



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών κλειδιά του μιτωτικού σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (BubR1, Mad2) κατά τη γήρανση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων»**

**ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα) : Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Παν/μου Θεσσαλίας**

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Μέλος) : Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μου Θεσσαλίας  
ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος) :Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Παν/μου  
Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«Study of the expression of the key-proteins of Spindle  
Assembly Checkpoint (BubR1, Mad2) during the senescence  
of mesenchymal stem cells»**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και αποτελεί διπλωματική εργασία στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα και αποτέλεσαν σημαντικούς αρωγούς στην διεκπεραίωση της.

Αρχικά να ευχαριστήσω την κυρία Τσέζου (Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής και υπεύθυνη του προγράμματος) που με εμπιστεύτηκε και με δέχθηκε στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Επίσης, τον κύριο Δήμα ( Επικουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας) που συμμετείχε στην τριμελή επιτροπή μου και για τη συνεργασία σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Ανδρέα Γούτα, υποψήφιο διδάκτορα, για τη βοήθεια του, τη συμπαράσταση και την υπομονή καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης μου.

Τέλος, να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα μου, κυρία Τραχανά ( Επικουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας ) για την εμπιστοσύνη της, την αμέριστη συμπαράσταση της, την υποστήριξη και τη βοήθεια της (ακόμα και σε δύσκολες στιγμές) κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου. Η φιλικότητα της, όπως επίσης και οι πολύτιμες γνώσεις & καθοδήγηση της συνέβαλλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κύκλος ζωής ενός κυττάρου (κυτταρικός κύκλος) περιλαμβάνει μια αλληλουχία γεγονότων. Τα γεγονότα αυτά πρέπει να είναι χρονικά και τοπικά προσδιορισμένα και για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η ύπαρξη μηχανισμών ελέγχου. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint- SAC).

Το SAC ελέγχει αν έχει γίνει σωστά η σύνδεση των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο μη-σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Μη σωστός διαχωρισμός οδηγεί σε ανευπλοειδίες ή/και πολυπλοειδίες και κατ' επέκταση σε γενωμική αστάθεια. Δύο από τις κύριες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο SAC είναι η BubR1 και η Mad2. Και οι δυο συμμετέχουν στη σηματοδότηση που οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου μέχρις ότου γίνει η πρόσδεση όλων των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων με τους μικροσωληνίσκους.

Προηγούμενες μελέτες, και του εργαστηρίου μας, έχουν δείξει πως η κυτταρική γήρανση μπορεί να σχετίζεται με δυσλειτουργία του SAC. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να παρακάμπτει το SAC και να συνεχίζεται ο κυτταρικός κύκλος, ακόμα και αν υπάρχουν ελεύθεροι κινητοχώροι. Ο ακριβής μηχανισμός όπως επίσης και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτές τις λειτουργίες δεν είναι γνωστές με ακρίβεια.

Έτσι, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και SAC καθώς και της κυτταρικής γήρανσης και SAC σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από τη γέλη του Wharton (hMSC). Πιο συγκεκριμένα, έγινε επίδραση σε hMSC με οξειδωτικό μέσο σε διάφορα στάδια της «ζωής» τους (young cells, senescent cells). Ακολούθως απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες και το RNA των προαναφερθέντων γονιδίων για να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης τους. Επιπλέον μελετήθηκε η λειτουργία του SAC σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα υπό την επίδραση εξωγενούς οξειδωτικής προσβολής.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι κύτταρα που είχαν επωαστεί παρουσία οξειδωτικού στρες (υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$ ) αδυνατούν να διακόψουν τον κυτταρικό κύκλο υπό της επίδραση ταξόλης. Η ταξόλη είναι γνωστό ότι αλλάζει τη δομή των μικροσωληνίσκων και ως εκ τούτου προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου στη μετάφαση σε κύτταρα με λειτουργικό SAC. Επιπλέον υπό τις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της Mad2. Η αύξηση αυτή

παρατηρείται και υπό την επίδραση μόνο οξειδωτικού στρες σε νεαρά κύτταρα και ακολουθείται από μείωση των επιπέδων 24h μετά την επίδραση του στρες. Αντίθετα σε γηρασμένα κύτταρα η αύξηση των επιπέδων της Mad2 καθυστερεί να συμβεί ενώ τα επίπεδά της διατηρούνται υψηλά ακόμη και 24h μετά την επίδραση του στρες. Ανάλογη διαφορά παρατηρούμε και στα επίπεδα του BubR1 ενώ και τα δύο γονίδια αυξάνουν τα επίπεδά τους καθώς τα κύτταρα γερνούν.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι α) το SAC δυσλειτουργεί παρουσία οξειδωτικού στρες και β) η απόκριση των SAC πρωτεϊνών στο οξειδωτικό στρες είναι διαφορετική μεταξύ νεαρών και γηρασμένων κυττάρων. Οι παρατηρήσεις μας αυτές θεωρούμε ότι είναι χρήσιμες προκειμένου να διαλευκανθεί η λειτουργία του SAC τόσο παρουσία στρες όσο και κατά τη γήρανση των βλαστοκυττάρων. Η πλήρης κατανόηση αυτών των λειτουργιών θα συμβάλει στην βελτίωση των κυτταρικών θεραπειών, που εξαρτώνται από τη χρήση μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων.

## ABSTRACT

Cell cycle is a number of facts that should happen at the right time and the right place. This is the reason why there have to be some cell cycle checkpoints. One of these checkpoints is the Spindle Assembly Checkpoint (SAC).

The Spindle Assembly Checkpoint controls if kinetochores of chromosomes are attached to the microtubules of the mitotic spindle. In this way, wrong segregation of chromosomes during mitosis can be avoided. Wrong segregation may lead to aneuploidy or/and polyploidy which lead to genomic instability. Two of the most important proteins that compose the complex of SAC are BubR1 and Mad2. Both of them have the ability to stop cell cycle until all kinetochores of chromosomes are attached to the microtubules.

Previous studies, some of them come from our laboratory, have shown that senescence is related to loss-of-function of SAC. Oxidative stress may override SAC and cell cycle continues even if there are free kinetochores. The exact mechanism and the proteins that take part in these functions are unknown in detail. In this study, we focused on the relation between oxidative stress and SAC and the relation between senescence and SAC in mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly (hMSC). We induced oxidative stress in this kind of stem cells with treatment with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in different stages of their life (young cells, senescent cells). Proteins and RNA of the genes that were referred before (Mad2, BubR1) were extracted from the cells so that we can study their expression levels. Moreover, we studied the function of SAC in young and senescent cells under the influence of exogenous oxidative stress.

Our results showed that cells that have been treated with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), are under oxidative stress and they do not have the ability to interrupt cell cycle when they are treated with spindle poisons (like taxol). It is widely known that taxol can change the structure of the microtubules and in result it can stop cell cycle in metaphase of mitosis, in cells with functional SAC. Under the same circumstances there is a rise in the levels of Mad2. This rise happens under the effect of oxidative stress only, in young cells and is followed by decrease of these levels 24 hours under the effect of stress. In contrast, in senescent cells the rise in levels of Mad2 delays to happen and these levels stay high 24 hours later. The same pattern is observed in the levels of BubR1. Both genes show a rise in their levels when cells become senescent. All these results show that (a) SAC is not functional in presence of oxidative stress and (b) the response of SAC proteins to oxidative stress is different between young cells and senescent cells. We believe that these observations are very useful in order to clarify the function of SAC in presence of oxidative stress and also during senescence of stem cells. The full understanding of these functions will contribute to improvement of cell-based therapies that are dependent on the use of mesenchymal cells.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μιτωτικό σημείο ελέγχου ή σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC)
  - a) Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου (Cell Cycle & Cell Cycle Checkpoints).
  - b) Μιτωτικό σημείο ελέγχου κυτταρικού κύκλου (Spindle Assembly Checkpoint- SAC).
  - c) Ο μηχανισμός του SAC.
2. Οξειδωτικό στρες
3. Οξειδωτικό στρες και SAC
4. Κυτταρική γήρανση και οξειδωτικό στρες
5. Βλαστοκύτταρα
6. Σκοπός

## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση Βλαστοκυττάρων.
2. Καλλιέργειες βλαστοκυττάρων.
  - 2.1 Υλικά καλλιέργειας.
  - 2.2 Συνθήκες καλλιέργειας.
  - 2.3 Πρωτόκολλο καλλιέργειας.
3. Επίδραση εξωγενούς οξειδωτικού στρες σε 6-well plates.
4. Απομόνωση πρωτεϊνών.
  - 4.1 Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών.
  - 4.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών.
  - 4.3 Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bradford Assay).
5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS
  - 5.1 Αποδιάταξη πρωτεϊνών
  - 5.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών
6. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western blot.
  - 6.1 Υλικά ανοσο-αποτύπωσης πρωτεϊνών.
  - 6.2 Πρωτόκολλο ανοσο-αποτύπωσης πρωτεϊνών.
7. Απομόνωση RNA.
  - 7.1 Υλικά απομόνωσης RNA
  - 7.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA



8. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).
  - 8.1 Υλικά για τη σύνθεση cDNA
  - 8.2 Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA
9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

1. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA του γονιδίου BubR1.
2. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης Mad2 (μέσω Western Blot) μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.
3. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης Mad2 (μέσω Western Blot) μετά από επίδραση των κυττάρων με ταξόλη και πρόκληση οξειδωτικού στρες.

## **Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

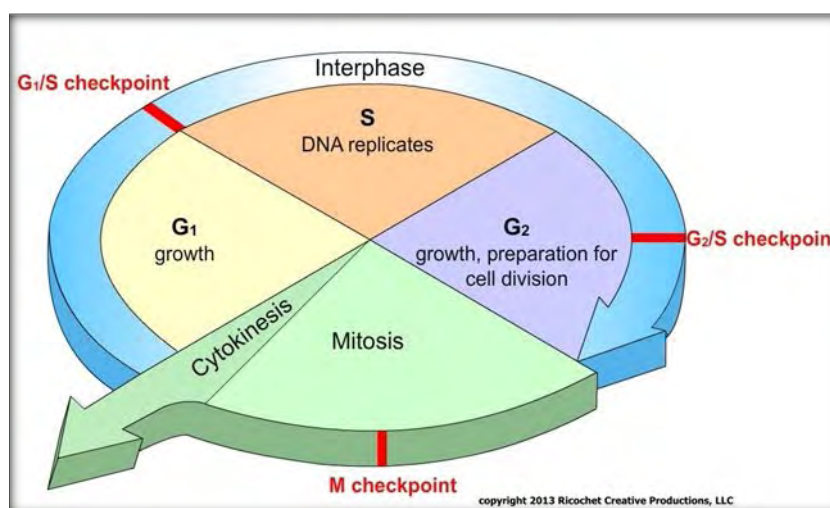
## **Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## (A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### (1) Μιτωτικό σημείο ελέγχου ή σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint- SAC)

#### (a) Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου (Cell Cycle & Cell Cycle Checkpoints).

Ο κυτταρικός κύκλος είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή που το κύτταρο διαιρείται μέχρι τη στιγμή που τα θυγατρικά του θα διαιρεθούν, δίνοντας τους απογόνους τους. Ο κυτταρικός κύκλος διαιρείται σε δύο φάσεις τη μεσόφαση και τη μίτωση όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Cancer, Cell Biology, Featured, Genetics.

Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το κύτταρο προετοιμάζεται για την επικείμενη διαίρεση του και παρατηρείται έντονη βιοχημική δραστηριότητα. Περιλαμβάνει 3 φάσεις: την G1 που προηγείται της σύνθεσης του DNA και κατά την οποία το κύτταρο προετοιμάζεται για την κυτταρική διαίρεση, αυξάνοντας τη μάζα του· την S, κατά την οποία συντίθεται το DNA και την G2, η οποία προηγείται της πρόφασης. Στην τελευταία φάση, το κύτταρο συνθέτει πρωτεΐνες και εξακολουθεί να αυξάνεται σε μέγεθος. Σε αντίθεση με το γενετικό υλικό η σύνθεση των οργανιδίων πραγματοποιείται σε όλη τη διάρκεια της μεσόφασης. Στο τέλος αυτής της φάσης τα χρωμοσώματα του κυττάρου έχουν διπλασιαστεί και συναντώνται με τη μορφή της χρωματίνης. Κατά τη φάση M συμβαίνει η μίτωση, η διαίρεση δηλαδή των χρωμοσωμάτων στα δύο θυγατρικά κύτταρα. (MITCHISON, 1957)

Οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου συμπεριλαμβάνουν έναν πλήθος διεργασιών οι οποίες εν τέλει οδηγούν στο διπλασιασμό του κυττάρου. Η σειρά και η ακριβής χρονική στιγμή που θα συμβούν αυτά τα γεγονότα, είναι μεγάλης σημασίας, έτσι ώστε να είναι πλήρως συντονισμένα μεταξύ τους. Όπως γίνεται αντιληπτό, είναι

απαραίτητη η ύπαρξη μηχανισμών που θα ελέγχουν την εύρυθμη λειτουργία αυτών των γεγονότων. Υπάρχουν συνεπώς τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Cell Cycle Checkpoints) τα οποία έχουν είτε ανασταλτικό είτε διεγερτικό αντίκτυπο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Λειτουργούν ως βιοαισθητήρες ενδοκυττάρων αρνητικών σημάτων και επιτρέπουν ή εμποδίζουν τη μετάβαση στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα κυριότερα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Cell Cycle Checkpoints) είναι τα εξής:

1. **G1 Checkpoint:** Σε αυτό το στάδιο ελέγχεται αν οι ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια συνθήκες είναι ευνοϊκές, έτσι ώστε το κύτταρο να αρχίσει να συνθέτει οργανίδια και πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο προωθείται στο επόμενο στάδιο του κυτταρικού κύκλου όπου γίνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού. (Cross, 1988) (Nash *et al.*, 1988)
2. **G2 Checkpoint:** Σε αυτό το σημείο ελέγχεται αν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή του γενετικού υλικού και αν έχει πραγματοποιηθεί σωστά. Ελέγχονται ξανά και οι συνθήκες του περιβάλλοντος ώστε να προχωρήσει στο επόμενο στάδιο ο κυτταρικός κύκλος. (Nurse, 1975), (Moreno, Nurse and Russell, 1990)
3. **Μιτωτικό σημείο ελέγχου ή σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint-SAC):** Ελέγχεται η ακεραιότητα και η λειτουργικότητα της μιτωτικής «συσκευής». Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ο σωστός διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων στα θυγατρικά κύτταρα και αποφεύγονται οι ανευπλοειδίες. (Wittmann, Hyman and Desai, 2001)
4. **DNA-damage Checkpoint:** Ελέγχεται η ακεραιότητα του γενετικού υλικού.

#### **(b) Μιτωτικό σημείο ελέγχου κυτταρικού κύκλου (Spindle Assembly Checkpoint- SAC).**

Στην παρούσα εργασία, θα δοθεί έμφαση στο μιτωτικό σημείο ελέγχου ( Spindle Assembly Checkpoint- SAC). Η μίτωση διαιρείται σε 4 στάδια: πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση & τελόφαση. Στη μετάφαση, τα χρωμοσώματα (καθένα από τα οποία αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες) έχουν διαταχθεί στο ισημερινό επίπεδο και είναι έτοιμα να διαχωριστούν. Η αδελφή χρωματίδα από κάθε χρωμόσωμα θα κινηθεί προς τον έναν από τους δύο πόλους του κυττάρου, θα συμβεί διαχωρισμός και έτσι θα δημιουργηθούν δύο πανομοιότυπα γενετικά κύτταρα. Το SAC επεμβαίνει κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Vleugel *et al.*, 2012) και ελέγχει αν είναι όλες οι αδελφές χρωματίδες συνδεδεμένες στους κινητοχώρους. Στην περίπτωση που δεν ικανοποιείται αυτή η συνθήκη «κρατάει» το κύτταρο στο στάδιο πριν την ανάφαση και αποτρέπει την κυτταρική διαίρεση. Η αναστολή του κύκλου μέχρι να συνδεθούν όλα τα χρωμοσώματα με τους μικροσωληνίσκους εξασφαλίζει ότι δεν θα συμβεί μη σωστός διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων. Συνεπώς, το μιτωτικό σημείο ελέγχου αποτρέπει τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων παρουσία μη συνδεδεμένων κινητοχώρων ή λανθασμένα ενωμένων χρωμοσωμάτων. Προάγει λοιπόν την γενωμική σταθερότητα και προστατεύει από αλλαγές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων και τις συνέπειες που ακολουθούν (Santaguida and Amon, 2015).

