

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Gadd45a ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ
ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

**ΧΑΡΙΤΩΝ ΘΕΟΔΩΡΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (Επιβλέπουσα)
ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (Μέλος Τριμελούς
Επιτροπής)
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ (Μέλος
Τριμελούς Επιτροπής)**

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

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

**«THE ROLE OF PROTEIN GADD45a DURING AGING OF MESENCHYMALS
STEM CELLS»**

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η Διπλωματική αυτή Εργασία διεξήχθη στο εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν την παρουσίαση αυτής της εργασίας και των αποτελεσμάτων της θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που γνώρισα, συναναστράφηκα και συνεργάστηκα καθ'όλη την διάρκεια διεκπεραίωσής της.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κα. Βαρβάρα Τραχανά για την διαθεσιμότητά της σε όλες τις στιγμές που την χρειάστηκα, την ευχάριστη διάθεσή της να με βοηθήσει και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ'όλη την διάρκεια των πειραμάτων που χρειάστηκαν να εκπονηθούν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την υπεύθυνη καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος κα. Ασπασία Τσέζου, που με δέχθηκε στο μεταπτυχιακό αλλά και την συνεχή βοήθεια της σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού και την διαθεσιμότητάς της για την οποιαδήποτε απορία είχα για το Μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα και την εξέλιξή του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Δήμα για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή για την εξέτασης της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα, Ανδρέα Γούτα, ο οποίος με τις γνώσεις του, την υπομονή του και τις χρήσιμες συμβουλές του συνέβαλε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της Διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι ευρέως γνωστά για τις ιδιότητες. Επιπλέον το οξειδωτικό στρες (ROS) είναι γνωστό για τις δυσλειτουργίες που προκαλεί στα βλαστοκύτταρα, καθώς επίσης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει στενά την γήρανσή τους. Έχει επιπλέον αποδειχθεί σε μερικές έρευνες πως η πρωτεΐνη GADD45 έχει άμεση συσχέτιση με όλα τα παραπάνω.

Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε αυτή την συσχέτιση της GADD45 και πιο συγκεκριμένα της GADD45a, μεταξύ του ROS και της γήρανσης στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Για να το πετύχουμε αυτό, μελετήσαμε την επίδραση του εξωγενούς επαγόμενου οξειδωτικού στρες στη ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με την γήρανση των βλαστοκυττάρων που είχαμε στη διάθεσή μας για το συγκεκριμένο πείραμα. Αρχικά συγκρίθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα της GADD45a των νεαρών, μεσαίας ηλικίας και των γηρασμένων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Στη συνέχεια επιδράσαμε τα βλαστοκύτταρα όλων των ηλικιών με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ενώ επιτρέψαμε στα κύτταρα να ανακάμψουν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Έπειτα αναλύσαμε τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των γονιδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω ακριβώς μετά την επίδραση του στρες και έπειτα από όλα τα διαφορετικά διαστήματα ανάκαμψης. Τέλος, γνωρίζοντας την επίδραση της UV ακτινοβολίας στα μεταγραφικά επίπεδα της GADD45a στα βλαστοκύτταρα, συμπεριλάβαμε και αυτή τη δοκιμασία στο πείραμα μας. Σε όλες τις δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε και το γονίδιο p16 σε μερικές περιπτώσεις διότι παρατηρήθηκε η αύξηση του κατά την αύξηση της GADD45a κατά την διάρκεια των πειραμάτων μας.

Τα αποτελέσματα του πειράματός μας έδειξαν αύξηση των επιπέδων της GADD45A στα νεαρά βλαστοκύτταρα κατά την επίδραση και με UV και με ROS, καθώς στη δεύτερη περίπτωση έγινε μείωση των επιπέδων σχεδόν στα φυσιολογικά μετά από ανάκαμψη. Παρατηρήθηκε αύξηση της GADD45a και στην περίπτωση των γηρασμένων και μείωση της, σχεδόν πάλι στα φυσιολογικά, μετά από ανάκαμψη αλλά με αργότερο ρυθμό από αυτόν των νεαρών. Τέλος παρατηρήθηκε και αύξηση του p16 και στα νεαρά και στα γηρασμένα κατά την αύξηση της GADD45a.

Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν παρόμοιες έρευνες και παρέχουν νέα δεδομένα για την συσχέτιση της GADD45a και την γήρανση των βλαστοκυττάρων.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells are widely known for their features. In addition, oxidative stress (ROS) is known for its dysfunctions in stem cells, as well as has been shown to have a very close effect on their aging. It has also been shown in some surveys that GADD45 protein has a direct correlation with all of the above.

In this paper, we investigated this correlation of GADD45 and more specifically GADD45a, between ROS and aging in mesenchymal stem cells. To achieve this, we studied the effect of exogenous induced oxidative stress on the regulation of genes related to the aging of stem cells that we had at our disposal for this particular experiment. Initially, the transcriptographic levels of GADD45a of young, middle-aged and old-aged mesenchymal stem cells were compared. Then, we had stem cells of all ages with hydrogen peroxide (H_2O_2) We allowed the cells to recover for different time intervals and after that we analyzed the transcribe and protein levels of the genes reported. Finally, knowing the effect of UV radiation on the transcriptographic levels of GADD45a in stem cells, we have included this test in our experiment. In all tests, β -actin was used as reference gene. In addition, the gene P16 was studied also in some cases because we noticed his increase due to the increase of GADD45a during our experiments.

The results of our experiment showed an increase in GADD45a levels in young stem cells during the effect of both UV and ROS, as in the latter case, the levels were reduced to almost normal after recovery. An increase in GADD45a was observed in the case of aging and decrease, almost again to normal, after recovery but at a later rate than that of young ones. Finally, an increase in p16 was observed in both the young and the aged stem cells, during the GADD45a increase.

Our results confirm similar surveys and provide new data on the correlation of GADD45a and the aging of stem cells.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	σελίδα 3
Περίληψη	σελίδα 4
Abstract	σελίδα 5
Εισαγωγή	σελίδα 8
1. Βλαστοκύτταρα.....	σελίδα 8
Α. Γενικές Πληροφορίες.....	σελίδα 8
Β. Ενήλικα Βλαστοκύτταρα	σελίδα 9
Γ. Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα	σελίδα 10
2. Οξειδωτικό Στρες.....	σελίδα 13
Α. Άμεσες Επιπτώσεις ROS	σελίδα 14
Β. Αντίδραση Fenton.....	σελίδα 15
Γ. Οξειδωτικό Στρες και Βλαστοκύτταρα.....	σελίδα 16
3. Γήρανση	σελίδα 23
Α. Γήρανση και Βλαστοκύτταρα.....	σελίδα 23
Β. Γήρανση και Οξειδωτικό Στρες.....	σελίδα 28
4. Πρωτεΐνη GADD45	σελίδα 31
Α. Λειτουργίες Πρωτεΐνης.....	σελίδα 31
Β. Οξειδωτικό Στρες και GADD45	σελίδα 35
Γ. Γήρανση και GADD45	σελίδα 38
5. Σκοπός και Στόχοι Διπλωματικής.....	σελίδα 40
Υλικά και Μέθοδοι	σελίδα 41
1. Ασθενείς και Δείγματα.....	σελίδα 41
2. Καλλιέργεια Βλαστοκυττάρων	σελίδα 41
3. Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες σε 6-well plates.....	σελίδα 43
4. Απομόνωση Πρωτεϊνών.....	σελίδα 44
5. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου-SDS	σελίδα 46
6. Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών-Western Blot	σελίδα 47
7. Απομόνωση RNA	σελίδα 50
8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου.....	σελίδα 51
9. Στατιστική Ανάλυση.....	σελίδα 53
Αποτελέσματα.....	σελίδα 54

1. Ποσοτικός Προσδιορισμός του mRNA της GADD45 μετά από έκθεση των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων σε UV ακτινοβολία	σελίδα 54
2. Ποσοτικός Προσδιορισμός mRNA της GADD45 μετά από έκθεση των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων σε οξειδωτικό στρες (ROS) κατά την γήρανσή τους	σελίδα 55
Συζήτηση.....	σελίδα 57
Βιβλιογραφία	σελίδα 60

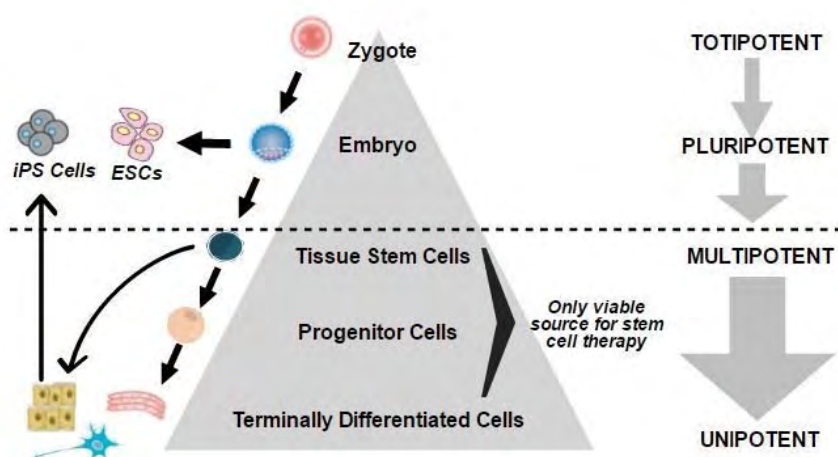
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βλαστοκύτταρα

A. Γενικές Πληροφορίες

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να θεωρηθούν ως οι δομικοί λίθοι του αιμοποιητικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι αρχέγονα, μη διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία έχουν την ιδιότητα της αυτό-ανανέωσης και την δυνατότητα διαφοροποίησης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους¹.

