in G1→S transition of mammalian cells. *Journal of cellular biochemistry*, 54(4), 379–386. <https://doi.org/10.1002/jcb.240540404>
- Ren, J., Tang, C. Z., Li, X. D., Niu, Z. B., Zhang, B. Y., Zhang, T., Gao, M. J., Ran, X. Z., Su, Y. P., & Wang, F. C. (2018). Identification of G2/M phase transition by sequential nuclear and cytoplasmic changes and molecular markers in mice intestinal epithelial cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 17(6), 780–791. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1426416>
- Ren, Q., Liou, L. C., Gao, Q., Bao, X., & Zhang, Z. (2012). Bir1 deletion causes malfunction of the spindle assembly checkpoint and apoptosis in yeast. *Frontiers in oncology*, 2, 93. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00093>
- Ridge, S. M., Sullivan, F. J., & Glynn, S. A. (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular cancer*, 16(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0597-8>
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z., & Puigserver, P. (2008). Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS letters*, 582(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.034>
- Rosner, M., Horer, S., Feichtinger, M., & Hengstschläger, M. (2023). Multipotent fetal stem cells in reproductive biology research. *Stem cell research & therapy*, 14(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03379-4>
- Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R., Narita, M., Pérez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H., & Narita, M. (2013). Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains

and SAHF formation during senescence. *Genes & development*, 27(16), 1800–1808. <https://doi.org/10.1101/gad.217281.113>

Salminen, A., & Kaarniranta, K. (2012). AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing research reviews*, 11(2), 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.12.005>

Sanders, B. D., Jackson, B., & Marmorstein, R. (2010). Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(8), 1604–1616. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.009>

Schafer K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary pathology*, 35(6), 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>

Serra, S., & Chetty, R. (2018). p16. *Journal of clinical pathology*, 71(10), 853–858. <https://doi.org/10.1136/iclinpath-2018-205216>

Shepperd, L. A., Meadows, J. C., Sochaj, A. M., Lancaster, T. C., Zou, J., Buttrick, G. J., Rappsilber, J., Hardwick, K. G., & Millar, J. B. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Current biology : CB*, 22(10), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.051>

Singh, V., & Ubaid, S. (2020). Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation*, 43(5), 1589–1598. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01242-9>

Soudet, J., Jolivet, P., & Teixeira, M. T. (2014). Elucidation of the DNA end-replication problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*, 53(6), 954–964. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.030>

Stucke, V. M., Silljé, H. H., Arnaud, L., & Nigg, E. A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *The EMBO journal*, 21(7), 1723–1732. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1723>

Tao, Z., Jin, Z., Wu, J., Cai, G., & Yu, X. (2023). Sirtuin family in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 14, 1186231. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1186231>

Teixeira, J. H., Silva, P. M., Reis, R. M., Moura, I. M., Marques, S., Fonseca, J., Monteiro, L. S., & Bousbaa, H. (2014). An overview of the spindle assembly checkpoint status in oral cancer. *BioMed research international*, 2014, 145289. <https://doi.org/10.1155/2014/145289>

Tian, Z., Yu, T., Liu, J., Wang, T., & Higuchi, A. (2023). Introduction to stem cells. *Progress in molecular biology and translational science*, 199, 3–32. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.02.012>

Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M., & Remacle, J. (2002). Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 1007–1009. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01170-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01170-x)

Vaiserman, A., & Krasnienkov, D. (2021). Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Frontiers in genetics*, 11, 630186. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.630186>

Wang Z. (2021). Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells*, 10(12), 3327. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>

Wang Z. (2022). Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2579, 3–23. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_1

Welburn, J. P., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., 3rd, Lampson, M. A., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Molecular cell*, 38(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.034>

Wellinger R. J. (2014). In the end, what's the problem?. *Molecular cell*, 53(6), 855–856. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.008>

Wu, Q. J., Zhang, T. N., Chen, H. H., Yu, X. F., Lv, J. L., Liu, Y. Y., Liu, Y. S., Zheng, G., Zhao, J. Q., Wei, Y. F., Guo, J. Y., Liu, F. H., Chang, Q., Zhang, Y. X., Liu, C. G., & Zhao, Y. H. (2022). The sirtuin family in health and disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01257-8>