Όπως και στα υπόλοιπα σηματοδοτικά μονοπάτια, έτσι και σε αυτό, υπάρχει ένας αισθητήρας ο οποίος αντιλαμβάνεται την «σύνδεση» των χρωμοσωμάτων με την μιτωτική άτρακτο καθώς και ένα σύστημα -τελεστής το οποίο στοχεύει στην

επιδιόρθωση αυτής της λανθασμένης κατάστασης (στοχεύει την βασική κυτταρική συσκευή). Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση διάφορων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι είναι ο κύριος ρυθμιστής της σηματοδότησης που επάγεται από το SAC (Lara-Gonzalez, Westhorpe and Taylor, 2012), (Foley and Kapoor, 2013). Ο τελεστής του SAC ονομάζεται Mitotic Checkpoint Complex (MCC) και στοχεύει το σύμπλοκο που προάγει την ανάφαση (APC/C). Το APC/C είναι μια λιγάση που προωθεί την έξοδο από την μίτωση, προσθέτει μια σειρά από ουβικουτίνες σε δύο υποστρώματα: την κυκλίνη B και την σεκιουρίνη ( Cyclin B & Securin) και , προωθεί την καταστροφή τους από το πρωτεάσωμα. (Primorac and Musacchio, 2013), (Chang and Barford, 2014). Αναστέλλοντας το APC/C, το MCC σταθεροποιεί αυτά τα υποστρώματα και έτσι εμποδίζει την έξοδο από τη μίτωση.

Πιο συγκεκριμένα, οι αδελφές χρωματίδες στο στάδιο της μετάφασης είναι ενωμένες στο κεντρομερίδιο. Οι κινητοχώροι είναι πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία ενώνονται με το κεντρομερίδιο της κάθε χρωματίδας και με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Με άλλα λόγια είναι οι «διαμεσολαβητές» της ένωσης μικροσωληνίσκων – χρωμοσωμάτων (Fukagawa and Earnshaw, 2014), (Cheeseman, 2014). Όλες οι πρωτεΐνες του SAC στρατολογούνται στους κινητοχώρους κατά τη μετάφαση (Howell *et al.*, 2004) , κατά κύριο λόγο όμως η Mad1, Mad2 & η Mps1, όπως επίσης και η BubR1. Η BubR1 είναι μια πρωτεϊνική κινάση η οποία απαιτείται για τον έλεγχο SAC (Chan, Schaar and Yen, 1998). Αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει απευθείας το Cdc20 (Yao *et al.*, 2000), (Skoufias *et al.*, 2001), (Tang *et al.*, 2001). Παρόλα αυτά η λειτουργική σημασία της φωσφορυλίωσης παραμένει άγνωστη (Wu *et al.*, 2000). Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι ανασυνδυασμένη BubR1 έχει την ικανότητα αναστολής του Cdc20-APC και ότι αυτή η αναστολή είναι ανεξάρτητη από την δραστικότητα κινάσης της BubR1, διότι ακόμα και η μεταλλαγμένη BubR1 (χωρίς ικανότητα φωσφορυλίωσης) έχει ικανότητα αναστολής του συμπλόκου (Tang *et al.*, 2001).

Αυτό το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου έχει διαφορετικό δυναμικό δράσης, ανάλογα με τις συνθήκες που το επάγουν (ενεργοποιούν) (Santaguida *et al.*, 2011). Με άλλα λόγια, η διαφορά στην απόδοση του, αντανακλά τον αριθμό των μη – συνδεδεμένων κινητοχώρων, το οποίο εν τέλει καθορίζει και τον ρυθμό σύνθεσης του συμπλόκου MCC (Dick and Gerlich, 2013). Συνεπώς, όσο πιο «σοβαρές» είναι οι συνθήκες, τόσο πιο έντονη είναι η απόκριση του SAC.

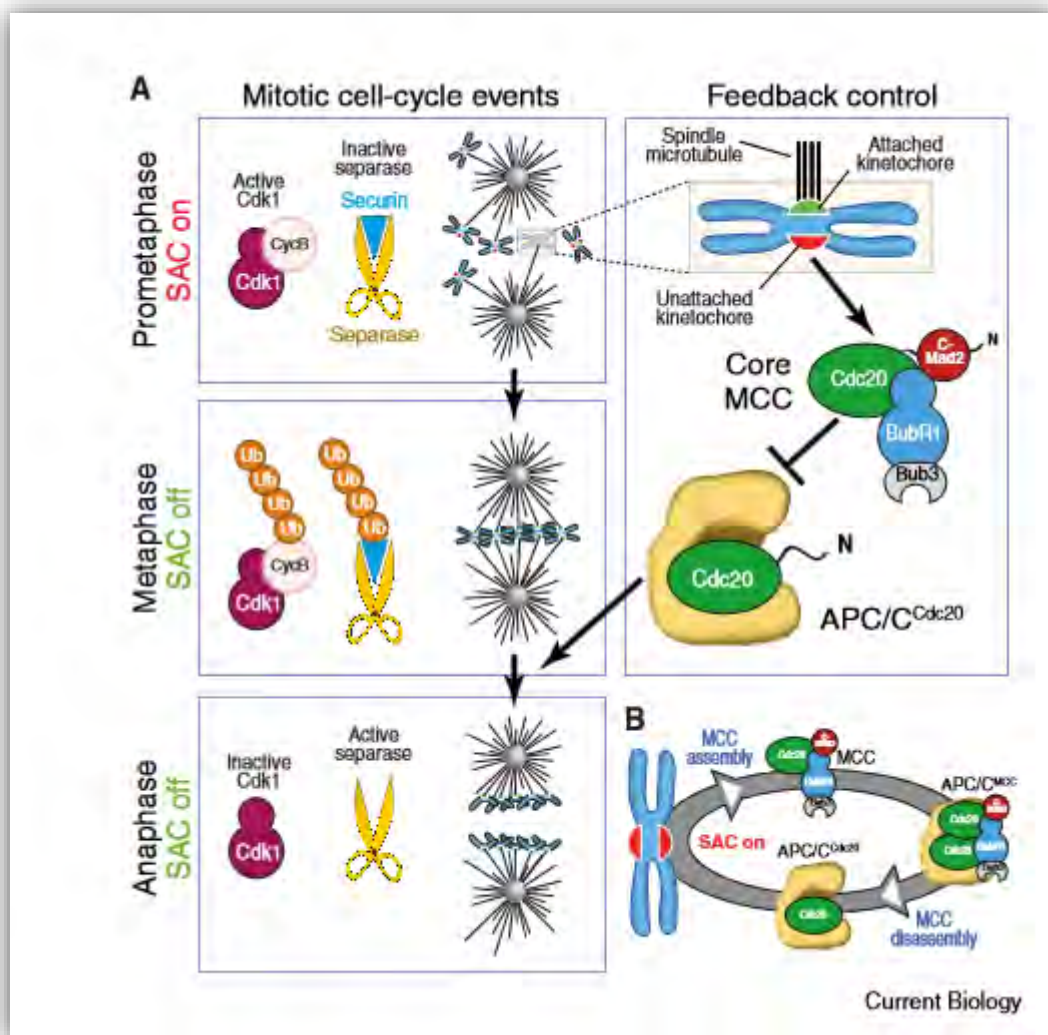
### (c) Ο μηχανισμός του SAC.

- Η μίτωση επάγεται από την ενεργοποίηση του συμπλόκου Cdk1-CyclinB. Το SAC είναι ενεργό κατά την προμετάφαση, όταν τα χρωμοσώματα συνδέονται με την μιτωτική άτρακτο. Η σύνδεση αυτή περιλαμβάνει τους κινητοχώρους. Όταν οι κινητοχώροι έχουν προσδεθεί σωστά (πράσινο στην εικόνα 2) «ικανοποιείται» το SAC και σταματάει η σηματοδότηση του. Μη συνδεδεμένοι ή λανθασμένα συνδεδεμένοι κινητοχώροι (κόκκινο στην εικόνα 2) «εκπέμπουν» το σήμα του SAC. Το MCC, που είναι ο τελεστής του SAC, ξεκινάει από τους κόκκινους-μη συνδεδεμένους κινητοχώρους. Προσδένεται στο σύμπλοκο APC/C<sup>Cdc20</sup> και το αναστέλλει. Το σύμπλοκο APC/C<sup>Cdc20</sup> είναι απαραίτητο για να γίνει η μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση. Από τη στιγμή που αναστέλλεται από το MCC, η μετάβαση αυτή είναι αδύνατη και έτσι το κύτταρο δεν μεταβαίνει στην ανάφαση. Μόλις «ικανοποιηθεί» το SAC σε όλους τους κινητοχώρους , ενεργοποιείται το σύμπλοκο APC/C<sup>Cdc20</sup> το οποίο ουβικουτινώνει τις πρωτεΐνες Cyclin B & Securin και προκαλεί την πρωτεόλυση τους. Η καταστροφή τους, σημαίνει έξοδο από την

μίτωση, διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων μέσω της διάσπασης των δακτυλίων cohesin που κρατούν τις αδελφές χρωματίδες ενωμένες στο κεντρομερίδιο.

- Ακόμα και όταν το SAC είναι ενεργοποιημένο τα μονοπάτια που ενεργοποιούν και απενεργοποιούν το MCC συνυπάρχουν στο κύτταρο. Αυτό ίσως συμβαίνει για να είναι ευαίσθητη η απόκριση του SAC. Η συνεχόμενη παρουσία των «κόκκινων» κινητοχώρων απαιτείται για να υποστηρίξει ένα επαρκές ποσοστό της παραγωγής του MCC σε κάθε δεδομένη στιγμή για να συναντήσει την αποσυναρμολόγηση του MCC.

Το σύμπλοκο MCC δημιουργείται από την αλληλεπίδραση τριών πρωτεϊνών του SAC: Mad2, BubR1/Mad3 & Bub3 με Cdc20 (Fraschini *et al.*, 2001), (Hardwick *et al.*, 2000), (Sudakin, Chan and Yen, 2001), (Hwang *et al.*, 1998), (Kim *et al.*, 1998).



Εικόνα 2: Ο μηχανισμός του SAC. Andrea Musacchio “The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signalling Dynamics”, *Curr. Biol.* Vol. 25, October 2015. (A) Η ενεργοποίηση του συμπλόκου των πρωτεϊνών Cdk1:Cyclin B προκαλεί την μίτωση. Το SAC είναι ενεργό κατά τη διάρκεια της προμετάφασης, όταν τα χρωμοσώματα προσδένονται στη μιτωτική άτρακτο. Η πρόσδεση αυτή συμπεριλαμβάνει τους κινητοχώρους. Οι σωστά συνδεδεμένοι κινητοχώροι (πράσινο στην εικόνα) ικανοποιούν το SAC και με αυτόν τον τρόπο σταματάει η σηματοδότηση. Μη- συνδεδεμένοι ή λανθασμένα συνδεδεμένοι κινητοχώροι (κόκκινο στην εικόνα) ενισχύουν την σηματοδότηση για να ενεργοποιηθεί το SAC. Ο τελεστής του SAC είναι το MCC και φαίνεται να ξεκινάει από τους κόκκινους κινητοχώρους. Προσδένεται και αναστέλλει το σύμπλοκο APC/Cdc20 το οποίο είναι απαραίτητο για να γίνει η μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση. Αναστολή του APC/Cdc20

εμποδίζει την είσοδο στην ανάφαση. Όταν το SAC ικανοποιείται σε όλους τους κινητοχώρους (στην μετάφαση), η ενεργοποίηση του APC/CCdc20 προωθεί την ουβικουτίνωση άρα και την πρωτεόλυση της κυκλίνης B (Cyclin B) και της σεκιουρίνης (securin). Η καταστροφή τους σηματοδοτεί την έξοδο από την μίτωση και το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων.

(B) Ακόμα και κατά την ενεργοποίηση του SAC, τα μονοπάτια της παραγωγής και απενεργοποίησης του MCC συνυπάρχουν μέσα στο κύτταρο. Αυτό ίσως να είναι προαπαιτούμενο για να υπάρχει σωστή απόκριση του SAC: η συνεχόμενη παρουσία κόκκινων κινητοχώρων απαιτείται για να υποστηριχθεί ένα υψηλό ποσοστό παραγωγής του MCC σε κάθε δεδομένη στιγμή, για να αντισταθμίσει την αποσυναρμολόγηση του MCC.

Η πολυ-ουβικουτίνωση της κυκλίνης B (Cyclin B) και της σεκιουρίνης (Securin) από το APC/C απαιτεί κάποια σήματα τα οποία περιλαμβάνουν την αναγνώριση κάποιων χαρακτηριστικών δομών από το Cdc20. Το MCC παρεμποδίζει την αναγνώριση του υποστρώματος από το APC/C, επηρεάζοντας το Cdc20 (Chao *et al.*, 2012) (Herzog *et al.*, 2009). Πιο συγκεκριμένα, αυτό επιτυγχάνεται μέσω της Mad2 και των BubR1/Mad3. Η Mad2 αλληλεπιδρά απευθείας με το Cdc20 (Chao *et al.*, 2012). Η πρόσδεση της Mad2 στο Cdc20 διαταράσσει την αλληλεπίδραση του Cdc20 με το APC/C (Yu, 2007) αλλά το κυριότερο είναι ότι επιτρέπει την πρόσδεση της BubR1 στο Cdc20 (Kulukian, Han and Cleveland, 2009). Η BubR1 έχει κάποιες συγκεκριμένες δομές και μπορεί να λειτουργήσει ως ψευδο-υπόστρωμα για την Cdc20 (Burton and Solomon, 2007) (Chao *et al.*, 2012) (Sczaniecka *et al.*, 2008). Περαιτέρω αλληλεπιδράσεις της BubR1 με την Cdc20 παρεμποδίζουν στερεοχημικά την πρόσδεση του υποστρώματος στην Cdc20 (Chao *et al.*, 2012). Τέλος, έχει προταθεί πως μια επιπλέον δομή της BubR1 αλληλεπιδρά απευθείας με το APC/C και αυτό συνεισφέρει στην ανασταλτική δράση του MCC (Lara-Gonzalez *et al.*, 2011)

## (2) Οξειδωτικό στρες-Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου

Το μοριακό οξυγόνο είναι ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των αερόβιων οργανισμών. Είναι αναμενόμενος λοιπόν ο σχηματισμός τοξικών ανηγμένων ενδιάμεσων μορφών οξυγόνου (ενεργές μορφές οξυγόνου, Reactive Oxygen Species, ROS).

Το οξυγόνο διαθέτει 4 ηλεκτρόνια σθένους. Όταν προσλαμβάνει μόνο ένα, δύο ή τρία ηλεκτρόνια η αναγωγή είναι ατελής (διαθέτει μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στιβάδα) και με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). Το ασύζευκτο (-α) αυτό ηλεκτρόνιο (-α) καθιστά τις ROS ιδιαίτερα δραστικές. Μπορούν να σχηματίσουν ενδιάμεσα τοξικά προϊόντα και με αυτό τον τρόπο να διαταράξουν την εύρυθμη λειτουργία ή να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα).