Το πλέον πρωτόγονο βλαστοκύτταρο στον οργανισμό είναι το γονιμοποιημένο ωάριο, δηλαδή το γνωστό σε όλους, ζυγωτό. Όταν το ζυγωτό διαιρείται, οι απόγονοί του μέχρι και την 4^η ημέρα ανάπτυξης από την γονιμοποίηση, αντιπροσωπεύουν τα Totipotent Stem Cells (Παντοδύναμα Βλαστοκύτταρα). Τα Totipotent διαιρούμενα θα δημιουργήσουν μια κοίλη κυτταρική μπάλα, γνωστή ως Βλαστοκύστη η οποία περιέχει μια συστάδα από κύτταρα που ονομάζεται Εσωτερική Κυτταρική Μάζα. Η Μάζα αυτή αποτελείται από τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα τα οποία είναι ευρέως γνωστά ως Pluripotent Stem Cells (Ολοδύναμα Βλαστοκύτταρα), από τα οποία και αναπτύσσεται το έμβρυο. Οι ιστοί έχουν επίσης βλαστοκύτταρα, τα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα, τα οποία είναι Multipotent Stem Cells (Πολυδύναμα Βλαστοκύτταρα) και, που μπορούν να αναπτύξουν συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Στο τέλος της αλυσίδας βρίσκονται τα Unipotent Stem Cells (Μονοδύναμα Βλαστοκύτταρα), τα οποία παράγουν ένα και μόνο τύπο κυττάρων (Εικόνα 1) ².



Εικόνα 1: Δυναμικότητα Βλαστοκυττάρων

B. Ενήλικα Βλαστοκύτταρα

Τα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα (Adult Stem Cells-ASC), είναι, όπως αναφέρθηκε, Πολυδύναμα (Multipotent) Βλαστοκύτταρα μπορούν να βρίσκονται σε διάφορα μέρη του σώματος, όπως η επιφάνεια του ματιού, ο εγκέφαλος, το δέρμα, ο μαστός, το έντερο, ο μυελός των οστών και αλλού³.

Ο ορισμός των ASC είναι ουσιαστικά η λειτουργία τους, δηλαδή η ικανότητα τους να αναγεννούν τους ιστούς όπου εντοπίζονται καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής.

Τα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα εν συντομία:

- Βρίσκονται σε διάφορους ιστούς όπως αναφέραμε παραπάνω
- Είναι σημαντικά για την ανάπτυξη, την επούλωση και την αντικατάσταση των κυττάρων των ιστών που έχουν υποστεί κακώσεις ή ακόμα και καταστραφεί.

Σε ιστούς που δεν έχουν υποστεί βλάβη, τα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα βρίσκονται σε μια αναστρέψιμη κατάσταση διακοπής του κυτταρικού κύκλου, μια κατάσταση δηλαδή όπου τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως Quiescence (ηρεμία ή αδράνεια) ή G0. Η βασική ιδιότητα της G0 είναι η διατήρηση της πολυδυναμικότητας (stemness) των ASC, εμποδίζοντας την πρόωρη διαφοροποίηση τους και κατ'έκταση την διατήρηση ενός αριθμού αδιαφοροποίητων ASC για μεταγενέστερη ενδεχόμενη χρήση τους³.

Έπειτα από ένα τραυματισμό ενός ιστού, εκπέμπονται διαλυτά και μηχανικά σήματα από την θέση τραυματισμού, όπου τα ASC-G0 κύτταρα ενεργοποιούνται και παράγουν πλήθος πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων που με την σειρά τους διαφοροποιούνται σε λειτουργικά ώριμα κύτταρα, ικανά να αναγεννούν τους ιστούς³.

Η κατάσταση Quiescence φαίνεται να προστατεύει τα ASC από το Οξειδωτικό Στρες⁴. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι αυτό γίνεται μέσω της ρύθμισης των γονιδίων που μετριάζουν το τοξικό αποτέλεσμα των ελεύθερων ριζών που προκαλούν το Οξειδωτικό Στρες. Τέτοια γονίδια είναι για παράδειγμα τα γονίδια της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 3 (GPX3), της σουλφειρεδοξίνης (SRXN) και της ρεδουκτάσης της θειορεδοξίνης 1 (TXNRD1) που εμπλέκονται στην απόκριση με το στρες και μελέτες έδειξαν ότι υπερεκφράζονται στα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία-G0⁴. Εκτός από τα γονίδια αυτά, υπερεκφράζονται στα G0 ASCs και μεταφορείς της κυτταρικής επιφάνειας, όπως ο Abcb1a, ο Abca5 και ο Abcc9, οι οποίοι διαμεσολαβούν στην εκροή τοξικών ουσιών⁴.

Θα ήταν αξιοσημείωτο να αναφέρουμε πως οι μελέτες για το Quiescence των ASCs, γίνονται κυρίως με Ενήλικα Βλαστοκύτταρα όπως τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα [HSCs] και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα τα οποία είναι κλινικά πολύ σημαντικά για την αναγέννησης των ιστών ⁴.

Γ.Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα υπάρχουν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα και συλλέγονται από τη φλέβα του ομφαλίου λώρου. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες μελέτες, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, που πρόκειται για Multipotent Stem Cells, τα οποία συλλέγονται από τον ιστό του ομφαλίου λώρου και εντοπίζονται στη ζελατινώδη ουσία του Wharton, έχουν μεγαλύτερη αξία από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Γι' αυτό τον λόγο κιάλας οι μαιευτήρες κρατούν και μέρος του ομφαλίου, περίπου στα 10 εκατοστά. Ο ιστός του ομφαλίου λώρου περιέχει τα μεσεγχυματικά κύτταρα και ελάχιστα άνευ αξίας ώριμα μεταναστευτικά κύτταρα του αίματος. Ως εκ τούτου η φύλαξη του λώρου γίνεται αποκλειστικά και μόνο για τα μεσεγχυματικά κύτταρα².



Εικόνα 2: Ομφάλιος Λώρος

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του ομφαλίου λώρου διατηρούν τις ιδιότητες των αρχέγονων κυττάρων για συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Από εκεί και πέρα συμπεριφέρονται ως ώριμα κύτταρα με περιορισμένη δυνατότητα εξέλιξης.

Τα μεσεγχυματικά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα ουσιαστικά, είναι πολυδύναμα μη-αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, τενοντοκύτταρα, μυοκύτταρα και

αστροκύτταρα. Επιπλέον, δίνουν στα αιμοποιητικά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα το απαραίτητο υπόστρωμα για την ανανέωση και διαφοροποίηση τους (stemness)³.

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εξυπηρετούν την αναγέννηση, αποκατάσταση ή επανόρθωση κατεστραμμένων ιστών και οργάνων όπως:

- αναγέννηση δέρματος, χόνδρων, συνδέσμων και νευρικού ιστού
- αντιμετώπιση προβλημάτων απόρριψης μοσχευμάτων

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από τον ομφάλιο λώρο έχουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα:

- είναι νεαρά κύτταρα καθώς έχουν κάνει ελάχιστες διαιρέσεις πριν την απομόνωσή τους από το έμβρυο
- είναι εύκολα στην συλλογή τους
- η λήψη τους δεν εμπλέκει ηθικά ζητήματα όπως με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.

Η αποθήκευση και η κρυοσυντήρηση των κυττάρων αυτών, θεωρείται ότι μπορεί να προσφέρει πολλά θεραπευτικά οφέλη στο μέλλον για το ίδιο το παιδί και την οικογένειά του. Ακριβώς μετά τον τοκετό, ο γιατρός συλλέγει τον ομφάλιο λώρο, μετά την αποκοπή του, και στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται στο εργαστήριο όπου απομονώνονται τα βλαστικά κύτταρα και καταψύχονται. Η διαδικασία είναι απόλυτα ασφαλής, απλή και ανώδυνη, όμως μπορεί να γίνει μόνο μία φορά, την ώρα όπου μόλις έχει γεννηθεί το παιδί.