Οι δραστικές ρίζες είναι φυσιολογικά προϊόντα του μεταβολισμού του κυττάρου (ενδογενείς πηγές). Υπάρχουν όμως και εξωγενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως για παράδειγμα η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι ξενοβιοτικές ουσίες, η άσκηση, η ηλιακή ακτινοβολία, το αλκοόλ, το κάπνισμα, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, τα βιομηχανικά απόβλητα, η σιλικόνη και τα μέταλλα. Ο ρόλος τους μπορεί να είναι ευεργετικός ή και βλαβερός για τα κύτταρα (Valko *et al.*, 2006). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η διαρροή ηλεκτρονίων από τις μιτοχονδριακές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, η φαγοκυττάρωση και τα ενδογενή ενζυμικά συστήματα (Lachance, Nakat and Jeong, 2001). Όταν βρίσκονται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις τότε λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια στη φυσιολογική απόκριση του κυττάρου στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στη φλεγμονή και είναι συνεπώς

ευεργετικές για το κύτταρο. Όταν τα επίπεδά των ROS όμως ξεπερνούν ένα ορισμένο όριο ασκούν βλαβερές επιδράσεις στα βιομόρια και είναι πιθανό να προκαλέσουν δυσμενείς συνέπειες όπως κυτταρικές ή ιστικές βλάβες. Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι απαραίτητο να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνει το αντιοξειδωτικό σύστημα των κυττάρων που περιλαμβάνει ανάμεσα σε άλλα και μια σειρά από αντι-οξειδωτικά ένζυμα. Τα κυριότερα από αυτά τα ένζυμα που βρίσκονται στην πρώτη γραμμή της αντι-οξειδωτικής κυτταρικής δράσης είναι:

- Η δισμουτάση τυ σουπεροξειδίου (SOD) , που καταλύει την αντίδραση:  
 $\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
- Η καταλάση, που καταλύει την αντίδραση:  
 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την αντίδραση:  
 $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βιολογική βλάβη , που αναφέρεται συνολικά ως οξειδωτικό στρες (Konacic and Jacintho, 2001), (Valko *et al.*, 2001). Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών ουσιών του κυττάρου. Οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντι-οξειδωτικών μηχανισμών (Klatt and Lamas, 2000). Η περίσσεια των δραστικών ριζών προκαλεί βλάβες στα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες ή το DNA, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία τους. Συνεπώς, το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι βλαβερές για το κύτταρο και τα συστατικά του. Βλάπτουν τα λιπίδια των μεμβρανών, το DNA και τις πρωτεΐνες διότι τα οξειδώνουν (Valko *et al.*, 2006), (Klatt and Lamas, 2000).

### **(3) Οξειδωτικό στρες και σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint- SAC)**

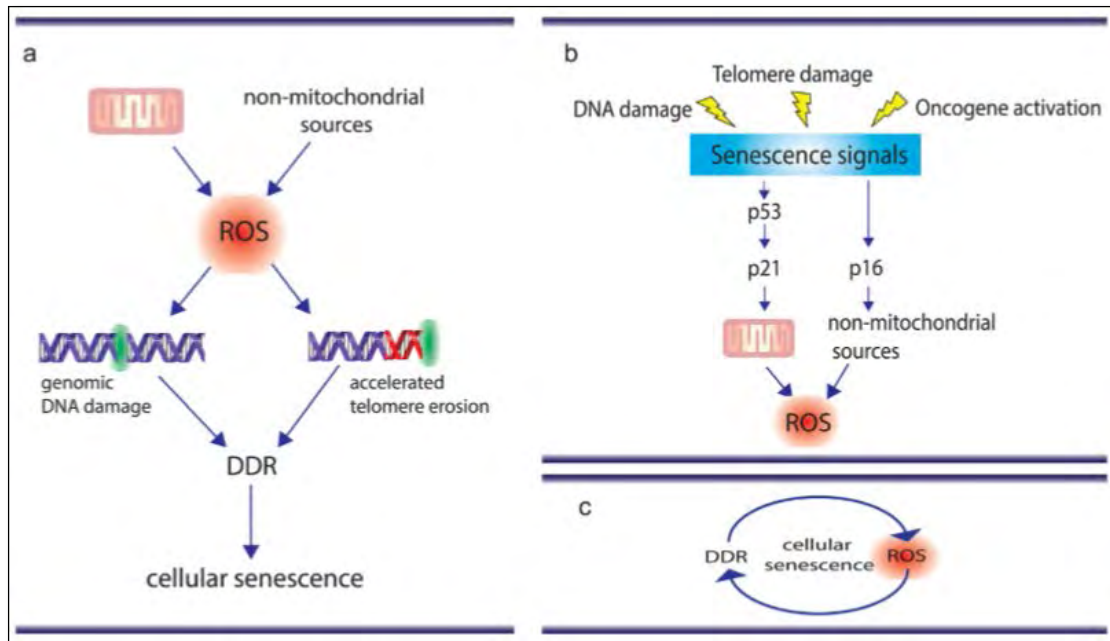
Το οξειδωτικό στρες και η σχέση του με το SAC είναι πολύ λίγο μελετημένη. Μια μελέτη του D'Angiolella (Oxidative Stress Overrides the Spindle Assembly Checkpoint) συσχέτισε την λειτουργία του SAC με την παρουσία κυτταρικού οξειδωτικού στρες και μάλιστα πιο συγκεκριμένα δείχθηκε ότι έχει την ικανότητα να παρακάμπτει το SAC (D'Angiolella, Santarpia and Grieco, 2007). Συγκεκριμένα, η Mad2 όπως προαναφέρθηκε, δεσμεύει τον συμπαράγοντα του συμπλόκου APC/C , δηλαδή το Cdc20, και έτσι αποτρέπει την ενεργοποίησή του. Με αυτόν τον τρόπο δεν καταστρέφεται η σεκιουρίνη , ούτε η κυκλίνη B και ο κυτταρικός κύκλος σταματάει σε αυτό το στάδιο. Αυτό συμβαίνει όταν η Mad2 «αντιληφθεί» ότι υπάρχουν μη συνδεδεμένοι κινητοχώροι, οπότε εμποδίζει τον μη σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Όταν τα κύτταρα επωαστούν με υψηλές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> τότε, μειώνεται η ικανότητα της Mad2 να δεσμεύσει το Cdc20, επομένως ελευθερώνεται το APC/C από την ανασταλτική της δράση. Συνεπώς, συνεχίζει ο κυτταρικός κύκλος ,

ακόμα και αν θα έπρεπε να είναι σταματημένος λόγω ελεύθερων κινητοχώρων. Το οξειδωτικό στρες λοιπόν έχει την ικανότητα να παρακάμπτει το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC) (D'Angiolella, Santarpia and Grieco, 2007).

#### **(4) Κυτταρική γήρανση και οξειδωτικό στρες**

Η κυτταρική γήρανση είναι η κατάσταση στην οποία σταματά ο κυτταρικός κύκλος οριστικά (HAYFLICK and MOORHEAD, 1961) και χαρακτηρίζεται από αλλαγές στην μορφολογία του κυττάρου (Bayreuther *et al.*, 1988). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) έχουν την ικανότητα να επάγουν και να «σταθεροποιήσουν» τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Έχει δειχθεί από μελέτες ότι οι ROS μπορούν να επιταχύνουν την ελάττωση του μεγέθους των τελομερών (von Zglinicki, 2002) όπως επίσης και να προκαλέσουν βλάβες στο γενετικό υλικό άμεσα και με αυτό τον τρόπο να επάγουν την απόκριση του κυττάρου στις βλάβες του DNA όπως επίσης και την κυτταρική γήρανση (εικόνα 3a) (Lu and Finkel, 2008) (Rai *et al.*, 2009) (Chen *et al.*, 1995). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατ' επέκταση μεταβολική ανεπάρκεια και αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου. (Allen *et al.*, 1999), (Hütter *et al.*, 2002), (HUTTER *et al.*, 2004), (Passos *et al.*, 2007), (ZWERSCHKE *et al.*, 2003). Η ενεργοποίηση της απόκρισης του κυττάρου στις βλάβες του γενετικού υλικού (Dna Damage Response- DDR) από το γενοτοξικό στρες, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών RAS, BRAF, p53, p21 & p16 (εικόνα 3b) οδήγησαν σε αυξημένη παραγωγή ROS. Αυτά τα δεδομένα συνάδουν με την άποψη ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια κατά την κυτταρική γήρανση (Passos and Von Zglinicki, 2006). Έχει υποστηριχθεί ότι τα επίπεδα ROS αυξάνουν στα γηρασμένα κύτταρα ως αποτέλεσμα της σηματοδότησης του μονοπατιού p21 και με αυτόν τον τρόπο πυροδοτούν βλάβες στο γενετικό υλικό, προκαλώντας έτσι την DDR (DNA-Damage-Response) δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα μονοπάτι ανατροφοδότησης (εικόνα 3c) (Correia-Melo, Hewitt and Passos, 2014). Αυτή η ανατροφοδοτική σχέση υπάρχει όταν το κύτταρο έχει μπει σε μια διαδικασία μη αντιστρεπτής γήρανσης (deep senescence).





**Εικόνα 3:** Δύο διαφορετικά μοντέλα με βάση τα οποία οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επιδρούν στην κυτταρική γήρανση. (Correia et al. Longevity & Healthspan 2014).

- (α) Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορεί να προέρχονται από τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα ή και από εξωγενείς πηγές. Όποια και αν είναι η πηγή προέλευσης τους, έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν βλάβη στο γενετικό υλικό όπως επίσης και να επιταχύνουν την μείωση του μεγέθους των τελομερών. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούν την απόκριση του κυττάρου στις βλάβες του γενετικού υλικού (DDR- DNA Damage Response).
- (β) Οι ROS λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Η παραγωγή των πρώτων «σημάτων» της γήρανσης οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής ROS (μιτοχονδριακή παραγωγή ROS ή και μη μιτοχονδριακή). Ως αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος, ενεργοποιούνται διάφορα μονοπάτια τα οποία «σταθεροποιούν» την στάση του κυτταρικού κύκλου άρα κατ' επέκταση και τη διαδικασία της γήρανσης.
- (γ) Συνοπτικά το ανατροφοδοτικό μονοπάτι μεταξύ DDR & ROS. Η καταστροφή των τελομερών και γενικότερα οι βλάβες του γενετικού υλικού ενεργοποιούν την απόκριση του κυττάρου (DDR) η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ROS. Η συσσώρευση των δραστικών ριζών οξυγόνου έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν βλάβες στο γενετικό υλικό, άρα να πυροδοτούν τη DDR εκ νέου. Με αυτόν τον τρόπο παγιώνεται η γήρανση του κύτταρου και πλέον είναι μη αναστρέψιμο γεγονός.

Η μη σωστή λειτουργία του μιτωτικού σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου συνδέεται με ογκογένεση και γήρανση (Rajagopalan and Lengauer, 2004), (Fernandez-Capetillo and Nussenzweig, 2004). Όταν το SAC είναι δυσλειτουργικό και παρακάμπτεται, τότε δημιουργούνται δύο θυγατρικά κύτταρα τα οποία δεν έχουν τον σωστό αριθμό χρωμοσωμάτων. Οδηγείτε λοιπόν το κύτταρο σε ανευπλοειδία. Η καρκινογένεση όπως επίσης και η γήρανση, είναι δύο διεργασίες οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου μέσα στο κύτταρο (Finkel, 2003), (Dröge, 2002), (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Κατά τη γήρανση συγκεντρώνεται στο κύτταρο ένας μεγάλος αριθμός ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και αντίστροφα, όταν οι ενεργές ρίζες οξυγόνου απομακρύνονται-αδρανοποιούνται μέσω των αντι-οξειδωτικών μηχανισμών που διαθέτει το κύτταρο, καθυστερεί η κυτταρική γήρανση (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

Πιο αναλυτικά, θα αναφερθούμε στο οξειδωτικό στρες, την κυτταρική γήρανση και το SAC όσο αφορά τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs). Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έχουν ικανότητα αυτό-ανανέωσης προς αρκετούς κυτταρικούς τύπους και για αυτό το λόγο είναι χρήσιμα εργαλεία στις κυτταρικές θεραπείες. Αρκετές κλινικές μελέτες χρησιμοποιούν τα MSCs ως θεραπεία για διάφορες ανθρώπινες

ασθένειες (Wei *et al.*, 2013). Η απομόνωση αυτού του τύπου των βλαστοκυττάρων είναι εφικτή (Bianco, Robey and Simmons, 2008), (Zuk *et al.*, 2001), παρόλα αυτά η χρήση τους για κυτταροκαλλιέργειες έχει περιορισμούς. Ο βασικότερος είναι ότι σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μπαίνουν στη διαδικασία της αναδιπλασιαστικής γήρανσης (replicative senescence) (Baxter *et al.*, 2004) και με αυτόν τον τρόπο «χάνουν» την αναγεννητική τους ικανότητα (GU *et al.*, 2016), (Kasper *et al.*, 2009). Η αναδιπλασιαστική γήρανση είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο υπάρχει σε όλα τα κύτταρα, είτε είναι σωματικά είτε είναι βλαστικά. Μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα (ο χρόνος εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο όπως επίσης και από τις ενδογενείς και εξωγενείς συνθήκες του κυττάρου), τα κύτταρα μειώνουν τον ρυθμό με τον οποίο αναπαράγονται μέχρι να φτάσει ένα σημείο στο οποίο θα γίνει παύση του κυτταρικού κύκλου και δεν θα διαιρεθούν ξανά. Τα γεγονότα αυτά συνοδεύονται από αλλαγές στη μορφή και το σχήμα του κυττάρου, πυρηνικές αλλαγές αλλά και αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων (Campisi, 1997). Τα τελομερή (εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις πολλών ζευγών βάσεων) βρίσκονται στις άκρες των χρωμοσωμάτων και δρουν προστατευτικά ως προς αυτά. Είναι γνωστό ότι κατά την αντιγραφή μπορούν να συμβούν λάθη με μεγαλύτερη ευκολία-πιθανότητα όταν η αλληλουχία που αντιγράφεται αποτελείται από πολλές επαναλήψεις. Αυτό συμβαίνει και με τα τελομερή. Σε κάθε κύκλο αντιγραφής χάνεται και ένα μέρος της αλληλουχίας τους, με αποτέλεσμα να μικραίνουν όλο και περισσότερο. Το DNA των τελομερών συντίθεται από ένα ειδικό ένζυμο το οποίο ονομάζεται τελομεράση (είναι αντίστροφη μεταγραφάση) (Collins and Mitchell, 2002). Όταν η τελομεράση δεν υπάρχει ή εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα τότε τα τελομερή θα φτάσουν σε ένα κρίσιμο σημείο. Σε εκείνο το στάδιο, το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που ενεργοποιείται από τις βλάβες του DNA, προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση τη γήρανση (Smogorzewska and de Lange, 2002). Η αλληλουχία των τελομερών επηρεάζεται (μειώνεται το μήκος τους) όχι μόνο λόγω του αναδιπλασιασμού του κυττάρου (φυσιολογική εξέλιξη) αλλά και από εξωγενείς παράγοντες όπως για παράδειγμα είναι οι δραστικές ρίζες οξυγόνου. Τα «γηρασμένα» κύτταρα εμφανίζουν μικροπυρήνες ή/και πολλούς πυρήνες λόγω του ότι ξεφεύγουν από το στάδιο της μίτωσης. (Ohshima, 2008). Το να προσπεραστεί το στάδιο της μίτωσης συμβαίνει όταν το SAC είναι δυσλειτουργικό (Trachana *et al.*, 2007), και το δυσλειτουργικό SAC μπορεί να οφείλεται σε επίδραση οξειδωτικού στρες (D'Angiolella, Santarpia and Grieco, 2007). Μελέτες έχουν δείξει πως η ανευπλοειδία στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορεί να προκληθεί και από εξωγενές οξειδωτικό στρες (Estrada *et al.*, 2013), το οποίο επηρεάζει την λειτουργικότητα του SAC μέσω δύο πρωτεϊνών-κλειδιά, τις BubR1 και Mad2 (Ikawa-Yoshida *et al.*, 2013). Αν λάβουμε υπόψιν όλα τα παραπάνω, είναι εμφανές πως το οξειδωτικό στρες δημιουργεί διάφορες βλάβες στο γενετικό υλικό (γενωμική αστάθεια) όπως επίσης και στους πυρήνες ( ύπαρξη μικροπυρήνων, κ.ά.) και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η αναγεννητική ικανότητα των βλαστοκυττάρων. Αποτελεί με άλλα λόγια περιοριστικό παράγοντα και για την καλλιέργεια τους αλλά και για την μεταμόσχευση τους σε κάποιο ιστό (θεραπευτική χρήση).

## (5) Βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα είναι κύτταρα του οργανισμού τα οποία έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε άλλο είδος κυττάρου στο σώμα ενός οργανισμού. Τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε κατηγορίες που αντικατοπτρίζουν διαφορετικό δυναμικό διαφοροποίησης. Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι:

**(α) Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα:** Επτά ημέρες μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο, δημιουργείται μια σφαίρα κυττάρων η οποία ονομάζεται βλαστοκύστη. Στην εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης συναντάμε τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, τα οποία θα δώσουν όλους τους ιστούς και τα όργανα του εμβρύου αλλά και τον τροφοβλάστη από τον οποίο θα δημιουργηθεί στη συνέχεια ο πλακούντας. Τα βλαστοκύτταρα σε αυτό το στάδιο είναι ολοδύναμα (pluripotent), έχουν δηλαδή τη δυνατότητα να μετατραπούν σε κάθε είδος κυττάρου στο ανθρώπινο σώμα.