Θα ήταν αξιοσημείωτο να αναφέρουμε πως τα μεσεγχυματικά κύτταρα χρησιμοποιούνται και σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία:

- αυτοάνοσων
- τραυματικών και εκφυλιστικών νοσημάτων όπως της σκλήρυνσης κατά πλάκας, της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, της ελκώδους κολίτιδας, της καρδιακής ανεπάρκειας, της νεανικής ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ΧΑΠ, της προωρότητας των νεογνών (ανάπτυξη εγκεφάλου, οφθαλμών και πνευμόνων)
- των καταγμάτων
- εγκαυμάτων
- τη μεταφορά φαρμάκων μέσα σε όργανα.

Η χορήγησή τους σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ (Μονάδα Εντατικής Θεραπείας) ελαττώνει το χρόνο νοσηλείας τους και αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης^{2,3}.



Εικόνα 3: Μορφή Βλαστοκυττάρου

2. Οξειδωτικό Στρες

Το οξειδωτικό στρες (Reactive Oxygen Species-ROS) αντιπροσωπεύει την διαταραχή της ισορροπίας που μπορεί να υπάρξει μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν στον οργανισμό⁵.

Όλα τα βασικά συστατικά των κυττάρων (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) μπορούν να αποτελέσουν στόχο των δραστικών ελευθέρων ριζών του ROS, οι οποίες σχηματίζονται με αφητηρία το οξυγόνο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών ξεκινά με την αναγωγή του οξυγόνου με ένα μονό ηλεκτρόνιο σε ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-), το οποίο μεταβολίζεται γρήγορα σε O_2 και H_2O_2 από τα ένζυμα δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs). Επιπλέον δε θα πρέπει να παραλείψουμε να αναφέρουμε ότι ούτε το O_2^- , ούτε το H_2O_2 αποτελούν ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες, αλλά χρειάζονται ιδιαίτερους μηχανισμούς για να δημιουργήσουν δραστικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οξείδωση των συστατικών των κυττάρων⁶.

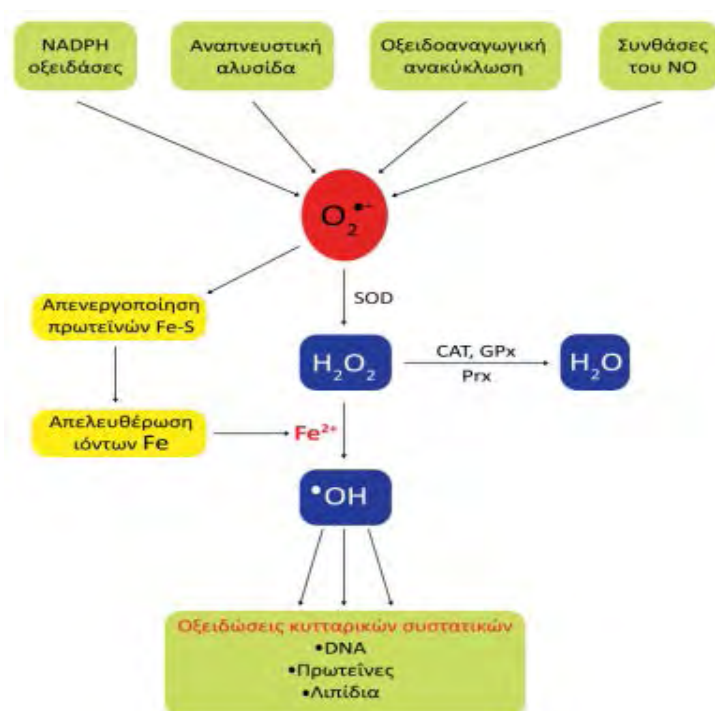
Θα ήταν αξιοσημείωτο να αναφέρουμε ότι το DNA μπορεί να υποστεί έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών οξειδωτικών βλαβών, ανάλογα με τους παράγοντες που τις προκαλούν. Σε αντίθεση με τις οξειδωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες συνήθως κατακερματίζονται και τα αμινοξέα τους επαναχρησιμοποιούνται, το οξειδωμένο DNA μπορεί να επιδιορθωθεί επί τόπου (in situ). Η μη επαρκής επιδιόρθωση του DNA μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση μεταλλάξεων στο γενετικό του υλικό κάτι το οποίο επηρεάζεται ανάλογα με την ένταση των ROS. Αυτό μπορεί να επιφέρει εν τέλει τον μετασχηματισμό του γενετικού υλικού του κυττάρου και, τελικά, τον κυτταρικό θάνατο είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση. Οι πρωτεΐνες αποτελούν στόχους οξείδωσης ανάλογα με τα κατάλοιπα αμινοξέων που περιέχει η καθεμιά. Τα αμινοξέα κυστεΐνη, μεθειονίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη είναι πιο ευαίσθητα σε οξειδωτικές τροποποιήσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα⁶.

Τα ROS παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών παθήσεων, όπως η καρδιακή ανεπάρκεια. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και οδηγούν στην ανάπτυξη ασθενειών. Επιπλέον, η διαδικασία της γήρανσης σχετίζεται επίσης με το οξειδωτικό στρες, τα οποία συνδυαστικά μπορούν να επιφέρουν κάποια θετική εξέλιξη στην ανάπτυξη μια νόσου. Επιπρόσθετα οι

μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας είναι λιγότερο αποτελεσματικοί μετά την ηλικία των 40 ετών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση των λιπαρών οξέων και την υπεροξείδωση των λιπιδίων, με επακόλουθες αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των κυτταρικών μεμβρανών και των φωσφολιπιδίων, καθώς και μην μειωμένη επιδιόρθωση του DNA και κατ'επέκταση των μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό⁵.

A. Άμεσες Επιπτώσεις ROS

Η ανακάλυψη της βιολογικής δράσης της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD) το 1969 από τους McCord και Fridovich καθώς και η αναγνώριση της σημασίας της για την επιβίωση των αερόβιων οργανισμών, επιβεβαίωσαν και παλαιότερες θεωρίες για την τοξικότητα του οξυγόνου μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα.



Εικόνα 4: Απεικόνιση αντιδράσεων οξυγόνου και που μπορεί να προκαλέσει οξείδωση

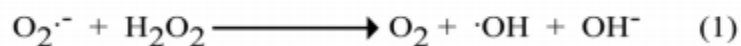
Ο ακριβής βιοχημικός μηχανισμός αυτής της τοξικής δράσης του $O_2^{\bullet -}$ δεν είναι απόλυτα γνωστός και θεωρείται ότι διαφέρει σε κάθε περίπτωση. Στην εικόνα 4 απεικονίζονται διαγραμματικά μερικές από τις αντιδράσεις οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην πρόκληση βλαβών του $O_2^{\bullet -}$ στα κύτταρα και τους ιστούς⁶.

Το $O_2^{\bullet -}$, ως ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, δεν έχει την ικανότητα να οξειδώνει άμεσα τα σημαντικά συστατικά των κυττάρων, με εξαίρεση να αποτελούν οι πρωτεΐνες που έχουν στο ενεργό τους κέντρο σύμπλοκα σιδήρου-θείου, όπως για

παράδειγμα η ακονιτάση των μιτοχονδρίων, η οποία συμμετέχει στον κύκλο του Krebs. Με την αντίδραση αυτή, εκτός από την απενεργοποίηση των αντίστοιχων ενζύμων, προκαλείται και απελευθέρωση ιόντων σιδήρου, τα οποία συμμετέχουν στην κατάλυση αντιδράσεων που οδηγούν στη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών (αντιδράσεις τύπου Fenton), με σοβαρές βλαπτικές συνέπειες για τα κύτταρα. Ένας ακόμα τρόπος ενίσχυσης της οξειδωτικής ικανότητας του O_2^- είναι η πρωτονίωσή του, η οποία αυξάνεται όσο το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται μειώνεται κάτω από το φυσιολογικό. Η πρωτονιωμένη μορφή του ανιόντος του σουπεροξειδίου (HO_2), έχει τη δυνατότητα να οξειδώνει αρκετά συστατικά των κυττάρων, όπως για παράδειγμα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών ή των λιποπρωτεϊνών. Η συγκέντρωσή του, ωστόσο, είναι εξαιρετικά χαμηλή λόγω του ότι σε φυσιολογικές τιμές του pH (7.2 με 7.3) ένα ελάχιστο ποσοστό του είναι αποπρωτονιωμένο. Σε ορισμένα σημεία, όμως, του κυττάρου στα οποία το pH είναι μειωμένο, όπως για παράδειγμα στο εσωτερικό των λυσοσωματίων ή στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ευνοείται ο σχηματισμός HO_2 και, κατά συνέπεια, μπορεί να έχει άμεσα τοξικές επιπτώσεις για τα κύτταρα. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι το O_2^- είναι πιο δραστικό σε οργανικούς διαλύτες από ό,τι σε υδατικά διαλύματα. Αυτό θα μπορούσε να έχει ως συνέπεια το O_2^- που δημιουργείται στο λιπόφιλο εσωτερικό των μεμβρανών να είναι περισσότερο τοξικό. Παρά τις παραπάνω επισημάνσεις, ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν έχει αποδειχθεί η άμεση βλαπτική δράση του O_2^- στις μεμβράνες⁶.