**(β) Ενήλικα βλαστοκύτταρα:** Είναι τα βλαστοκύτταρα τα οποία έχουν αποθηκευτεί στο έμβryo σε διάφορα σημεία και το ακολουθούν σε όλα τα στάδια της ζωής του. Αποθηκεύονται κατά κύριο λόγο στο μυελό των οστών και διαχωρίζονται σε αιμοποιητικά (δίνουν γένεση σε κύτταρα του αίματος) και σε μεσεγχυματικά (σχηματίζουν λιπώδη ιστό, χόνδρους, οστά, κ.ά.). Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα (multipotent) που σημαίνει ότι μπορούν να δημιουργήσουν διάφορους κυτταρικούς τύπους, αλλά όχι όλους.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε βλαστοκύτταρα τα οποία απομονώθηκαν από ζελατινώδη ουσία που περιβάλλει τον ομφάλιο λώρο, δηλαδή τη γέλη του Wharton (Wharton's Jelly). Αυτού του είδους τα βλαστοκύτταρα είναι μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, και είναι όπως τα ενήλικα βλαστοκύτταρα, πολυδύναμα (multipotent), που σημαίνει ότι μπορούν να μετατραπούν σε πολλά είδη κυττάρων. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα της ουσίας του Wharton έχει δειχθεί από αρκετές μελέτες ότι έχουν υψηλή αναγεννητική ικανότητα όσο αφορά διάφορους ιστούς και όργανα και έχει μελετηθεί, από πολλούς μέχρι σήμερα ερευνητές, η χρήση τους στις κυτταρικές θεραπείες.

## (6) ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών – κλειδιά του σημείου ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου ( Spindle Assembly Checkpoint- SAC) BubR1 & Mad2 σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών θα ελεγχθούν μετά από επίδραση με οξειδωτικό μέσο όπως επίσης και κατά τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να συσχετίσει τη διαδικασία της γήρανσης και το οξειδωτικό στρες με δύο από τις κύριες πρωτεΐνες του SAC (BubR1 & Mad2).

## (B) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### (1) Απομόνωση Βλαστοκυττάρων

Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) τα οποία απομονώθηκαν από την Γέλη του Wharton (Wharton 's Jelly). Ο ιστός του ομφάλιου λώρου αποτελείται από ένα σύστημα αιμοφόρων αγγείων και ένα «πλέγμα γλυκοπρωτεϊνών» που ονομάζεται Γέλη του Wharton (Wharton 's Jelly). Τα βλαστικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου είναι αρχέγονα αδιαφοροποίητα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα αναγέννησης και διαφοροποίησης προς πολλούς κυτταρικούς τύπους του οργανισμού. Οι βασικές κατηγορίες βλαστικών κυττάρων που απομονώνονται από τον ομφάλιο λώρο είναι δύο:

- i. Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, που χρησιμοποιούνται ως αιμοποιητικό μόσχευμα εναλλακτικά του μυελού των οστών για την ανασύσταση του αιμοποιητικού συστήματος.
- ii. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού περιαγγειακού ιστού και της ζελατινώδους ουσίας του Wharton (Wharton Jelly). Αυτά, χρησιμοποιούνται υποστηρικτικά για την αναγέννηση, αποκατάσταση ή επανόρθωση κατεστραμμένων ιστών ή οργάνων.

Όπως προαναφέρθηκε, η γέλη του Wharton είναι μια ζελατινώδους σύστασης ουσία που περιβάλλει τα τρία αγγεία του ομφάλιου λώρου και αποτελεί σημαντικότερη πηγή μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Η φύλαξη της γέλης από 6-7cm είναι αρκετή μιας και τα κύτταρα της διατηρούν όλες τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων. Μπορούν να καλλιεργηθούν και να διαφοροποιηθούν ως εξής:

- Οστεοβλάστες : για κατάγματα οστών, οστεοπόρωση
- Χονδροκύτταρα : για κακώσεις και οστεοαρθρίτιδες
- Λιποκύτταρα : συνθέτουν λιπώδη ιστό και μπορούν να βοηθήσουν και σε καρδιαγγειακές παθήσεις , όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η καρδιακή ανεπάρκεια
- Νευρικά κύτταρα, νευρώνες : μελλοντική υποστηρικτική θεραπεία παθήσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως κακώσεις του νωτιαίου μυελού, νόσος Parkinson και νόσος Alzheimer. (Kim *et al.*, 2013)

Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς ηπατικά & παγκρεατικά κύτταρα για μελλοντική χρήση σε ασθένειες όπως η κίρρωση του ήπατος, η ηπατική ανεπάρκεια και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (Kalaszczynska *et al.*, 2015).

### (2) Καλλιέργεια Βλαστοκυττάρων

#### 2.1 Υλικά καλλιέργειας

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας: Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ήταν το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose της Biowest . Προηγήθηκε προσθήκη εμβρυϊκού βόειου ορού (Fetal Bovine Serum,

FBS, Gibco) και των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin-streptomycin, P/S) . Το FBS προστέθηκε στο θρεπτικό διότι παρέχει πληθώρα αυξητικών παραγόντων που ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα αντιβιοτικά P/S εμποδίζουν την ανάπτυξη μικροβιακών παραγόντων στην καλλιέργεια.

Το FBS προστέθηκε σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM, ενώ τα αντιβιοτικά σε αναλογία 1%. Πιο συγκεκριμένα, σε 500ml θρεπτικού υλικού προστέθηκαν 50ml FBS και 5ml P/S. Το θρεπτικό που είναι έτοιμο για χρήση (complete) διατηρείται στο ψυγείο στους 4ο C.

- ο Διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline- Gibco): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των κυττάρων πριν από την επεξεργασία τους με θρυψίνη, με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του ορού από τη φλάσκα καλλιέργειας διότι δρουν ανασταλτικά στη δράση του ενζύμου. χωρίς CaCl<sub>2</sub> και MgCl<sub>2</sub>. Είναι ένα διάλυμα το οποίο κρατά σταθερό το pH της καλλιέργειας. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (25ο C).
- ο Θρυψίνη: Τα βλαστικά κύτταρα της καλλιέργειας έχουν την τάση να προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας. Η θρυψίνη χρησιμοποιείται για να αποκολληθούν τα κύτταρα από την φλάσκα. Πιο συγκεκριμένα, επειδή είναι μια πρωτεάση σερίνης, έχει την ιδιότητα να διασπά τις πρωτεΐνες οι οποίες συγκρατούν τα κύτταρα στην επιφάνεια προσκόλλησης. Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα μπορούν να απομακρυνθούν από τη φλάσκα. Το ένζυμο αυτό, βρίσκεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό, συνεπώς η βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία δρα είναι οι 37οC. Αυτό εξυπηρετεί και το να μην μειώνεται απότομα η θερμοκρασία των βλαστοκυττάρων. Διατηρείται στους -20°C.

## 2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες 75T και χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο θρεπτικό μέσο που αναφέρθηκε ανωτέρω. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο (Thermo Scientific, Series II Water Jacket) ο οποίος είχε σταθερή θερμοκρασία (37οC), κατάλληλες συνθήκες υγρασίας όπως επίσης και σταθερά εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>. Ο χώρος στον οποίο πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια ήταν αποστειρωμένος και οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε εστία κάθετης νηματικής ροής έτσι ώστε να αποφευχθούν εξωτερικές μολύνσεις. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (όνομα μικροσκοπίου)

## 2.3 Πρωτόκολλο καλλιέργειας

Τα μεσεγχοματικά βλαστοκύτταρα , μετά την απομόνωση τους μπορούν εκτός από άμεση καλλιέργεια, να διατηρηθούν στους -150°C. Για την κατάψυξη τους, τα κύτταρα μεταφέρονται σε κρυοφυαλίδιο (cryovials) σε συγκέντρωση 4-5 x 10<sup>6</sup> κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού, εμπλουτισμένα με 10% DMSO (Dimethyl

Sulfoxide) & 30% FBS απουσία αντιβιοτικών. Αν η ψύξη των κυττάρων είναι γρήγορη τότε δημιουργούνται κρύσταλλοι οι οποίοι είναι πολύ πιθανόν να καταστρέψουν την μεμβράνη των κυττάρων. Ο ρόλος του DMSO είναι κρυοπροστατευτικός ώστε να πραγματοποιηθεί η ψύξη με αργούς ρυθμούς, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων.

Για τη διαδικασία της απόψυξης αλλά και την μεταφορά των κυττάρων στις φλάσκες, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- i. Προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon)
- ii. Μεταφορά του κρυοφιαλιδίου με τα κατεψυγμένα κύτταρα στο υδατόλουτρο (37<sup>0</sup>C) για 15 δευτερόλεπτα
- iii. Μεταφορά του περιεχομένου του κρυοφιαλιδίου στο falcon
- iv. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25<sup>0</sup>C)
- v. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- vi. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25<sup>0</sup>C)
- vii. Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2ml θρεπτικού υλικού
- viii. Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 75T και προσθήκη 8ml θρεπτικού υλικού
- ix. Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>)

Τα κύτταρα αναπτύσσονται μέσα στον κλίβανο μέχρις ότου καλύψουν πλήρως την επιφάνεια της φλάσκας. Μόλις συμβεί αυτό, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια και πέρασμα σε νέα φλάσκα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως θρυψινοποίηση και γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

- i. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- ii. Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- iii. Προσθήκη 2ml θρυψίνης και επώαση για 3-4 λεπτά στον κλίβανο
- iv. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 10ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- v. Μοίρασμα από 5ml θρεπτικού-κυττάρων σε δύο νέες φλάσκες. Προσθήκη 10ml θρεπτικού στην παλιά φλάσκα και έντονη ανάδευση ώστε να πάρουμε όσα κύτταρα δεν μοιράστηκαν στις νέες φλάσκες. Προσθήκη από 5ml στις δύο νέες φλάσκες ξανά, ώστε συνολικά να έχουν από 10ml θρεπτικού-κυττάρων η καθεμιά.
- vi. Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο, στους 37<sup>0</sup>C.

Οι ανακαλλιέργειες συνεχίστηκαν μέχρι το passage 15. Έπειτα από αυτό, στο passage 8 και στο passage 15 η καλλιέργεια έγινε σε 6-well plate όπου έγινε επίδραση οξειδωτικού στρες.

### (3) Επίδραση εξωγενούς οξειδωτικού στρες σε 6-well plates

Όπως προαναφέρθηκε τα κύτταρα του passage 8 και του passage 15 είναι αυτά που προορίζονται για τις επιδράσεις. Τα δείγματα αυτά διαιρούνται σε δύο 6-well plates (όπως ακριβώς διαιρούνται σε δυο φλάσκες). Το ένα 6-well προορίζεται για απομόνωση πρωτεϊνών και το άλλο για απομόνωση RNA. Η χρήση των 6-well plates προσφέρει τη δυνατότητα επίδρασης σε κύτταρα που προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια με διαφορετικές ουσίες ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετική συγκέντρωση ή διαφορετικός χρόνος επώασης). Η επίδραση με το οξειδωτικό ξεκινάει από τη στιγμή που τα κύτταρα έχουν καλύψει το 60-70% της επιφάνειας από κάθε πηγαδάκι. Προστίθεται H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε κάθε πηγαδάκι σε συγκέντρωση 300μM για 30'. Κάθε πηγαδάκι έχει διαφορετικό χρόνο ανάκαμψης. Ως χρόνος ανάκαμψης ορίζεται το χρονικό διάστημα που έχουν τα κύτταρα έπειτα από την επίδραση, σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Στην παρούσα εργασία οι χρόνοι αυτοί ήταν: 0 ώρες (απομόνωση κυττάρων απευθείας μετά την επίδραση) , 1 ώρα, 6 ώρες, 24 ώρες, 48 ώρες.

Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Θρεπτικό υλικό DMEM 5% FBS
- Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS, Gibco)
- Θρυψίνη
- 6-well plates
- Υπεροξειδίου του υδρογόνου (9.8 M, Sigma Aldrich)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- i. Διαχωρισμός μετά από την πλήρη κάλυψη σε δύο φλάσκες από το ίδιο δείγμα σε δύο 6-well plates
- ii. Συνέχεια καλλιέργειας των κυττάρων στα 6-well plates
- iii. Στο 80-90% κάλυψης σε κάθε πηγαδάκι ξεκινάει η διαδικασία επίδρασης
- iv. Δημιουργία διαλύματος θρεπτικού με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300μM)
- v. Απομάκρυνση θρεπτικού από τα 6-well plates & ξέπλυμα με 2ml PBS
- vi. Προσθήκη 2ml θρεπτικού H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε κάθε πηγαδάκι εκτός του πρώτου (χωρίς επίδραση-no treat-control)
- vii. Επώαση για μισή ώρα στον κλίβανο
- viii. Απομάκρυνση του θρεπτικού με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μετά από μισή ώρα & ξέπλυμα με 2ml PBS
- ix. Προσθήκη 2ml θρεπτικού σε κάθε πηγαδάκι
- x. Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα που ορίστηκαν (0h, 1h, 6h, 24h, 48h) απομάκρυνση του θρεπτικού και αντίστοιχο πρωτόκολλο για απομόνωση RNA ή πρωτεϊνών για κάθε πηγαδάκι.

### (4) Απομόνωση πρωτεϊνών

#### 4.1 Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer)

- 30mM Tris (Invitrogen)
- 10% Glycerol (Invitrogen)
- 150mM NaCl (Sharlau)
- 1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς πρωτεασών
- Αναστολείς φωσφατασών

#### 4.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών

- i. Απομάκρυνση του θρεπτικού από τη φλάσκα ή τα πηγαδάκια.
- ii. Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS δύο φορές (5ml για τις φλάσκες, 2ml για κάθε πηγαδάκι).
- iii. Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο.
- iv. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ή 2ml στα πηγαδάκια, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- v. Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml.
- vi. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1300 rpm για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- vii. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS.
- viii. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1300 στροφές για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ix. Προσθήκη 100μl διαλύματος λύσης (Lysis Buffer), στο οποίο είχε προστεθεί 10μl αναστολείς πρωτεασών.
- x. Επαναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του σε eppendorf.
- xi. Διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 30 λεπτά και ανάδευση της σε vortex ανά 10 λεπτά.
- xii. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- xiii. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο eppendorf.
- xiv. Αποθήκευση των πρωτεϊνών στους -20°C.

#### 4.3 Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bradford Assay)

Για τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Σε ένα δείγμα χωρίς πρωτεΐνη απορροφά στα 490nm, ενώ το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Αρχικά, παρασκευάσαμε κάποια διαλύματα με γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης (BSA) και μετρήσαμε την απορρόφηση τους με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια με βάση τη συγκέντρωση και την απορρόφηση τους, δημιουργήσαμε μια πρότυπη καμπύλη. Ακολούθησε φωτομέτρηση των πρωτεϊνών που απομονώσαμε από τα 6-well plates. Για κάθε φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 495μL του διαλύματος Bradford με 5μL πρωτεΐνης-δείγματος. Έγινε καλή ανάδευση του μίγματος, επώαση για 5' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετήθηκε



στο μηχάνημα (Perkin Elmer, Lambda 25 UV/VIS Spectrometer) όπου και φωτομετρήθηκε. Οι άγνωστες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών – δειγμάτων υπολογίστηκαν μέσω της πρότυπης καμπύλης που δημιουργήσαμε προηγουμένως.

### **(5) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης παρουσία δωδέκυλο-θεικού Νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate- Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως) από ένα μίγμα τους. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων στην πηκτή που πάνω της έχει ενσωματωθεί το προς ανάλυση δείγμα (πρωτεΐνη στην προκειμένη περίπτωση). Τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με διαφορετικές ταχύτητες, ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Συνεπώς, τα περισσότερα φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό τους σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα απομακρύνονται λιγότερο. Με αυτόν τον τρόπο επέρχεται ο διαχωρισμός.

Η SDS-PAGE είναι μια γρήγορα, φθηνή και αρκετά ακριβής μέθοδος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός τους βασίζεται στο μοριακό τους βάρος. Το SDS έχει την ικανότητα να προσδένεται στα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης και με αυτόν τον τρόπο καταστρέφει την τριτοταγή της δομή. Το σύμπλεγμα SDS-αποδιαταγμένη πρωτεΐνη αποκτά αρνητικό φορτίο, ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης. Το φορτίο της αρχικής πρωτεΐνης θεωρείται αμελητέο.