B. Αντίδραση Fenton

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η καταλάση έχει την ικανότητα να δρα προστατευτικά σε περιπτώσεις αυξημένων ROS. Για την εξήγηση των παραπάνω παρατηρήσεων προτάθηκε κατ' αρχάς μια αντίδραση, η οποία είχε μελετηθεί προηγουμένως από τους Haber και Weiss το 1932 (αντίδραση 1).

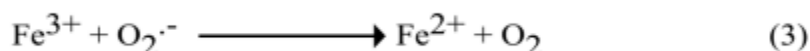


Το H_2O_2 μπορεί να δημιουργηθεί από το O_2^- είτε απευθείας είτε μέσω της δράσης των ενζύμων της οικογένειας SOD, όπως θα δούμε παρακάτω. Η αντίδραση 1 θα δικαιολογούσε τις καταστρεπτικές επιπτώσεις στα κύτταρα, λόγω της δημιουργίας των εξαιρετικά δραστικών ριζών του υδροξυλίου. Αργότερα όμως πιο προσεκτικές μελέτες έδειξαν ότι η ταχύτητα αυτής της αντίδρασης είναι πρακτικά ίση με μηδέν

και ότι οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου ήταν δυνατόν να σχηματιστούν μόνο με την παρουσία ιόντων μετάλλων, κυρίως σιδήρου (αντίδραση Fenton)



Το O_2^- σ' αυτήν την περίπτωση θα μπορούσε να προκαλεί την αναγωγή των ανιόντων του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) σε δισθενή (Fe^{2+}) (αντίδραση 3), ούτως ώστε αυτά να συνεχίσουν να δρουν καταλυτικά.



Το άθροισμα των αντιδράσεων 2 και 3 μπορεί να θεωρηθεί ως μια μεταλλοκαταλυόμενη αντίδραση Haber-Weiss. Στην πραγματικότητα, όμως, η αναγωγή του σιδήρου στα κύτταρα γίνεται από τις άφθονες αναγωγικές ενώσεις που υπάρχουν σ' αυτά και, κατά συνέπεια, η συνεισφορά των ανιόντων του σουπεροξειδίου θεωρείται αμελητέα. Άλλα μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο χαλκός και το νικέλιο, έχουν επίσης την ικανότητα να καταλύουν αντιδράσεις τύπου Fenton και να διευκολύνουν τη δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών. Σε αντίθεση, ωστόσο, με τα ιόντα σιδήρου, η ποσότητά τους στα κύτταρα είναι μηδαμινή και, επιπλέον, υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί δέσμευσής που δεν επιτρέπουν την ύπαρξή τους σε ελεύθερη μορφή κάτω από φυσιολογικές συνθήκες⁶.

Γ. Οξειδωτικό Στρες και Βλαστοκύτταρα

ROS στον Μεταβολισμό των Βλαστοκυττάρων

Ο κυτταρικός μεταβολισμός είναι το άθροισμα των καταβολικών και αναβολικών διεργασιών που συνεπάγονται τη χημική μετατροπή των υποστρωμάτων του άνθρακα για την παραγωγή ενέργειας υπό μορφή ATP και τη μείωση συν-παραγόντων (καταβολική) ή για την παραγωγή μακρομοριακών προδρόμων με τη μορφή νουκλεοτιδίων, λιπιδίων και αμινοξέων (αναβολικά). Η ισορροπία των καταβολικών και αναβολικών διεργασιών μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με την κυτταρική διεργασία που εκτελείται. Οι διεργασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός απαιτούν κυρίως αναβολικές διεργασίες για την παραγωγή δομικών στοιχείων του DNA, των πρωτεϊνών και των μεμβράνων⁷.

Η διαχείριση των μεταβολικών οδών των βλαστοκυττάρων είτε με γενετικές προσεγγίσεις είτε με φάρμακα μπορεί να επηρεάσει άμεσα το αν τα βλαστοκύτταρα παραμένουν σε κατάσταση G0, αυτοανανεώνονται ή διαφοροποιούνται.

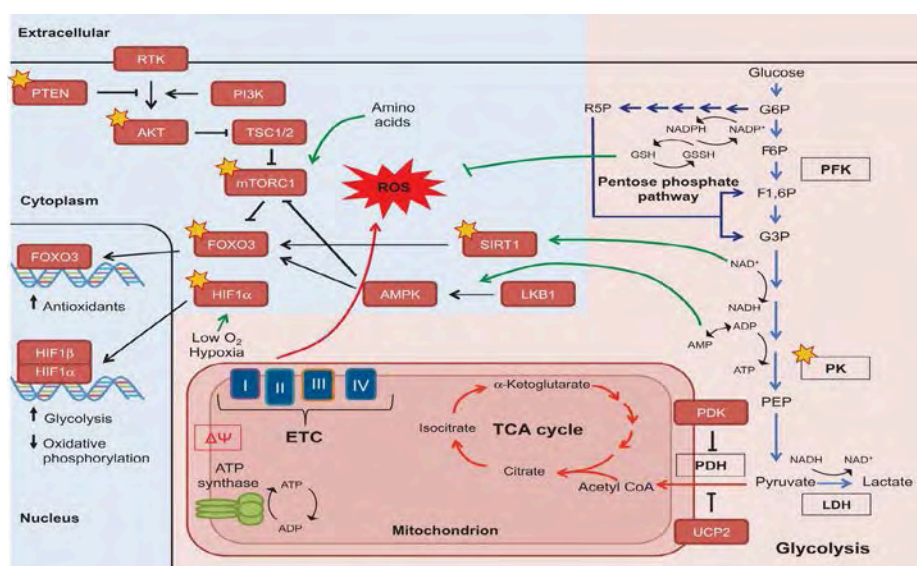
Ένας από τους κυριότερους τρόπους με τους οποίους ο μεταβολισμός μπορεί να επηρεάσει τις οδούς σηματοδότησης είναι μέσω διαφοροποιήσεων των επιπέδων ROS. Με τη σειρά τους, τα ROS μπορούν να αντιδράσουν απ'ευθείας με διάφορες πρωτεΐνες, όπως κινάσες, φωσφατάσες ή παράγοντες μεταγραφής, και να μεταβάλλουν τις διαδικασίες που ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση, quiescence ή διαφοροποίηση⁷. Επιπλέον, τα ROS μπορούν να τροποποιήσουν άμεσα τα μεταβολικά ένζυμα ή πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μονοπάτια ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών για να κατευθύνουν τη μεταβολική ροή. Σε αυτά τα πλαίσια, τα ROS μπορούν να θεωρηθούν ως σηματοδοτικά μόρια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ του μεταβολισμού και των αποφάσεων για τη μοίρα των βλαστικών κυττάρων (Εικόνα 5). Είναι σημαντικό, ωστόσο να αναφέρουμε, ότι ο μεταβολισμός μπορεί να επηρεάσει τη μοίρα των κυττάρων μέσω πολλαπλών μηχανισμών ανεξάρτητων από ROS ή μέσω μηχανισμών όπου η επίδραση του ROS στον μεταβολισμό είναι λιγότερο προφανής. Τέτοιοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν μεταβολές στο επιγενετικό προφίλ, καθώς και οι λειτουργίες των «μεταβολικών ενζύμων» πέρα από το ρόλο τους στην κατάλυση αντιδράσεων. Ωστόσο, σε σύγκριση με τις επιδράσεις του ROS, αυτές οι άλλες μέθοδοι διασταύρωσης μεταξύ μεταβολισμού και μοίρας κυττάρων δεν έχουν χαρακτηριστεί τόσο καλά στα βλαστοκύτταρα⁷.

Εμβρυϊκά Βλαστοκύτταρα και ROS

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESC), όπως αναφέραμε παραπάνω, προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα βλαστοκύστης και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και στα τρία βλαστικά στρώματα του εμβρύου υπό καθορισμένες *in vitro* συνθήκες⁷. Αυξημένα επίπεδα ROS *in vitro* προκαλούν μόνο προσωρινή διακοπή κυτταρικού κύκλου G2 / M σε ESCs, υποδηλώνοντας ότι τα ESCs είναι εξαιρετικά ανθεκτικά σε οξειδωτικό στρες⁷. Ωστόσο, όπως και στα διαφοροποιημένα κύτταρα, η συνεχής έκθεση σε ROS προκαλεί απόπτωση των ESCs. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι τα ESC καλλιεργημένα κάτω από φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου διατηρούν την γονιδιωματική τους ακεραιότητα και την ικανότητα διαφοροποίησης και ανανέωσης (stemness), ενώ αν εκτεθούν παρατεταμένα σε υποξικό περιβάλλον οδηγούνται σε αυξημένα επίπεδα ROS και σε απόπτωση^{8,7}.

Ως γνωστόν τα ESC αυτοανανεώνονται ταχέως εξαιτίας μιας συντομευμένης φάσης του κυτταρικού κύκλου, G1. Η διαδικασία αυτή βασίζεται κυρίως στη

γλυκόλυση και την οδό φωσφορικής πεντόζης, με σκόπιμη καταστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης⁷.



Εικόνα 5: Μεταβολική διασταύρωση μεταξύ βασικών οδών σηματοδότησης στα βλαστοκύτταρα μέσω του ROS και άλλων μεταβολικών συν-παραγόντων⁷

Η γλυκόλυση επιτρέπει την ταχεία παραγωγή ATP, ενώ η οδός φωσφορικής πεντόζης παράγει τα πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων. Τόσο το ATP όσο και τα νουκλεοτίδια απαιτούνται για τον ταχύ πολλαπλασιασμό του DNA και του αναδιπλασιασμού των ESC^{7,8}. Η γλυκολυτική απαίτηση έγινε εμφανής μετά από μελέτες που σύγκριναν πολλαπλές μεταβολικές παραμέτρους, οι οποίες αποκάλυψαν την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού, αποδέσμευση ηλεκτρονίων της αλυσίδας μεταφορών ροής από την παραγωγή ATP σε ESC, καθώς και μια ανώριμη μιτοχονδριακή μορφολογία. Επιπλέον, η αναγκαστική ενεργοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης οδηγεί σε απώλεια μερικών ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων και αυξημένη διαφοροποίηση ή απόπτωσή τους.⁷ Αντιστρόφως, η ενίσχυση της γλυκόλυσης μέσω της μεσολαβούμενης από υποξία ενεργοποίησης του HIF και η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης βελτίωσαν τον πολλαπλασιασμό και τη διατήρηση των ESC, ενώ καταστέλλουν τη διαφοροποίηση⁷. Και τα δύο αποτελέσματα οδηγούν σε ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων ROS και διατήρηση του stemness των βλαστοκυττάρων.

Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν την ιδέα ότι η μοίρα βλαστοκυττάρων μπορεί να τροποποιηθεί άμεσα από το μεταβολισμό μέσω των ROS. Υποστηρίζουν επίσης την

ιδέα ότι η ανάγκη των ESCs, για γλυκόλυση ικανοποιεί τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις των κυττάρων υψηλού πολλαπλασιασμού.⁸

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης αυξάνει την παραγωγή αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων μέσω σταθεροποίησης HIF με τη μεσολάβηση της ROS, ενός μηχανισμού που ενδέχεται να εμπλέκεται στη λευχαιμία σε παιδιά που εκτίθενται γενικά σε υψηλή γλυκόζη.^{7,8}

ROS ως μεσολαβητής επαναπρογραμματισμού των βλάστοκυττάρων

Μία από τις βασικές λειτουργίες των βλαστοκυττάρων είναι η δημιουργία υγιών διαφοροποιημένων κυττάρων για την αποκατάσταση των ιστών και οργάνων που έχουν υποστεί βλάβη ή φθορά. Δεδομένου ότι τα ROS μπορούν να επηρεάσουν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών διεργασιών και ότι οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες όσον αφορά για το ποια είδη ROS εμπλέκονται σε οποιοδήποτε δεδομένο φυσιολογικό περιβάλλον, αποτελεί μια τεράστια πρόκληση η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ο μεταβολισμός των ROS μπορεί να επηρεάσει την μοίρα των βλαστοκυττάρων. Η μελέτη του μεταβολισμού και των μεσολαβητικών μηχανισμών των ROS που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μοίρας των βλαστοκυττάρων οδήγησε σε βελτιωμένα πρωτόκολλα διαφοροποίησης και επαναπρογραμματισμού τους.

Επιπλέον είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο βαθμός ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μεταβολισμού σχετίζεται με τον προσδιορισμό της μοίρας των ESC ποντικού.⁷

Σε αντίθεση με τη διαφοροποίηση, η πολυπλοκότητα που προκαλείται σε ένα βλαστοκύτταρο όταν επαναπρογραμματίζεται για να επανέλθει ξανά σε πολυδύναμο κύτταρο, μετατρέπεται στο λεγόμενο Επαγόμενο Πολυδύναμο Βλαστοκύτταρο (iPSC). Η παραγωγή των iPSC από διαφοροποιημένα κύτταρα έχει επίσης ωφεληθεί από την προσεκτική ρύθμιση των επιπέδων ROS και της μεταβολικής ροής.

Η μεταβολική μετάπτωση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση έχει δείχθει ότι προηγείται, της ενεργοποίησης άλλων βασικών βημάτων κατά τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού. Σύμφωνα με αυτό, ο βασικός παράγοντας επαναπρογραμματισμού, OCT4, στοχεύει μεταγραφικά σε πολλαπλά μεταβολικά γονίδια.

Έχει δείχθει ότι οι νέες μέθοδοι που οδηγούν στην iPSC, διαμορφώνουν επί της ουσίας τη μετάβαση σε αερόβια γλυκόλυση. Αν και δεν έχει αξιολογηθεί η ακριβής επίδραση των ROS στις οδούς σηματοδότησης κατά τη διαδικασία

επαναπρογραμματισμού, τα επίπεδα των ROS φαίνεται να αυξάνονται κατά τον επαναπρογραμματισμό και υπάρχει περίπτωση να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, τα οποία μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με την προσθήκη NAC.^{7,8}

Η αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού και μόνιμη συντήρηση των iPSCs, μπορεί επίσης, να βελτιωθεί υπό παρουσία χαμηλών συνθηκών O₂. Με βάση το γεγονός ότι η μιτοχονδριακή κατανάλωση O₂, καταστέλλεται κάτω από την υποξία, οδηγώντας σε μειωμένα επίπεδα ROS, και ότι στα iPSCs, πολλές οδούς καθαρισμού ROS ενισχύονται, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS μπορεί να επιφέρουν αρνητικά αποτελέσματα στον επαναπρογραμματισμό των βλαστοκυττάρων.⁸

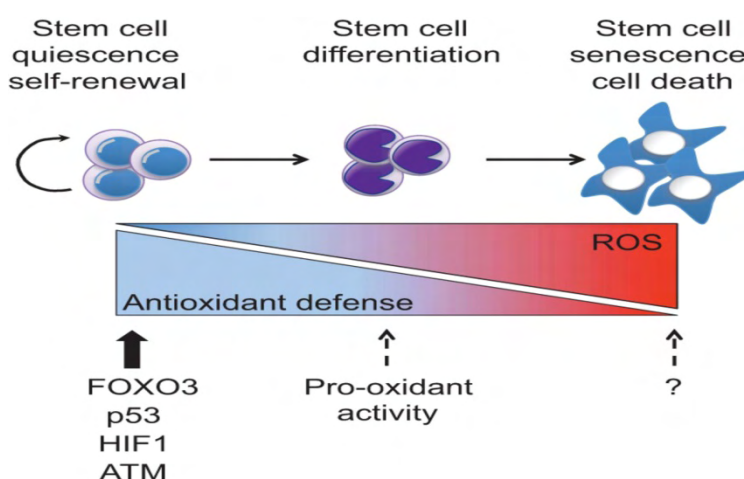
Υπό το πρίσμα αυτών των ευρημάτων θα είναι επίσης ενδιαφέρον να εκτιμηθούν οι δράσεις των παραγόντων FOXO, οι οποίες είναι ουσιώδεις για τη διατήρηση του stemness στα ESC, έχουν εμπλακεί στον επαναπρογραμματισμό των iPSCs και είναι κρίσιμες για τη ρύθμιση του ROS και του κυτταρικού μεταβολισμού.⁷

Δυναμικότητα του ROS στην ομοιόσταση των βλαστοκυττάρων

Στη *Drosophila*, τα Πολυδύναμα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, είναι παρόμοια με τα μυελογενή προγονικά κύτταρα των θηλαστικών και παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ROS που μειώνονται κατά τη διαφοροποίηση. Αλλαγές στα επίπεδα των ROS έχειδειχθεί ότι κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων της *Drosophila*, υποστηρίζοντας το ρόλο της ROS σηματοδότησης για τη ρύθμιση της μοίρας των αιμοποιητικών κυττάρων.⁷

Η αύξηση των ROS συνδέεται με τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων του αίματος των θηλαστικών και με την αυξημένη παραγωγή των θυγατρικών τους κυττάρων.⁸

Σε αντίθεση με τα μυελογενή προγονικά κύτταρα, τα HSCs που βρίσκονται μέσα στα διαμερίσματα του μυελού των οστών έχουνδειχθεί ότι έχουν χαμηλά επίπεδα ROS.