Για να δημιουργηθεί η πηκτή ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: Το μίγμα ακρυλαμίδιου και δις-ακρυλαμίδιου είναι αυτό που όταν πολυμεριστεί θα σχηματίσει ένα δίκτυο με πόρους ορισμένης διαμέτρου. Ο πολυμερισμός επιταχύνεται παρουσία TEMED και απαιτείται η παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) για την έναρξη του πολυμερισμού. Το TEMED καταλύει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών από το APS, οι οποίες κατευθύνουν τον πολυμερισμό.

Το μίγμα (ακρυλαμίδης, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπια και οι πηκτές είναι επίπεδες (ανάμεσα σε 2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους) ενώ τα δείγματα τοποθετούνται μέσα σε οπές (wells) στο πάνω μέρος της πηκτής. Στην πηκτή δημιουργείται ένα «συγκεντρωτικό» gel (stacking gel) ακριβώς πάνω από το running gel. Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το running gel στο οποίο γίνεται διαχωρισμός του δείγματος. Η διαφορετική αναλογία ακρυλαμίδιου και buffer στο stacking gel επιτρέπει στα δείγματα να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στην δεύτερη (running gel). Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο.

#### **5.1 Αποδιάταξη πρωτεϊνών**

Για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση στην πηκτή, πρέπει να προηγηθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μg. Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε:

- Πρωτεΐνη x μg
- Sample buffer 5 μL
- Reducing buffer 2 μL
- ddH<sub>2</sub>O y μL (μέχρι τελικό όγκο 20 μL)

Η αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε σε συσκευή PCR στους 95° C για 5'.

## 5.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, αρχικά στήθηκε η κατάλληλη συσκευή (Bio-Rad) μέσα στην οποία τοποθετήθηκε η πηκτή ( μέσα στα δυο γυάλινα τζάμια, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω) και προστέθηκαν 600mL Running Buffer 1x (50mL Running Buffer 10x σε 950mL ddH<sub>2</sub>O) στο εμπρόσθιο και οπίσθιο μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο τμήμα της συσκευής προστίθενται 200mL Running Buffer. Εν συνεχεία φορτώνονται τα δείγματα στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στην πρώτη οπή (well) φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών.

## (6) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot

Μόλις ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, το επόμενο στάδιο είναι να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Για να επιτευχθεί αυτό, είναι απαραίτητη η σύνδεση ενός αντισώματος με την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Το αντίσωμα αναγνωρίζει την πρωτεΐνη ως αντιγόνο και συνδέεται ειδικά μαζί της. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο αντίσωμα θα συνδεθεί με το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase). Κατά αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη μπορεί να ανιχνευθεί μέσω αυτοραδιογραφίας (φιλμ ακτίνων X) ως μια σκοτεινή γραμμή. Η ένταση της γραμμής αυτής σχετίζεται με την ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Για να πραγματοποιηθεί όλη αυτή η διαδικασία, είναι απαραίτητο να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο, οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα και οι χρόνοι επώασης με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είναι πιο σύντομοι, καθώς οι αντιδράσεις είναι επιφανειακές. Η μεμβράνη μπορεί να είναι νιτροκυταρίνης ή PVDF. Στην παρούσα εργασία, η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν PVDF.

### 6.1 Υλικά ανοσο-αποτύπωσης πρωτεϊνών.

- Διάλυμα μεταφοράς

5% Transfer Buffer NuPage Transfer Buffer, Invotrogen)

1% μεθανόλη (Applichem)

- Χαρτί Whitman

- Μεμβράνη PVDF
- Χρωστική μεμβράνης
- Διάλυμα πλύσης

50mM Tris

150mM NaCl (Sharlau)

1mM EDTA

0,05% Tween (BioRad)

- Σκόνη μπλοκαρίσματος
- Βόειος Αλβουμίνη (BSA- Invitrogen)
- Ενισχυτικό σήματος ECL ( Perkin-Elmer)
- Mouse monoclonal anti-MAD2 antibody (17D10): sc-47747(Santa Cruz Biotechnology)
- Mouse monoclonal anti-BUBR1 antibody (8G1): sc-47744 (Santa Cruz Biotechnology)
- Mouse monoclonal anti-actin (Santa Cruz Biotechnology)
- Goat anti-mouse HRP #G21040 (Invitrogen – Life Technologies)

## 6.2 Πρωτόκολλο ανοσο-αποτύπωσης πρωτεϊνών

Βασικό στάδιο ώστε να οπτικοποιήσουμε εν τέλει τις πρωτεΐνες, είναι η μεταφορά τους στη μεμβράνη PVDF. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Trans-Blot Wet Transfer Cell (BioRad). Η διαδικασία που ακολούθησε είχε ως εξής:

- Πριν ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πηκτή, πρέπει η μεμβράνη PVDF να επωαστεί για 15’’ σε μεθανόλη και στη συνέχεια για 20’ σε transfer buffer. Σε transfer buffer θα επωαστούν επίσης και τα χαρτάκια Whitman όπως επίσης και η πηκτή.
- Μόλις ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, ακολουθεί η μεταφορά τους στη μεμβράνη. Η τοποθέτηση έχει ως εξής: 2 χαρτάκια Whitman-μεμβράνη PVDF-πηκτή πολυακρυλαμίδης- 2 χαρτάκια Whitman
- Το σύστημα αυτό εισάγεται στην συσκευή και μεταφέρονται οι πρωτεΐνες στα 100 V για 60’. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBS-T (10’ η κάθε επανάληψη).
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5gr σκόνης σε 50ml TBS-T) .
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10’ (3 επαναλήψεις).
- Διάλυση του αντισώματος σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% και επώαση της μεμβράνης με το 1ο αντίσωμα overnight στους 4oC με ανάδευση (overnight).
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10’ (3 επαναλήψεις).
- Επώαση της μεμβράνης με το 2ο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10’ (3 επαναλήψεις).

Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση με τα αντισώματα και το ξέπλυμα της μεμβράνης, αποτυπώθηκε το σήμα των αντισωμάτων με την διαδικασία της αυτοραδιογραφίας. Η διαδικασία είχε ως εξής

- Επώαση της μεμβράνης σε ενισχυτικό σήματος ECL για 3’.
- Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί και μεταφορά της μεμβράνης σε έναν σκοτεινό θάλαμο (dark room).
- Χρήση φωτογραφικού φιλμ, το οποίο τοποθετείται ακριβώς πάνω τη μεμβράνη (εφάπτεται πάνω της) και επώαση για 15’. Στη συνέχεια, το φιλμ «περνάει» από δύο διαλύματα developer & fixer. Στόχος του developer είναι να εμφανιστούν τα σήματα από τις πρωτεΐνες που υπήρχαν στη μεμβράνη και πλέον υπάρχουν και στο φιλμ. Το fixer μονιμοποιεί το φιλμ έτσι ώστε όταν εκτεθεί εκτός του dark room να μην καεί. Το φιλμ πριν περάσει από το fixer πρέπει να ξεπλυθεί με νερό. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, ξεπλένεται και πάλι με νερό. Πλέον φαίνονται με τη μορφή ζωνώσεων τα σήματα από τις πρωτεΐνες
- Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με το πρόγραμμα IMAGEJ.

## (7) Απομόνωση RNA

### 7.1 Υλικά απομόνωσης RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies)

### 7.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (για τα κύτταρα που βρίσκονται σε φλάσκα) και 2 ml PBS (για τα κύτταρα που βρίσκονται σε 6-well).
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ή 2ml στα 6-wells, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθήκη 1-3ml Trizol, αναλόγως του μεγέθους του ιζήματος των κυττάρων (για τα κύτταρα που βρίσκονται σε φλάσκα) και 0,5ml Trizol (για τα κύτταρα που βρίσκονται σε 6-well).
- Επώαση για 5 λεπτά στους 15-30°C στο υδατόλουτρο.
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου και ανάδευση με vortex για 15''.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf των 2ml.
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol.
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης.
- Ανάδευση με και φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα στον κλίβανο, μέχρι να εξατμιστεί επαρκώς η αιθανόλη.
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl).
- Επώαση για 10 λεπτά στους 57°C στο υδατόλουτρο.
- Αποθήκευση του eppendorf στους -80°C.

## **(8) Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Για να μελετήσουμε τα επίπεδα έκφρασης mRNA των κυττάρων, πρέπει αρχικά να μετατρέψουμε το RNA, που απομονώσαμε, στο συμπληρωματικό του DNA (cDNA). Αυτό πραγματοποιείται με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse-Transcriptase PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τυχαία εξανουκλεοτίδια (random primers).

### 8.1 Υλικά για την σύνθεση cDNA

- Random hexamers (2,97 μg/μl, Invitrogen)
- Kit αντίστροφης μεταγραφής SuperScript III (200U/μl, Invitrogen)
- Δεσοξυ-ριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό-ddH<sub>2</sub>O (DEMO)

### 8.2 Πρωτόκολλο σύνδεσης cDNA

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν 5ml RNA από κάθε δείγμα, και η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια.

Στο πρώτο στάδιο διαλύεται το RNA σε 10μL 2x RT Reaction Mix, 2 μL RT Enzyme Mix & συμπληρώνουμε με 3μL DEPC-treated water. Οι ποσότητες αυτές αναφέρονται σε κάθε tube-δείγμα RNA. Γίνεται ήπια ανάδευση του μίγματος και στη συνέχεια επώαση στους 25°C για 10', στους 50°C για 30' και τερματίζεται η αντίδραση στους 85°C για 5'. Σε αυτό το σημείο έχει ολοκληρωθεί η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA. Τα δείγματα αφαιρούνται από το μηχάνημα και επωάζονται στον πάγο. Προστίθεται σε κάθε tube από 1μL RNase H και γίνεται επώαση στους 37°C για 20'. Σε αυτό το βήμα, καταστρέφονται όσα διμερή DNA-RNA υπάρχουν, έτσι ώστε στο τελικό μας δείγμα να έχουμε μόνο το συμπληρωματικό cDNA. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε PCR έτσι ώστε να εξασφαλίσουμε ότι η απομόνωση του RNA όπως επίσης και η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκαν σωστά. Στην PCR ενισχύουμε ένα γονίδιο αναφοράς, το GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) το οποίο εκφράζεται πάντα στα υπό μελέτη κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο θα βεβαιωθούμε ότι έχουμε επαρκή ποσότητα του RNA και θα αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Στην PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές κατάλληλοι για το GAPDH.

GAPDH Forward: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'

GAPDH Reverse: 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

Το διάλυμα της αντίδρασης (AmpliTaQ Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε: cDNA (3μL), ρυθμιστικό διάλυμα Hot Start 2x (10μL), Primer Forward GAPDH (0,5μL), Primer Reverse GAPDH (0,5μL) & 6μL ddH<sub>2</sub>O. Οι ποσότητες αυτές αναφέρονται σε ένα tube.

Οι συνθήκες της PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αποδιάταξη στους 95° C για 10'.
- 40 κύκλοι με τα εξής στάδια:
  - (1) Αποδιάταξη στους 95° C για 30''
  - (2) Υβριδοποίηση των εκκινητών με την συμπληρωματική τους αλληλουχία στο cDNA.
  - (3) Επιμήκυνση στους 72° C για 1'.
- Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 7'.

Μετάπειτα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 3% προκειμένου να γίνει ο έλεγχος της παρουσίας ή μη, του τμήματος που ενισχύθηκε.

Οι διαδικασίες των Reverse-Transcriptase PCR & PCR πραγματοποιήθηκαν και για τα γονίδια BubR1 & Mad2, με τα ίδια ακριβώς αντιδραστήρια και στις ίδιες συνθήκες με αυτές που ίσχυαν για την ενίσχυση του γονιδίου GAPDH. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

BubR1 Forward: 5'-CTCGTGGCAATACAGCTTCA-3'

BubR1 Reverse: 5'-CTGGTCAATAGCTCGGCTTC-3'

Mad2 Forward: 5'-GCCGAGTTTTTCTCATTTCA-3'

Mad2 Reverse: 5'-CCGATTCTTCCCACTTTTCA-3'

### **(9) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)**

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται το ένζυμο Taq πολυμεράση όπως επίσης και κατάλληλοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Περιλαμβάνει τρία στάδια: την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών και τέλος την επιμήκυνση της αλληλουχίας. Η Real Time PCR έχει παρόμοια αρχή λειτουργίας, με τη διαφορά ότι μπορεί να ποσοτικοποιήσει άμεσα το προϊόν. Χρησιμοποιούνται ειδικές φθορίζουσες

χρωστικές οι οποίες προσδένονται στο DNA είτε ειδικά είτε μη ειδικά. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα, ενώ κατά το στάδιο της επιμήκυνσης αυξανόμενα ποσά χρωστικής προσδένονται στο σχηματιζόμενο δίκλωνο μόριο DNA, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το φθορίζον σήμα. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η αλληλουχία-στόχος, συνεπώς υπάρχει η δυνατότητα μέτρησης των προϊόντων (μετά από κάθε κύκλο). Το προϊόν που θα υπολογίζεται, θα αντιστοιχεί εν τέλει στο αρχικό ποσοστό του μητρικού DNA που υπήρχε στο δείγμα. Όμως, όπως προαναφέρθηκε, η SYBR Green είναι μια χρωστική η οποία προσδένεται στο νέο-σχηματιζόμενο DNA μη ειδικά, συνεπώς μπορεί να προσδεθεί και να δώσει σήμα ακόμα και όταν προσδεθεί στο διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές (primers). Για το λόγο αυτό, μετά την Real Time PCR ακολούθησε απλή PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ίδιο δείγμα και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους, ο οποίος επιβεβαίωσε την ύπαρξη μοναδικού προϊόντος. Συνεπώς, το σήμα που έδωσε η SYBR Green δεν οφειλόταν στα διμερή των εκκινητών αλλά στα γονίδια που μελετούσαμε.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR μπορεί να είναι είτε απόλυτη, είτε σχετική. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Πραγματοποιείται όταν είναι αναγκαία η γνώση του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων του RNA-στόχου. Η σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα, σε σχέση με ένα άλλο γονίδιο αναφοράς. Μπορεί να γίνει με πρότυπη καμπύλη ή με την συγκριτική μέθοδο CT (comparative method- CT). Η μέθοδος CT βασίζεται σε αριθμητικούς υπολογισμούς. Το ποσό του μορίου-στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο-ρυθμιστή (calibrator) δίνεται από τη σχέση  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

$RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$  όπου:

- RQ: η σχετική ποσοτικοποίηση
- $\Delta\Delta Ct$ : η διαφορά του  $\Delta Ct$  του δείγματος από το  $\Delta Ct$  του δείγματος αναφοράς ( $\Delta Ct$  sample –  $\Delta Ct$  calibrator)
- $\Delta Ct$ : η διαφορά του Ct του γονιδίου από το Ct του housekeeping (Ct gene x – Ct gene housekeeping)

Το πλεονέκτημα της συγκριτικής μεθόδου είναι ότι δεν υπάρχει ανάγκη δημιουργίας πρότυπης καμπύλης και αποφεύγονται τα λάθη κατά την αραίωση των δειγμάτων, για τη δημιουργία της.

### 9.1 Υλικά για την Real Time PCR

- DNA
- ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5μM) για τα γονίδια BubR1, Mad2, GAPDH
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) (DEMO)

### 9.2 Πρωτόκολλο και διάλυμα της αντίδρασης για την Real Time PCR

Το διάλυμα της αντίδρασης (PCR mix) περιείχε:

- cDNA 3μl

- SYBR Green 7,5μl
- Εκκινητής Forward 0,3μl
- Εκκινητής Reverse 0,3μl
- ddH<sub>2</sub>O 3,9μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο ήταν οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν και για την απλή PCR .

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του cDNA ήταν οι εξής:

- Αποδιάταξη στους 95° C
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε 3 στάδια:
  - α. Αποδιάταξη στους 95° C για 15'' .
  - β. Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60° C για 60'' .
  - γ. Επιμήκυνση στους 72° C για 30'' .
- Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10' .



## (Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### (1) Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA του γονιδίου BubR1.

Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR με στόχο την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων του γονιδίου BubR1. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκε RNA των κυττάρων του passage 8 & passage 15. Οι Real-Time PCR περιλάμβαναν ένα γονίδιο αναφοράς (GAPDH) και το προς μελέτη γονίδιο (BubR1). Η χρήση του γονιδίου αναφοράς έχει ως στόχο να ελεγχθεί αν έγινε σωστά η πειραματική διαδικασία (έλεγχος επιμολύνσεων και εν γένει έλεγχος του πειράματος). Ως γονίδιο αναφοράς ορίζεται το γονίδιο που εκφράζεται σταθερά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε κάθε στάδιο της ζωής του κυττάρου. Συνεπώς, η «εμφάνιση» του στην Real-Time PCR είναι προαπαιτούμενο για να μελετηθεί και το ζητούμενο γονίδιο (BubR1). Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, ακολούθησε σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Αυτού του είδους η ποσοτικοποίηση έχει ως ζητούμενο την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου (στην προκειμένη περίπτωση BubR1) συγκρινόμενο με ένα γονίδιο αναφοράς (στην προκειμένη περίπτωση GAPDH). Η ποσότητα του γονιδίου- στόχου θα δοθεί από την σχέση  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

$RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$  όπου:

- RQ: η σχετική ποσοτικοποίηση
- $\Delta\Delta Ct$ : η διαφορά του  $\Delta Ct$  του δείγματος από το  $\Delta Ct$  του δείγματος αναφοράς ( $\Delta Ct$  sample –  $\Delta Ct$  calibrator)
- $\Delta Ct$ : η διαφορά του Ct του γονιδίου από το Ct του housekeeping (Ct gene x – Ct gene housekeeping)

Όσο αφορά την Real-Time PCR που πραγματοποιήθηκε με γονίδιο-στόχο το BubR1, οι τιμές που πήραμε απεικονίζονται στους πίνακες που ακολουθούν. Ο πρώτος πίνακας αφορά το RNA που απομονώθηκε από κύτταρα του passage 8. Στα κύτταρα αυτά απομονώθηκε RNA χωρίς να έχει γίνει επίδραση με οξειδωτικό μέσο (no treat- NT) , όπως επίσης και από κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με οξειδωτικό μέσο και στη συνέχεια ανέκαμψαν για χρονικό διάστημα μηδέν ωρών (0h), μιας ώρας (1h), έξι ωρών (6h), εικοσιτεσσάρων ωρών (24h) και σαρανταοκτώ ωρών (48h). Στα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα έγινε η απομόνωση του RNA.

	GAPDH	BubR1	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<b>p8 NT</b>	18,16	29,75	11,60	0,00	1,00
<b>0h</b>	13,26	24,68	11,42	-0,17	1,13
<b>1h</b>	12,24	24,13	11,89	0,30	0,82

<b>6h</b>	14,16	25,09	10,93	-0,67	1,59
<b>24h</b>	17,63	28,79	11,17	-0,43	1,35
<b>48h</b>	21,87	35,02	13,16	1,56	0,34

**Πίνακας 1: p8 NT:** RNA που απομονώθηκε από κύτταρα του passage 15 χωρίς καμία επίδραση με οξειδωτικό (NT= No Treat)

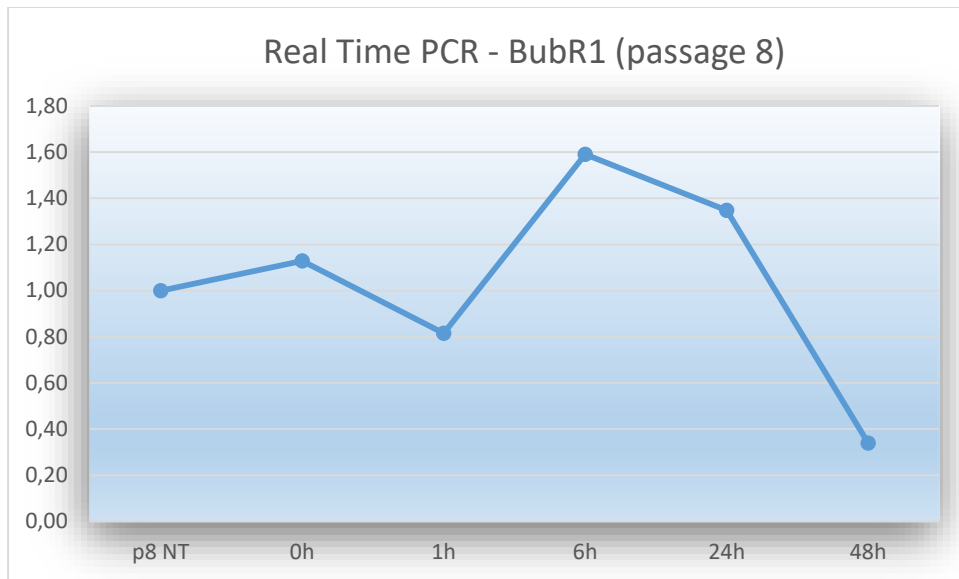
**0h, 6h, 24h, 48h:** RNA που απομονώθηκε από κύτταρα του passage 15, τα οποία είχαν επωαστεί σε οξειδωτικό μέσο (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και είχαν ανάκαμψη από αυτό 0h, 6h, 24h & 48h αντίστοιχα.

	<b>GAPDH</b>	<b>BubR1</b>	<b>ΔCt</b>	<b>ΔΔCt</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>
<b>p15 NT</b>	17,18	30,89	13,71	0,00	1,00
<b>0h</b>	15,87	27,98	12,11	-1,60	3,03
<b>1h</b>	14,66	27,30	12,64	-1,07	2,10
<b>6h</b>	14,88	28,10	13,22	-0,49	1,40
<b>24h</b>	14,58	30,60	16,02	2,31	0,20
<b>48h</b>	15,76	33,33	17,57	3,86	0,07

**Πίνακας 2: p15 NT:** RNA που απομονώθηκε από κύτταρα του passage 15 χωρίς καμία επίδραση με οξειδωτικό (NT= No Treat)

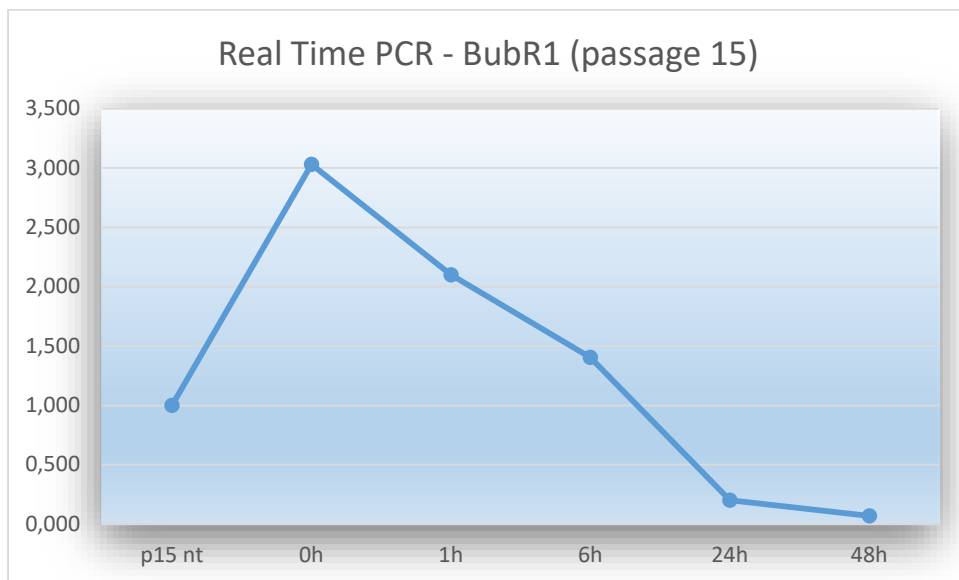
**0h, 6h, 24h, 48h:** RNA που απομονώθηκε από κύτταρα του passage 15, τα οποία είχαν επωαστεί σε οξειδωτικό μέσο (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και είχαν ανάκαμψη από αυτό 0h, 6h, 24h & 48h αντίστοιχα.

Παρατηρούμε πως υπάρχει αύξηση του αριθμού των μεταγράφων του γονιδίου BubR1 όταν στα κύτταρα επιδρά οξειδωτικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, στα νεαρά κύτταρα (passage 8) η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στις 6 ώρες μετά την ανάκαμψη από το οξειδωτικό μέσο. Όμως, αξιοσημείωτη αύξηση υπάρχει και στα κύτταρα που απομονώθηκαν αμέσως μετά την επίδραση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0h). Ομοίως αυξάνονται τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου και στα middle-aged κύτταρα (passage 15), με τη μεγαλύτερη αύξηση να σημειώνεται σε εκείνα που προσθέσαμε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και δεν τους αφήσαμε περιθώριο ανάκαμψης (απομονώθηκε το RNA 0h και 1h μετά την επίδραση). Τα προαναφερθέντα, απεικονίζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.



**Γράφημα 1: Αποτελέσματα της Real Time PCR των mRNAs που απομονώθηκαν από τα κύτταρα του passage 8 (young cells).**

Στον άξονα x'x βρίσκονται οι χρονικές στιγμές κατά τις οποίες έγινε η απομόνωση του RNA των κυττάρων (μετά την επίδραση με το οξειδωτικό μέσο). Στον άξονα y'y βρίσκονται οι τιμές του  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  για κάθε κατηγορία ξεχωριστά (0h, 1h, 6h, 24h, 48h). Ουσιαστικά αυτές οι τιμές είναι που μας δείχνουν πόσο αυξάνεται η έκφραση των μεταγράφων της BubR1 σε κάθε μια από τις κατηγορίες κυττάρων. Είναι εμφανής η μεγάλη αύξηση του αριθμού των mRNAs που απομονώθηκαν από τα κύτταρα στα οποία είχε γίνει επίδραση με  $H_2O_2$  και τα κύτταρα ανέκαμψαν για 6 ώρες (6h).

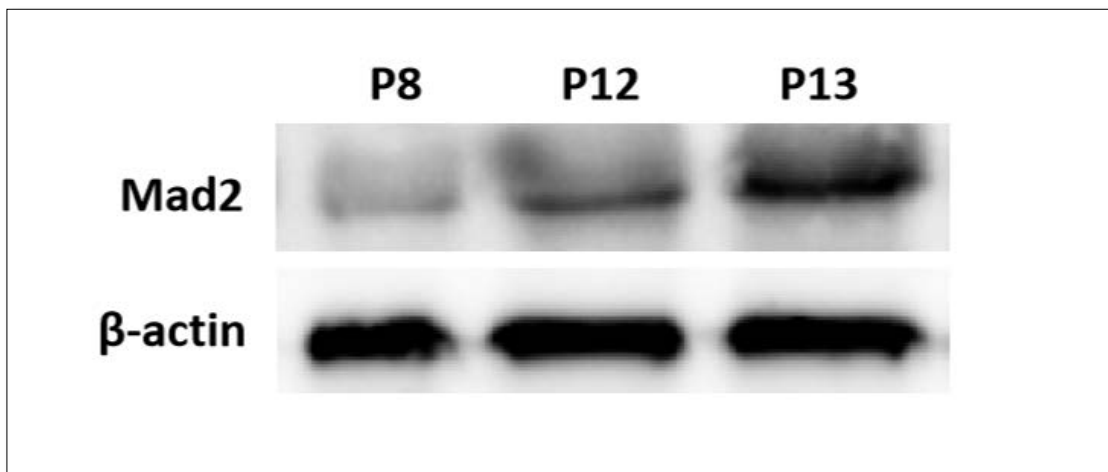


**Γράφημα 2: Αποτελέσματα της Real Time PCR των mRNAs που απομονώθηκαν από τα κύτταρα του passage 15 (middle-aged cells).**

Στον άξονα x'x βρίσκονται οι χρονικές στιγμές κατά τις οποίες έγινε η απομόνωση του RNA των κυττάρων (μετά την επίδραση με το οξειδωτικό μέσο). Στον άξονα y'y βρίσκονται οι τιμές του  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  για κάθε κατηγορία ξεχωριστά (0h, 1h, 6h, 24h, 48h). Ουσιαστικά αυτές οι τιμές είναι που μας δείχνουν πόσο αυξάνεται η έκφραση των μεταγράφων της BubR1 σε κάθε μια από τις κατηγορίες κυττάρων. Είναι εμφανής η μεγάλη αύξηση του αριθμού των mRNAs που απομονώθηκαν από τα κύτταρα στα οποία είχε γίνει επίδραση με  $H_2O_2$  και τα κύτταρα δεν είχαν περιθώριο ανάκαμψης διότι απομονώθηκε απευθείας το RNA τους.

## (2) Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης Mad2 (μέσω Western Blot) μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.

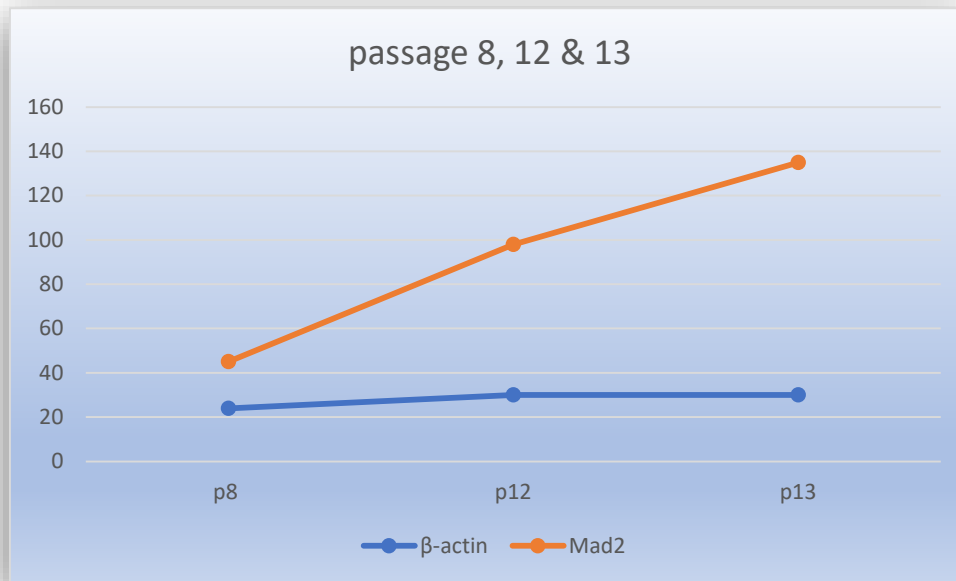
Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε η τεχνική Western Blot για την πρωτεΐνη Mad2. Στα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε έγιναν ανακαλλιέργειες και σε κάποιες από αυτές απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες του κυττάρου (συνολικά). Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν στο passage 8, στο passage 12 και στο passage 13. Τα κύτταρα του passage 8 θεωρούνται νεαρά κύτταρα ενώ τα άλλα δυο passage θεωρούνται middle-aged. Επομένως, αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικές ηλικιακές κατηγορίες κυττάρων και μας ενδιέφερε η έκφραση της πρωτεΐνης Mad2 σε αυτές τις κατηγορίες. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ένα γονίδιο αναφοράς ( $\beta$ -actin). Είναι ένα housekeeping γονίδιο το οποίο εκφράζεται σταθερά σε όλους τους ιστούς. Αν λοιπόν στα αποτελέσματα του western blot η ακτίνη είναι ισοζυγισμένη, τότε σημαίνει πως η πειραματική διαδικασία έγινε σωστά. Τα αποτελέσματα του western blot φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 1:** Αποτελέσματα του western blot για την πρωτεΐνη Mad2 σε κύτταρα των passage 8, 12 & 13.