Εικόνα 6: Επιδράσεις ROS στα βλαστοκύτταρα

Πράγματι, η μείωση της δραστηριότητας των βλαστοκυττάρων του αίματος συμβαίνει σε περιοχές του μυελού των οστών που έχουν αυξημένα επίπεδα ROS. Αυτό έχει ως συνέπεια την γενετική αλλαγή των μεταγραφικών παραγόντων Foxo1 / 3/4 σε μεταλλαγμένους παράγοντες, όπου αυτό φέρνει το αποτέλεσμα της μετάλλαξης της κίνησης που είναι υπεύθυνη για το σύνδρομο της Αταξίας Τελαγγειεκτασίας (ATM).⁷

Οι βλάβες στη δραστηριότητα λόγω της Foxo^{-/-} ή της Foxo3^{-/-} στα HSC, αναφέρεται ότι οφείλονται σε αυξημένα επίπεδα ROS που προέκυψαν από τη μειωμένη έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης της καταλάσης και της δισμουτάσης 2 του υπεροξειδίου (SOD2). Ωστόσο, η πηγή των αυξημένων επιπέδων ROS στα μεταλλαγμένα HSCs του συνδρόμου ATM παραμένει ασαφής.⁸

Παρ' όλα αυτά, σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με την μετάλλαξη που αναφέραμε παραπάνω δεν παρουσίασαν κάποια ελαττωματικά στοιχεία στα βλαστοκύτταρα του αίματος τους, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει κάποια δυνητική λειτουργία μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων του συστήματος των ROS. Η ελαττωματική αυτή κατάσταση των HSCs στο ATM^{-/-} αποδίδεται στην ενεργοποίηση του p16.

Αντίθετα, τα ελαττωματικά HSCs του μεταλλαγμένου Foxo3 είναι πολύ πιθανό να επιφέρουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του p53, γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ή την ενεργοποίηση του p38-MAPK. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η ενεργοποίηση του p38-MAPK λόγω αυξημένων επιπέδων των ROS, έχει θετικά αποτελέσματα στο stemness των HSCs. Η ενζυμική αυτή ενεργότητα και έκφραση της ATM ρυθμίζονται από το FOXO3, αλλά ο βαθμός στον οποίο η ATM μπορεί να συνεισφέρει στον φαινότυπο των μεταλλαγμένων HSCs από την Foxo3 είναι ακόμα άγνωστος.⁷

Θα ήταν αξιοσημείωτο να αναφέρουμε επιπλέον ότι η οξειδοαναγωγική ισορροπία και ο μεταγραφικός έλεγχος των μεταβολικών γονιδίων, εμπλέκονται και στη διατήρηση των νευρικών βλαστοκυττάρων (NSCs). Παρόλα αυτά, τα υψηλά επίπεδα του πολλαπλασιασμού των NSCs απαιτούν υψηλό ROS για να διατηρήσουν τις ιδιότητες αυτοανανέωσης και νευρογένεσης τους.

Τα ROS που παράγονται από τις οξειδάσες NADPH είναι επίσης σημαντικά για την αυτοανανέωση των σπερματογλοιακών βλαστοκυττάρων (SSC). Εντούτοις, τα αυξημένα ROS σε MSCs μειώνουν το δυναμικό τους για μεταμόσχευση και προκαλούν απόπτωση μετά τη μεταμόσχευση.⁸

3. Γήρανση

A. Γήρανση και Βλαστοκύτταρα

Η γήρανση μπορεί να οριστεί ως μια σύνθετη, χρονικά εξαρτώμενη διαδικασία που επηρεάζει πολλαπλούς ιστούς και όργανα που οδηγούνται σε προοδευτική μείωση της φυσιολογικής ακεραιότητάς τους και στον εκφυλισμό της λειτουργίας των ιστών, των οργάνων και κατ'επέκταση των οργανισμών.⁹

Οι ηλικιωμένοι ιστοί παρουσιάζουν συνεχή μείωση της ομοιόστασης τους και των αναγεννητικών τους ικανοτήτων, κάτι που θεωρείται να είναι το αποτέλεσμα των εκφυλιστικών αλλαγών που γίνονται στα βλαστοκύτταρα των ιστών. Θα ήταν θετικό να αναφέρουμε πως η κατανόηση των μοριακών οδών που εμπλέκονται σε αυτή την ηλικιο-εξαρτώμενη υποβάθμιση της λειτουργίας των βλαστοκυττάρων, θα είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη νέων θεραπειών για ασθένειες της γήρανσης που στοχεύουν σε συγκεκριμένες αιτίες της λειτουργικής παρακμής που σχετίζεται με την ηλικία.¹⁰

Η αποσαφήνιση των χαρακτηριστικών της γήρανσης έγινε από τον Lopez-Otin και τους συνεργάτες του, όπου ταυτοποίησαν την εξασθένιση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών και την μείωση της λειτουργικότητας των βλαστοκυττάρων, ως μείζονες διαδικασίες που σχετίζονται με τη μείωση της αναγεννητικής ικανότητας που συνδέεται με τη συσσώρευση βλαβών που σχετίζονται με την ηλικία. Συγκεκριμένα, η απώλεια της πρωτεόστασης θεωρήθηκε το πρωταρχικό αίτιο για την κατάσταση αυτή, ενώ η μείωση του αριθμού και την λειτουργικότητας των βλαστοκυττάρων ήταν ένα ενσωματωτικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης του οργανισμού.¹¹

Η πρωτεόσταση είναι απαραίτητη για τις περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κατάλυση των μεταβολικών αντιδράσεων και η ανοσολογική αντίδραση. Οι βλάβες στις πρωτεΐνες μπορούν να οδηγήσουν σε τοξικά συσσωματώματα ανεπιθύμητων πρωτεϊνών που έχουν ως αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε πως η αυτοφαγία είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη καταβολική διαδικασία και πλήρως απαραίτητη για τον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών καθώς και μια κρίσιμη διαδικασία για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά και σε συνθήκες στρες. Η ενεργοποίησή της πρωτεόστασης προάγει την κυτταρική επιβίωση διατηρώντας επαρκείς τις μεταβολικές λειτουργίες, τα βιοενεργειακά επίπεδα και τις ομάδες των

αμινοξέων, έτσι η μη επαρκή ενεργοποίησή της έχει ως αποτέλεσμα την γήρανση των κυττάρων.¹¹

Τα χαρακτηριστικά και οι συνέπειες της γήρανσης στα βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα που έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα είναι αυτά που προέρχονται από το αιμοποιητικό σύστημα. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs) βρίσκονται στον μυελό των οστών στα ενήλικα θηλαστικά και είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του αίματος. Τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους, η αναλογία διαφοροποιημένων κυττάρων του αίματος που προέρχεται από μερικούς μόνο κλώνους HSC αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι ο αριθμός των ενεργών και λειτουργικών HSC μειώνεται με την ηλικία¹².

Ένα άλλο καθοριστικό χαρακτηριστικό της γήρανσης του HSC σχετίζεται με την ικανότητα διαφοροποίησης τους. Τα γηρασμένα HSCs είναι πιο πιθανό να διαφοροποιηθούν προς τη μυελοειδή σειρά, σε βάρος λεμφοειδούς γραμμής. Αυτή η ανακάλυψη συμβαδίζει πλήρως με την παρατήρηση ότι το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα (διαμεσολαβούμενο σε μεγάλο βαθμό από το λεμφοειδές σύστημα) μειώνεται με την ηλικία και με το γεγονός ότι η συχνότητα Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (ΟΛΛ), αυξάνεται με την ηλικία. Η γήρανση των HSC μπορεί επίσης να συμβάλει στη μέτρια αναιμία που παρατηρείται στους ηλικιωμένους. Σε πειράματα κυτταρικής μεταμόσχευσης, τα γηρασμένα HSCs που μεταφέρονται σε νέους ξενιστές διατηρούν τον ηλικιωμένο φαινότυπο τους υποστηρίζοντας την ιδέα ότι η γήρανση του HSC καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από ενδογενείς μηχανισμούς των κυττάρων¹²

Βράχυνση Τελομερών

Η μείωση του μήκους των τελομερών αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης, στην οποία ακόμη και τα βλαστοκύτταρα δεν είναι άνοσα. Αν και τα βλαστικά κύτταρα εκφράζουν την τελομεράση, τα τελομερή των HSCs, NSCs, HFSCs και GSCs μειώνονται με την ηλικία. Η υπερέκφραση της Ανάστροφης της Τρανσκριπτάσης Τελομεράση (TERT), σε ένα υπόβαθρο ανθεκτικό στον καρκίνο, αυξάνει τη μέση διάρκεια ζωής, υποδηλώνοντας ότι το μήκος των τελομερών συμβάλλει στην επιμήκυνση της ζωής. Δεν είναι σαφές εάν αυτή η αύξηση της