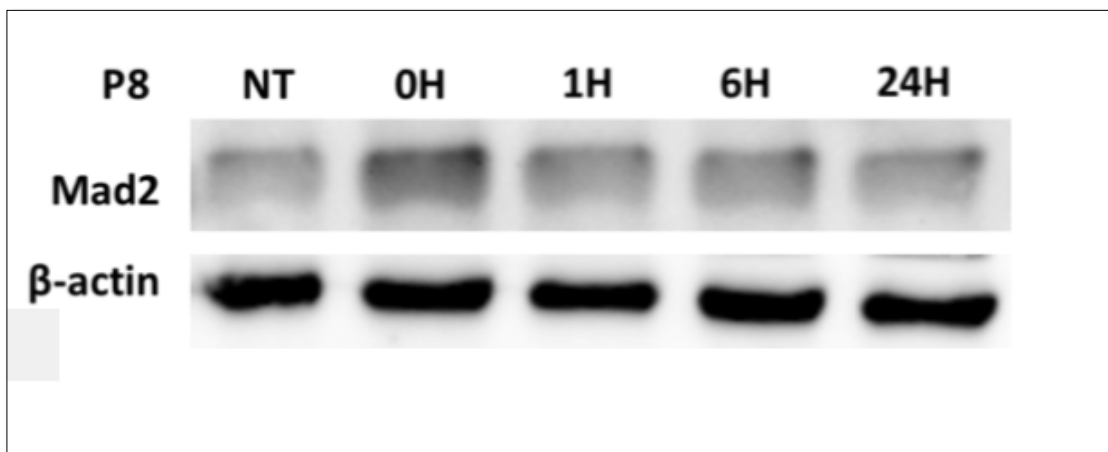
Η ακτίνη εκφράζεται σταθερά και στις δυο ηλικιακές κατηγορίες κυττάρων. Αντιθέτως, η Mad2 έχει μια σαφή αύξηση όσο αυξάνεται η «ηλικία» των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν πως τα επίπεδα της πρωτεΐνης Mad2 αυξάνονται όσο αυξάνεται η ηλικία των κυττάρων. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με την άποψη ότι η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης επηρεάζεται από τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Τα επίπεδα της ακτίνης παραμένουν σταθερά, όπως θα έπρεπε να συμβαίνει αφού είναι ένα house-keeping γονίδιο. Όλα αυτά παριστάνονται γραφικά παρακάτω:

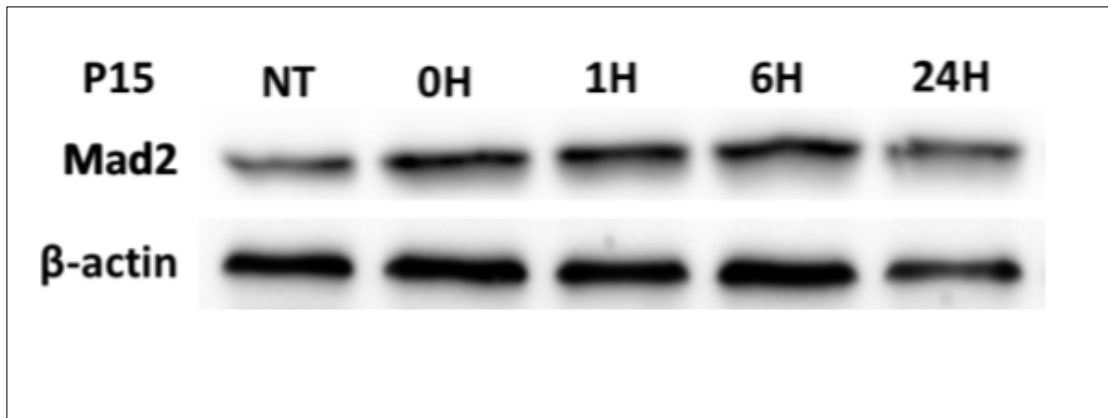


**Γράφημα 3:** Γραφική απεικόνιση της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Mad2 όσο αυξάνεται η «ηλικία» των κυττάρων.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε western blot για να μελετηθούν τα επίπεδα της ίδιας πρωτεΐνης στο passage 8 και στο passage 15. Σε αυτά τα κύτταρα είχαν γίνει επιδράσεις με οξειδωτικό μέσο ( $H_2O_2$ ) σε 6-well plates. Τα κύτταρα χωρίστηκαν σε 5 κατηγορίες: σε αυτά στα οποία απομονώσαμε τις πρωτεΐνες χωρίς να γίνει επίδραση με το  $H_2O_2$  (NT), σε αυτά στα οποία απομονώσαμε τις πρωτεΐνες ακριβώς μετά την επίδραση με το οξειδωτικό μέσο (0h), σε αυτά που ανέκαμψαν για μια ώρα, σε αυτά που ανέκαμψαν για 6 ώρες (6h), 24 ώρες (24h) και 48 ώρες (48h). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

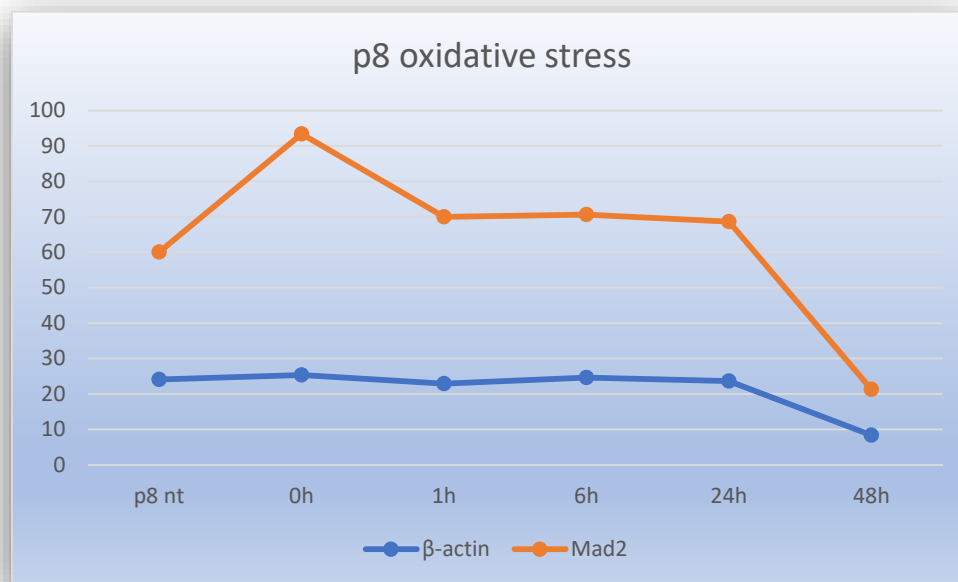


**Εικόνα 2:** Αποτελέσματα του western blot για την πρωτεΐνη Mad2, που απομονώθηκε από το passage 8, στο οποίο πραγματοποιήθηκε επίδραση με οξειδωτικό μέσο. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η Mad2 (πρωτεΐνη-στόχος), στην οποία παρατηρείται σταθερή αύξηση στην έκφραση της όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση υπάρχει στα κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν απευθείας μετά την προσθήκη του οξειδωτικού μέσου. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η ακτίνη, της οποίας η έκφραση είναι σταθερή και στις 5 κατηγορίες κυττάρων.

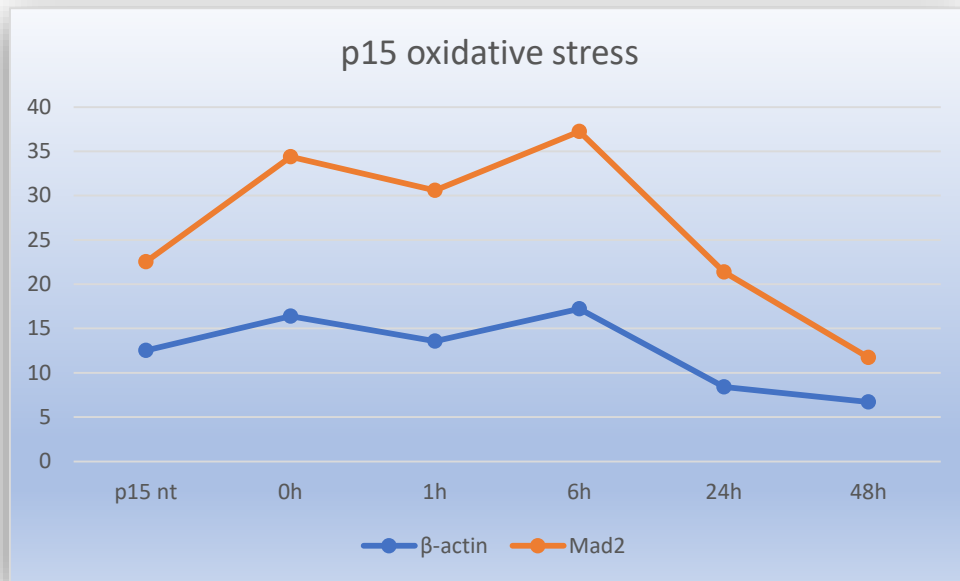


**Εικόνα 3:** Αποτελέσματα του western blot για την πρωτεΐνη Mad2 που απομονώθηκε από το passage 15, στο οποίο πραγματοποιήθηκε επίδραση με οξειδωτικό μέσο. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η Mad2 (πρωτεΐνη- στόχος), στην οποία παρατηρείται σταθερή αύξηση στην έκφραση της όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση υπάρχει στα κύτταρα τα οποία ανέκαμψαν για 24 ώρες μετά την προσθήκη του οξειδωτικού μέσου. Γενικότερα όμως παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Mad2 όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η ακτίνη, της οποίας η έκφραση είναι σταθερή και στις 5 κατηγορίες κυττάρων.

Συμπεραίνουμε πως υπάρχει αυξημένη έκφραση της Mad2 όταν στα κύτταρα επιδρά οξειδωτικό μέσο, άρα όταν βρίσκεται σε κατάσταση στρες. Στην δεύτερη εικόνα παρατηρείται μια μεγαλύτερη αύξηση της έκφρασης και αυτό ίσως υποδεικνύει ότι η κυτταρική γήρανση σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες προκαλούν ενεργοποίηση της Mad2 και αυξημένη έκφραση της. Τα παραπάνω απεικονίζονται γραφικά, παρακάτω:



**Γράφημα 4:** Γραφική απεικόνιση της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Mad2 όταν στα κύτταρα έχει επιδράσει οξειδωτικό μέσο (passage 8).



**Γράφημα 5:** Γραφική απεικόνιση της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Mad2 όταν στα κύτταρα έχει επιδράσει οξειδωτικό μέσο (passage 15).

## (Δ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναλύθηκε και ανωτέρω αντικείμενο ενασχόλησης της παρούσας εργασίας είναι το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC) και πιο συγκεκριμένα δύο από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του SAC δηλαδή η Mad2 και η BubR1. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα της ουσίας του Wharton (Wharton's Jelly MSCs) τα οποία σε διάφορα στάδια (passages) επώαστηκαν παρουσία οξειδωτικού μέσου ή/και ταξόλης. Η ταξόλη είναι γνωστό ότι προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου στη μετάφαση όταν τα κύτταρα διαθέτουν λειτουργικό SAC. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί μια πληθώρα βλαβών στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένης της γενωμικής αστάθειας. Στόχος ήταν να μελετήσουμε ποια η επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο μηχανισμό του SAC μελετώντας πιο συγκεκριμένα τις προαναφερόμενες πρωτεΐνες (Mad2 και BubR1). Επιπλέον θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίπτωση της κυτταρικής γήρανσης στο μηχανισμό του SAC. Για το λόγο αυτό, η λειτουργία του SAC καθώς και τα επίπεδα των Mad2 και η BubR1 μελετήθηκαν και σε νεαρά κύτταρα (passage 8) και σε κύτταρα «μεγαλύτερης ηλικίας» (passage 15).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της BubR1 όταν νεαρά κύτταρα επώαστηκαν με  $H_2O_2$ . Ανάλογα αυξήθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Mad2. Η αύξηση ακολουθείται από μείωση των επιπέδων των BubR1 και Mad2 στα αρχικά τους επίπεδα κατά την ανάκαμψη των κυττάρων από το στρες. Επιπλέον δείξαμε ότι η απόκριση των πρωτεϊνών αυτών στο οξειδωτικό στρες σε κύτταρα μεγαλύτερης ηλικίας ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο. Συνεπώς θεωρούμε ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί αλλαγές στα επίπεδα των βασικών SAC πρωτεϊνών, που όμως εξαρτώνται από την ηλικία των κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η επίδραση του οξειδωτικού στρες στο μιτωτικό σημείο ελέγχου. Για το λόγο αυτό επώαστηκαν κύτταρα παρουσία  $H_2O_2$  που στην συνέχεια επιδράσαμε με ταξόλη, η οποία μπορεί να επάγει σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Όταν προηγήθηκε η επίδραση του  $H_2O_2$  τα κύτταρα συνέχισαν τον κυτταρικό κύκλο. Άρα θεωρούμε ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί δυσλειτουργία του SAC και μπορεί να το «παρακάμψει», ακόμα και αν τα κύτταρα είναι ήδη σταματημένα στη μετάφαση.

Ανάλογη έρευνα πραγματοποιήθηκε και από τον Vincenzo D'Angiolella και την ομάδα του. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η ομάδα μελέτησε κύτταρα μιας καρκινικής σειράς (HeLa), στα οποία μέσω της χρήσης ταξόλης προκάλεσαν παύση του κύκλου στη μετάφαση. Τα κύτταρα που σταμάτησαν στη μετάφαση, μεταφέρθηκαν σε νέα φλάσκα και πάλι παρουσία του αναστολέα των μικροσωληνίσκων (ταξόλη). Εν συνεχεία τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  τα κύτταρα βγήκαν από τη μίτωση και συνέχισαν τον κυτταρικό κύκλο (D'Angiolella, Santarpia and Grieco, 2007). Αυτό το αποτέλεσμα είναι ανάλογο των δικών μας συμπερασμάτων, ενώ είναι πιθανό να σχετίζεται με επίδραση στα επίπεδα των SAC πρωτεϊνών που τα πειράματά μας επίσης κατέδειξαν .



Υπάρχουν επιπλέον μελέτες οι οποίες έχουν συσχετίσει την κυτταρική γήρανση με το SAC. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη (Lentini *et al.*, 2012), «απενεργοποίησαν» την Mad2 μέσω RNAi σε πρωτογενείς ινοβλάστες (IMR90) και σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού (MCF10A). Στόχος ήταν να ελεγχθεί η γενωμική αστάθεια που προκαλείται από το έλλειμμα αυτής της πρωτεΐνης. Στα κύτταρα IMR90 η απώλεια της Mad2 προκάλεσε αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (πρόκληση ανευπλοειδίας). Ως συνέπεια σταμάτησε ο κυτταρικός κύκλος και τα κύτταρα μπήκαν στη διαδικασία της (πρόωρης) κυτταρικής γήρανσης. Η μελέτη αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας καθώς καταδείξαμε ότι στα κύτταρα μεγαλύτερης ηλικίας υπάρχει διαφορετική απόκριση των SAC πρωτεϊνών που πιθανό να σχετίζεται και με αλλαγές στη λειτουργία του SAC. Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας έχει δείξει άλλωστε ότι τα γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έχουν αυξημένη γενωμική αστάθεια (μικροπυρήνες, μιτωτικές βλάβες κ.ά.) που επίσης σχετίζονται με δυσλειτουργικό SAC (Trachana *et al.*, 2017).

Μια ακόμη μελέτη σχετίζει μια μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης BubR1 με τη γήρανση και το ηλικιο-εξαρτώμενο νευροεκφυλισμό. Είναι γνωστό πως με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της ηλικίας σε έναν οργανισμό, υπάρχει ένα ποσοστό γνωστικής δυσλειτουργίας. Στοιχεία αναφέρουν πως υπάρχει μια πτώση στην σηματοδότηση του SAC όσο αυξάνεται η ηλικία ενός οργανισμού και πιο συγκεκριμένα μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης BubR1. Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια τα οποία εκφράζουν ήδη σε χαμηλά επίπεδα την BubR1 και δείχθηκε πως αυτά τα πειραματόζωα είχαν πρόβλημα στη δημιουργία και ωρίμανση νέων νευρώνων. Πιθανότατα η BubR1 είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ρυθμίζει τα γεγονότα της νευρογένεσης και ίσως είναι μια πρωτεΐνη κλειδί όσο αφορά την παθολογία του υποκάμπου του εγκεφάλου στις ηλικιο-συσχετιζόμενες νευροεκφυλιστικές νόσους (Yang *et al.*, 2017). Τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Mad2 καθώς αυξάνει η ηλικία των κυττάρων. Το γεγονός αυτό πιθανά να υποδηλώνει διαφορετική ρύθμιση για τις δύο αυτές πρωτεΐνες του SAC κατά την αύξησης της ηλικίας.

Οι μελέτες για πιθανές θεραπείες διάφορων ασθενειών έχουν ξεφύγει εδώ και χρόνια από τα στενά πλαίσια της φαρμακευτικής αγωγής. Το μέλλον σε αυτό τον τομέα αποτελούν οι κυτταρικές θεραπείες, οι οποίες είναι πολλά υποσχόμενες. Για την εφαρμογή τους χρησιμοποιούνται μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, τα MSCs απομονώνονται σχετικά εύκολα αλλά εμφανίζουν προβλήματα στις καλλιέργειες. Μειώνεται το μήκος των τελομερών τους είτε από την απομόνωσή τους από τον αντίστοιχο ιστό μέχρι να καλλιεργηθούν, είτε πολλαπλασιάζονται με αυξημένο ρυθμό στην κυτταροκαλλιέργεια. Με αυτόν τον τρόπο φτάνουν γρήγορα σε ένα σημείο στο οποίο είτε έχουν συσσωρεύσει πληθώρα γενετικών βλαβών από ενδογενείς ή/και εξωγενείς παράγοντες (π.χ. οξειδωτικό στρες) είτε έχει μειωθεί δραματικά το μήκος των τελομερών τους και έτσι μειώνεται ο ρυθμός με τον οποίο αναδιπλασιάζονται μέχρις ότου φτάσουν σε ένα σημείο όπου γίνεται παύση του κυτταρικού κύκλου και το κύτταρο μπαίνει στη διαδικασία της γήρανσης. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρά το ενδογενές ή/και εξωγενές οξειδωτικό στρες στο SAC, όπως επίσης και η σχέση του με την κυτταρική γήρανση είναι γεγονότα που πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω και να αποσαφηνιστούν. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να γίνουν οι σωστοί χειρισμοί-

επιδράσεις σε καλλιέργειες μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων έτσι ώστε να διατηρήσουν το δυναμικό αυτό-ανανέωσης τους (stemness) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να αποφύγουν την πρόωρη κυτταρική γήρανση. Στις κυτταρικές θεραπείες υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί όπως επίσης και δυσκολίες στην εφαρμογή τους (π.χ. απομόνωση ή/και μεταφορά των κυττάρων στον εκάστοτε ιστό, απόρριψη των κυττάρων, κλπ.) . Το να μπορέσουμε να διατηρήσουμε σε ένα καλό δυναμικό τα βλαστοκύτταρα (που είναι η βάση αυτών των θεραπειών) είναι μια καλή αρχή ώστε να υπάρχει ένα πρόβλημα λιγότερο σε αυτόν τον τομέα και να μπορέσουν να προχωρήσουν οι μελέτες προς αυτήν την κατεύθυνση. Μπορούμε συνεπώς να ελπίζουμε σε εφαρμογή των κυτταρικών θεραπειών σε μια πληθώρα ασθενειών συνεπώς σε βελτίωση των συμπτωμάτων ή ακόμα και ίασης τέτοιων παθολογικών καταστάσεων.

## (Ε) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen, R. G. *et al.* (1999) 'Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38)', *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Blackwell, 180(1), pp. 114–122. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<114::AID-JCP13>3.0.CO;2-0.
- Baxter, M. A. *et al.* (2004) 'Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion.', *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(5), pp. 675–82. doi: 10.1634/stemcells.22-5-675.
- Bayreuther, K. *et al.* (1988) 'Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), pp. 5112–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3393534> (Accessed: 8 November 2018).
- Ben-Porath, I. and Weinberg, R. A. (2005) 'The signals and pathways activating cellular senescence', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), pp. 961–976. doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.013.
- Bianco, P., Robey, P. G. and Simmons, P. J. (2008) 'Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays.', *Cell stem cell*, 2(4), pp. 313–9. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002.
- Burton, J. L. and Solomon, M. J. (2007) 'Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC<sup>Cdc20</sup> in the spindle assembly checkpoint.', *Genes & development*, 21(6), pp. 655–67. doi: 10.1101/gad.1511107.
- Campisi, J. (1997) 'The biology of replicative senescence', *European Journal of Cancer*. Pergamon, 33(5), pp. 703–709. doi: 10.1016/S0959-8049(96)00058-5.
- Chan, G. K., Schaar, B. T. and Yen, T. J. (1998) 'Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1.', *The Journal of cell biology*, 143(1), pp. 49–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9763420> (Accessed: 19 November 2018).
- Chang, L. and Barford, D. (2014) 'Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis.', *Current opinion in structural biology*, 29, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.003.
- Chao, W. C. H. *et al.* (2012) 'Structure of the mitotic checkpoint complex.', *Nature*, 484(7393), pp. 208–13. doi: 10.1038/nature10896.
- Cheeseman, I. M. (2014) 'The Kinetochore', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(7), pp. a015826–a015826. doi: 10.1101/cshperspect.a015826.
- Chen, Q. *et al.* (1995) 'Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), pp. 4337–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753808> (Accessed: 8 November 2018).
- Collins, K. and Mitchell, J. R. (2002) 'Telomerase in the human organism', *Oncogene*, 21(4), pp. 564–579. doi: 10.1038/sj.onc.1205083.
- Correia-Melo, C., Hewitt, G. and Passos, J. F. (2014) 'Telomeres, oxidative stress and

inflammatory factors: partners in cellular senescence?’, *Longevity & Healthspan*, 3(1), p. 1. doi: 10.1186/2046-2395-3-1.

Cross, F. R. (1988) ‘DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*.’, *Molecular and cellular biology*, 8(11), pp. 4675–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3062366> (Accessed: 31 October 2018).

D’Angiolella, V., Santarpia, C. and Grieco, D. (2007) ‘Oxidative stress overrides the spindle checkpoint’, *Cell Cycle*, 6(5), pp. 576–579. doi: 10.4161/cc.6.5.3934.

Dick, A. E. and Gerlich, D. W. (2013) ‘Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling’, *Nature Cell Biology*, 15(11), pp. 1370–1377. doi: 10.1038/ncb2842.

Dröge, W. (2002) ‘Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function’, *Physiological Reviews*, 82(1), pp. 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

Estrada, J. C. *et al.* (2013) ‘Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy.’, *Cell death & disease*, 4(6), p. e691. doi: 10.1038/cddis.2013.211.

Fernandez-Capetillo, O. and Nussenzweig, A. (2004) ‘Aging counts on chromosomes.’, *Nature genetics*, 36(7), pp. 672–4. doi: 10.1038/ng0704-672.

Finkel, T. (2003) ‘Oxidant signals and oxidative stress.’, *Current opinion in cell biology*, 15(2), pp. 247–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648682> (Accessed: 25 August 2018).

Foley, E. A. and Kapoor, T. M. (2013) ‘Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore.’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(1), pp. 25–37. doi: 10.1038/nrm3494.

Foss, M. *et al.* (2008) ‘Taxol crystals can masquerade as stabilized microtubules.’, *PloS one*. Edited by D. Lew, 3(1), p. e1476. doi: 10.1371/journal.pone.0001476.

Fraschini, R. *et al.* (2001) ‘Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores.’, *The EMBO journal*, 20(23), pp. 6648–59. doi: 10.1093/emboj/20.23.6648.

Fukagawa, T. and Earnshaw, W. C. (2014) ‘The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery’, *Developmental Cell*, 30(5), pp. 496–508. doi: 10.1016/j.devcel.2014.08.016.

GU, Y. *et al.* (2016) ‘Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro’, *Molecular Medicine Reports*, 13(6), pp. 5207–5215. doi: 10.3892/mmr.2016.5169.

Hardwick, K. G. *et al.* (2000) ‘MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p.’, *The Journal of cell biology*, 148(5), pp. 871–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704439> (Accessed: 13 August 2018).

HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P. S. (1961) ‘The serial cultivation of human diploid cell strains.’, *Experimental cell research*, 25, pp. 585–621. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13905658> (Accessed: 8 November 2018).

Herzog, F. *et al.* (2009) ‘Structure of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Interacting with a Mitotic Checkpoint Complex’, *Science*, 323(5920), pp. 1477–1481. doi: 10.1126/science.1163300.

- Horwitz, S. B. (2004) 'Personal recollections on the early development of taxol.', *Journal of natural products*, 67(2), pp. 136–8. doi: 10.1021/np0304464.
- Howell, B. J. *et al.* (2004) 'Spindle Checkpoint Protein Dynamics at Kinetochores in Living Cells', *Current Biology*, 14(11), pp. 953–964. doi: 10.1016/j.cub.2004.05.053.
- HUTTER, E. *et al.* (2004) 'Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts', *Biochemical Journal*, 380(3), pp. 919–928. doi: 10.1042/bj20040095.
- Hütter, E. *et al.* (no date) 'Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress.', *Experimental gerontology*, 37(10–11), pp. 1165–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470828> (Accessed: 8 November 2018).
- Hwang, L. H. *et al.* (1998) 'Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint.', *Science (New York, N.Y.)*, 279(5353), pp. 1041–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461437> (Accessed: 13 August 2018).
- Ikawa-Yoshida, A. *et al.* (2013) 'Contribution of BubR1 to oxidative stress-induced aneuploidy in p53-deficient cells.', *Cancer medicine*, 2(4), pp. 447–56. doi: 10.1002/cam4.101.
- Kalaszczynska, I. *et al.* (2015) 'Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–11. doi: 10.1155/2015/430847.
- Kasper, G. *et al.* (2009) 'Insights into Mesenchymal Stem Cell Aging: Involvement of Antioxidant Defense and Actin Cytoskeleton', *Stem Cells*, 27(6), pp. 1288–1297. doi: 10.1002/stem.49.
- Kim, D. W. *et al.* (2013) 'Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and Optimizing their therapeutic potential for clinical applications', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp. 11692–11712. doi: 10.3390/ijms140611692.
- Kim, S. H. *et al.* (1998) 'Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint.', *Science (New York, N.Y.)*, 279(5353), pp. 1045–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461438> (Accessed: 13 August 2018).
- Klatt, P. and Lamas, S. (2000) 'Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress.', *European journal of biochemistry*, 267(16), pp. 4928–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931175> (Accessed: 18 August 2018).
- Kovacic, P. and Jacintho, J. D. (2001) 'Reproductive toxins: pervasive theme of oxidative stress and electron transfer.', *Current medicinal chemistry*, 8(7), pp. 863–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375756> (Accessed: 18 August 2018).
- Kulukian, A., Han, J. S. and Cleveland, D. W. (2009) 'Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding.', *Developmental cell*, 16(1), pp. 105–17. doi: 10.1016/j.devcel.2008.11.005.
- Kumar, N. (1981) 'Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action.', *The Journal of biological chemistry*, 256(20), pp. 10435–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6116707> (Accessed: 16 November 2018).
- Lachance, P. A., Nakat, Z. and Jeong, W. S. (2001) 'Antioxidants: an integrative approach.', *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 17(10), pp. 835–8. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684390> (Accessed: 18 August 2018).
- Lara-Gonzalez, P. *et al.* (2011) 'BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner.', *Journal of cell science*, 124(Pt 24), pp. 4332–45. doi: 10.1242/jcs.094763.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. and Taylor, S. S. (2012) 'The spindle assembly checkpoint', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 22(22), pp. R966–R980. doi: 10.1016/j.cub.2012.10.006.
- Lentini, L. *et al.* (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), pp. 3324–3332. doi: 10.1002/jcp.24030.
- Lu, T. and Finkel, T. (2008) 'Free radicals and senescence', *Experimental Cell Research*, 314(9), pp. 1918–1922. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.01.011.
- MITCHISON, J. M. (1957) 'The growth of single cells. I. *Schizosaccharomyces pombe*.', *Experimental cell research*, 13(2), pp. 244–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13480293> (Accessed: 31 October 2018).
- Moreno, S., Nurse, P. and Russell, P. (1990) 'Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast.', *Nature*, 344(6266), pp. 549–52. doi: 10.1038/344549a0.
- Nash, R. *et al.* (1988) 'The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog.', *The EMBO journal*, 7(13), pp. 4335–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2907481> (Accessed: 31 October 2018).
- Nurse, P. (1975) 'Genetic control of cell size at cell division in yeast.', *Nature*, 256(5518), pp. 547–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1165770> (Accessed: 31 October 2018).
- Ohshima, S. (2008) 'Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence', *Cytometry Part A*, 73A(9), pp. 808–815. doi: 10.1002/cyto.a.20604.
- Passos, J. F. *et al.* (2007) 'Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence.', *PLoS biology*. Edited by T. De Lange, 5(5), p. e110. doi: 10.1371/journal.pbio.0050110.
- Passos, J. F. and Von Zglinicki, T. (2006) 'Oxygen free radicals in cell senescence: Are they signal transducers?', *Free Radical Research*, 40(12), pp. 1277–1283. doi: 10.1080/10715760600917151.
- Primorac, I. and Musacchio, A. (2013) 'Panta rhei: the APC/C at steady state.', *The Journal of cell biology*, 201(2), pp. 177–89. doi: 10.1083/jcb.201301130.
- Rai, P. *et al.* (2009) 'Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), pp. 169–74. doi: 10.1073/pnas.0809834106.
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. (2004) 'Aneuploidy and cancer', *Nature*, 432(7015), pp. 338–341. doi: 10.1038/nature03099.
- Santaguida, S. *et al.* (2011) 'Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction.', *The EMBO journal*, 30(8), pp. 1508–19. doi: 10.1038/emboj.2011.70.

- Santaguida, S. and Amon, A. (2015) 'Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(8), pp. 473–85. doi: 10.1038/nrm4025.
- Schiff, P. B., Fant, J. and Horwitz, S. B. (1979) 'Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol.', *Nature*, 277(5698), pp. 665–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/423966> (Accessed: 16 November 2018).
- Sczaniecka, M. *et al.* (2008) 'The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-anaphase-promoting complex (APC/C).', *The Journal of biological chemistry*, 283(34), pp. 23039–47. doi: 10.1074/jbc.M803594200.
- Skoufias, D. A. *et al.* (2001) 'Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), pp. 4492–7. doi: 10.1073/pnas.081076898.
- Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2002) 'Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells.', *The EMBO journal*, 21(16), pp. 4338–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169636> (Accessed: 25 November 2018).
- Sudakin, V., Chan, G. K. T. and Yen, T. J. (2001) 'Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2', *Journal of Cell Biology*, 154(5), pp. 925–936. doi: 10.1083/jcb.200102093.
- Tang, Z. *et al.* (2001) 'Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1.', *Developmental cell*, 1(2), pp. 227–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11702782> (Accessed: 19 November 2018).
- Trachana, V. *et al.* (2007) 'Dido disruption leads to centrosome amplification and mitotic checkpoint defects compromising chromosome stability.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), pp. 2691–6. doi: 10.1073/pnas.0611132104.
- Trachana, V. *et al.* (2017) 'Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage', *Cytotherapy*, 19(7). doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.078.
- Valko, M. *et al.* (2001) 'Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?', *Biochimica et biophysica acta*, 1527(3), pp. 161–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479033> (Accessed: 18 August 2018).
- Valko, M. *et al.* (2006) 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer', *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), pp. 1–40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Vleugel, M. *et al.* (2012) 'Evolution and Function of the Mitotic Checkpoint', *Developmental Cell*, 23(2), pp. 239–250. doi: 10.1016/j.devcel.2012.06.013.
- Wei, X. *et al.* (2013) 'Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy', *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), pp. 747–754. doi: 10.1038/aps.2013.50.
- Wittmann, T., Hyman, A. and Desai, A. (2001) 'The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors.', *Nature cell biology*, 3(1), pp. E28-34. doi: 10.1038/35050669.
- Wu, H. *et al.* (2000) 'p53CDC/hCDC20 is associated with BUBR1 and may be a downstream target of the spindle checkpoint kinase.', *Oncogene*, 19(40), pp. 4557–62. doi: 10.1038/sj.onc.1203803.

Yang, Z. *et al.* (2017) 'Age-related decline in BubR1 impairs adult hippocampal neurogenesis', *Aging Cell*, 16(3), pp. 598–601. doi: 10.1111/accel.12594.

Yao, X. *et al.* (2000) 'CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint', *Nature Cell Biology*, 2(8), pp. 484–491. doi: 10.1038/35019518.

Yu, H. (2007) 'Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine.', *Molecular cell*, 27(1), pp. 3–16. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.009.

von Zglinicki, T. (2002) 'Oxidative stress shortens telomeres.', *Trends in biochemical sciences*, 27(7), pp. 339–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114022> (Accessed: 8 November 2018).

Zuk, P. A. *et al.* (2001) 'Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies', *Tissue Engineering*, 7(2), pp. 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.

ZWERSCHKE, W. *et al.* (2003) 'Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence', *Biochemical Journal*, 376(2), pp. 403–411. doi: 10.1042/bj20030816.