διάμεσης διάρκειας ζωής εξαρτάται από τη δραστηριότητα των βλαστικών κυττάρων. Στους ανθρώπους, μελέτες υποστηρίζουν παρόμοια συμπεράσματα. Για παράδειγμα, ενώ το μήκος των τελομερών συσχετίζεται αρνητικά με την ηλικία στους ανθρώπους έως και 75 ετών, συσχετίζεται θετικά με την ηλικία στους ηλικιωμένους, υποδηλώνοντας ότι τα μακρά τελομερή συμβάλλουν στην επιβίωση. Επιπλέον, το μήκος των τελομερών προέβλεψε την επιβίωση σε ηλικιωμένα δίδυμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα τελομερή συμβάλλουν στη μακροζωία στους ανθρώπους.¹²

Παρά τις τεράστιες ενδείξεις ότι τα τελομερή παίζουν ρόλο στη γήρανση, δεν είναι σαφές πόσο επιδραστική μπορεί να είναι η μείωση τους για είδη που ξεκινούν τη ζωή με μακρά τελομερή και έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής, όπως τα ποντίκια.¹²

Βλάβες και Μεταλλάξεις στο DNA

Μια συσσώρευση σε βλάβες και μεταλλάξεις στο DNA έχει επίσης συμβάλει στη γήρανση των βλαστικών κυττάρων, γνωστή ως «θεωρία συσσώρευσης βλαβών» που είναι στην πραγματικότητα μία από τις πρώτες θεωρίες της γήρανσης.¹⁰

Στα HSCs, η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX η οποία είναι παράγοντας μέτρησης της βλάβης του DNA, αυξάνεται με την ηλικία. Επιπλέον, τα γηρασμένα HSCs εμφανίζουν στρες αναδιπλασιασμού και μειωμένη έκφραση DNA-ελικάσης, ευαισθητοποιώντας τα σε μελλοντικές προκλήσεις.^{10,12}

Κάθε φορά που ένα βλαστοκύτταρο αναδιπλασιάζει το DNA του και διαιρείται, αυξάνεται η πιθανότητα ενός ογκογονικού μετασχηματισμού. Στην πραγματικότητα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου σε έναν ιστό συσχετίζεται με τον αριθμό των διαιρέσεων που έχουν κάνει τα βλαστοκύτταρα. Πολλά βλαστοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των HSC, έχουν ως μηχανισμό για να προστατευθούν από τις βλάβες στο DNA, την παραμονή τους για μεγάλες χρονικές περιόδους σε κατάσταση ηρεμίας (quiescence). Τα Quiescent κύτταρα προστατεύονται από τις καταστροφικές βλάβες αλλά είναι πιο επιρρεπή στην απόκτηση μεταλλάξεων όταν συμβούν βλάβες του DNA, κυρίως επειδή οι θραύσεις διπλής έλικας (double strand breaks - DSB) είναι πιο πιθανό να επιδιορθωθούν από το μηχανισμό Σύνδεσης Μη Ομόλογων Άκρων (NHEJ) που είναι επιρρεπή σε σφάλματα και όχι από τον ομόλογο

ανασυνδυασμό (HR), ο οποίος παρέχει ακριβέστερη αποκατάσταση των βλαβών, κατά τη διάρκεια της φάσης G0-G1 του κυτταρικού κύκλου.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η βλάβη του DNA μπορεί επίσης να μειώσει τον αριθμό των βλαστικών κυττάρων οδηγώντας τα σε απόπτωση, γήρανση ή διαφοροποίηση. Η πεποίθηση ότι οι βλάβες του DNA συμβάλουν στη γήρανση προκύπτει και από την παρατήρηση, ότι ποντίκια με μεταλλάξεις στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA εμφανίζουν πρόωρη γήρανση αλλά και ότι η ενίσχυση της επιδιόρθωσης του DNA μέσω της αυξημένης έκφρασης του SIRT6 αυξάνει τη διάρκεια ζωής. Οι διαδικασίες αυτές δεν είναι ακόμη γνωστό αν οφείλονται ή σχετίζονται με την αύξηση της μακροβιότητας των βλαστικών κυττάρων.¹²

Επιγενετικές Αλλοιώσεις¹²

Η ρύθμιση της κατάστασης της χρωματίνης είναι σημαντική για τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Οι τόποι που ρυθμίζουν τις αντιδράσεις για την τύχη των κυττάρων είναι δισθενείς, δηλαδή ταυτόχρονα ενεργές και κατασταλτικές τροποποιήσεις της χρωματίνης. Πολλές αλλαγές στην χρωματίνη και γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια της γήρανσης έχουν πλέον καταγραφεί.¹²

Στα HSC, η μεθυλίωση του DNA, μειώνεται με την ηλικία, παρόλο που σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους ποικίλει. Αυτή η υπομεθυλίωση συνδέεται στενά με τον πολλαπλασιασμό των HSCs, αποδεικνύοντας πως μπορεί να παραμείνει αδρανής. Θα ήταν αξιοσημείωτο να αναφέρουμε ότι περιοχές του γονιδιώματος που έχουν ανοικτή χρωματίνη σε λεμφοειδή κύτταρα, παρουσιάζουν αυξημένη μεθυλίωση DNA σε γηρασμένα HSCs, ενώ περιοχές του γονιδιώματος που έχουν ανοικτή χρωματίνη σε μυελοειδή κύτταρα δείχνουν να έχουν μειωμένη μεθυλίωση του DNA στα γηρασμένα HSCs.

Τα επίπεδα έκφρασης των τροποποιητών της χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών των συμπλεγμάτων SWI-SNF και PRC, των HDAC και των sirtuins και των μεθυλοτρανσφερασών του DNA, επίσης αλλάζουν με την ηλικία στα βλαστοκύτταρα. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να στηρίζουν τη μείωση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων. Πράγματι, η υπερέκφραση του EZH2, ενός συστατικού του PRC2, βελτιώνει το μακροπρόθεσμο δυναμικό πολλαπλασιασμού στα HSCs.

Επιπρόσθετα, σε ηλικιωμένα HSCs, συστάδες γονιδίων αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης με βάση την χρωμοσωμική θέση, υποδηλώνοντας ότι η επιγενετική δυσλειτουργία προκαλεί περιφερειακή απώλεια της μεταγραφικής σιγής. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές στις επιγενετικές τροποποιήσεις είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων που επηρεάζει τη λειτουργία τους¹².

Εκτιμάται ότι οι μόνιμες μεταβολές στη χρωματίνη εμφανίζονται σταδιακά καθώς οι οργανισμοί γερνούν ως απόκριση στο κυτταρικό στρες και κυρίως σε απόκριση σημάτων καταστροφής DNA.

Θα είναι ενδιαφέρον να προσδιοριστεί εάν τα μακρόβια ζώα και οι άνθρωποι είναι σχετικά ανθεκτικά στις επιγενετικές μεταβολές που προκαλούνται από την καταστροφή του DNA και τις προκύπτουσες αλλαγές που ακολουθούν.

B. Γήρανση και Οξειδωτικό Στρες

Η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στην αυτοανανέωση και τη διαφοροποίηση είναι εξαιρετικά σημαντική για την ομοιόσταση των βλαστικών κυττάρων, καθώς η υπερβολική αυτοανανέωση ευνοεί την καρκινογένεση, ενώ η υπερβολική διαφοροποίηση προκαλεί πρόωρο θάνατο¹³.

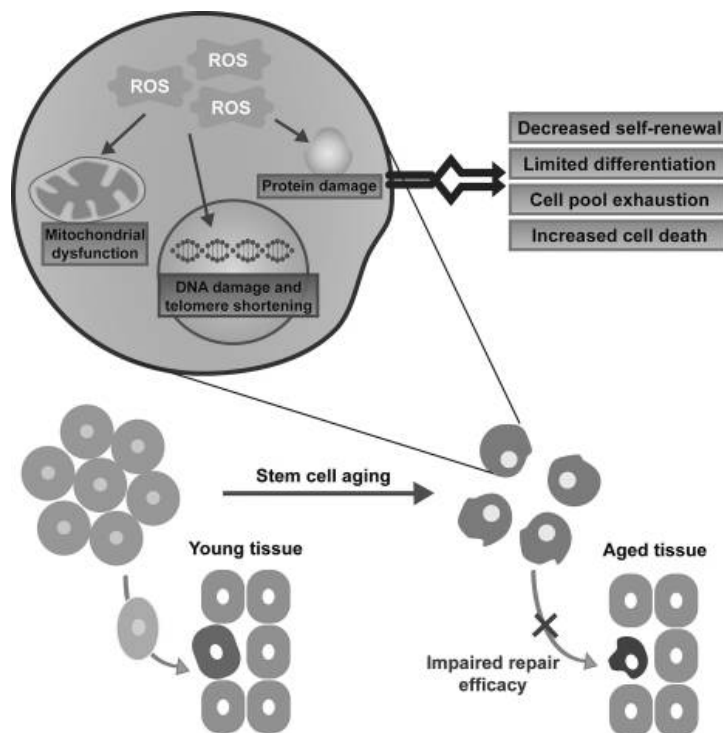
Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, διάφοροι τύποι στρες προωθούν τη γήρανση των βλαστοκυττάρων μέσω ποικίλων μονοπατιών σηματοδότησης, με αποτέλεσμα μια σειρά κυτταρικών μεταβολών, συμπεριλαμβανομένων των μορφολογικών αλλαγών, τη μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, μειωμένη γονιδιωματική σταθερότητα, τη βράχυνση των τελομερών, τις επιγενετικές μεταβολές, τη διαταραχή της δομής των πρωτεϊνών, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, τη απορυθμισμένη διακυτταρική επικοινωνία και την απώλεια πολυδυναμικότητας.

Οι προαγωγείς της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων περιλαμβάνουν τη συσσώρευση τοξινών που σχετίζονται με την ηλικία, τις βλάβες DNA, την οξείδωση πρωτεϊνών, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την εξάντληση βλαστικών κυττάρων σε ηλικιωμένους ιστούς¹³.

Πράγματι, τα δραστικές ρίζες του οξυγόνου (ROS) που παράγονται είτε κατά τον φυσιολογικό μεταβολισμό είτε από εξωγενής είναι μεταξύ των πιο σημαντικών τοξινών και ρυθμιστικών παράγοντων στα βλαστικά κύτταρα. Είναι επίσης οι άμεσοι επαγωγικοί παράγοντες βλάβων στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα μιτοχόνδια.

Παράλληλα με αυξημένη παραγωγή ROS, ένας αυξημένος αριθμός γηρασμένων βλαστοκυττάρων οδηγεί συνήθως σε εξάντληση τις λειτουργικές ομάδες των αρχέγονων κυττάρων στους ιστούς, μέσω ενός συνδυασμού αποσταθεροποιητικών γεγονότων συμπεριλαμβανομένης της διατάραξης του κυτταρικού κύκλου, της μείωσης της αυτοανανέωσης, της ακατάλληλης διαφοροποίησης και τον προκαλούμενο από το στρες κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 7)

Η ενίσχυση των μιτοχονδριακών λειτουργιών είναι μια λογική στρατηγική για την αποκατάσταση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων και της αναγέννησης των ιστών, καθώς τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια αποτελούν κύρια πηγή ROS, η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως επαγωγέας της απόπτωσης^{8,13}.



Εικόνα 7: Στελεχιαία κύτταρα χαρακτηρίζονται από απώλεια αναγεννητικής λειτουργίας, διαφοροποίηση, γήρανση, κυτταρικό θάνατο και εξάντληση των βλαστοκυττάρων, γεγονός που μειώνει σημαντικά την ικανότητά τους να αποκαθιστούν τους κατεστραμμένους ιστούς.

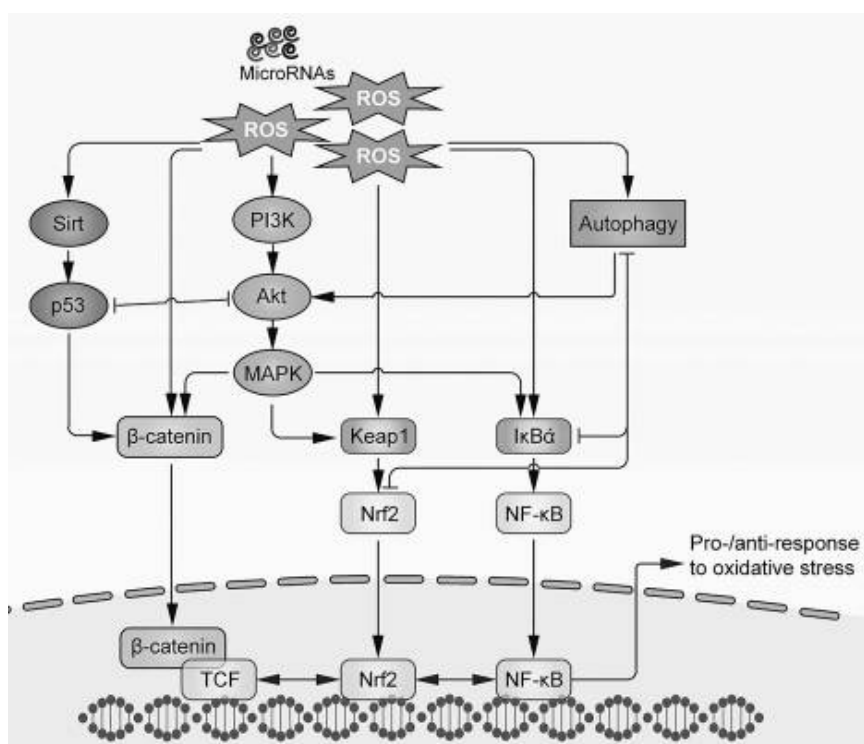
Με απλά λόγια, το οξειδωτικό στρες μπορεί να θεωρηθεί ως κατάσταση που προκύπτει από ελλείμματα στο αντιοξειδωτικό οπλοστάσιο του κυττάρου σε σχέση με την παραγωγή ROS.

Υψηλά επίπεδα ενδογενούς / εξωγενούς ενεργού οξυγόνου και υπερβολικά επίπεδα ROS είναι επιβλαβείς παράγοντες για την επαγωγή της γήρανσης των κυττάρων και μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Τα ROS, όπως αναφέρθηκε στις πρώτες παραγράφους της εργασίας, περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες, όπως υπεροξειδίου (O_2^-) και ρίζες υδροξυλίου (OH) και μη πολικά μόρια όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), τα οποία πιστεύεται ότι είναι μερικά από τα βασικά ROS που συμβάλλουν σε ένα περιβάλλον οξειδωτικού στρες.

Γενικά, υψηλά επίπεδα ROS προκαλούν οξείδωση βιολογικών μακρομορίων, λιπιδίων και πρωτεϊνών, τα οποία κατά συνέπεια προκαλούν κυτταρική βλάβη μέσω της αναστάτωσης της ενδοκυτταρικής ομοιοστασίας εξάντλησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης και επαγωγής κυτταρικού θανάτου μέσω εγγενούς και εξωγενούς αποπτωτικής σηματοδότησης. Αναδυόμενες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι το οξειδωτικό στρες παίζει βασικό ρόλο στην πρόκληση γήρανσης των βλαστικών κυττάρων και στην πρόοδο διαφόρων ασθενειών¹³.

Όπως αναφέρθηκε, η μεσολαβούμενη από ROS βλάβη σε βιολογικά μακρομόρια μπορεί να λάβει τη μορφή μετουσιωμένων πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων, τροποποιήσεις RNA και DNA και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, οι οποίες τελικά προάγουν την κυτταρική γήρανση.

Έτσι, η κατανόηση των πολύπλοκων δικτύων σηματοδότησης από το οξειδωτικό στρες, καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των οδών και των ασθενειών, είναι ύψιστης σημασίας και βοηθά στο να καθοριστεί η μοριακή βάση για τις ικανότητες των αρχέγονων κυττάρων (Εικόνα 8)¹³.



Εικόνα 8: Επεξήγηση οδών σηματοδότησης που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες σε ηλικιωμένα βλαστοκύτταρα.

4. Πρωτεΐνη GADD45A

A. Λειτουργίες Πρωτεΐνης

Τα γονίδια GADD45 είναι γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του DNA και επηρεάζονται από βλάβες που θα υποστούν σε αυτό. Στα γονίδια της GADD45 συμπεριλαμβάνονται η GADD45a (αρχικά ονομαζόμενη ως GADD45), GADD45B (αρχικά ονομαζόμενη ως MyD118), και GADD45G (αρχικά ονομαζόμενη ως CR6), εμπλέκονται ως αισθητήρες του στρες και ρυθμίζουν την απόκριση των κυττάρων στο γενοτοξικό και το φυσιολογικό στρες, καθώς είναι ικανά να βοηθούν στον σχηματισμό ενός όγκου. Οι πρωτεΐνες Gadd45 αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται και αυτές σε αποκρίσεις στο στρες. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι PCNA, p21, Cdc2 / CyclinB1, MEKK4 και της κινάσης p38.¹⁴

- Η GADD45A ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε στο εργαστήριο του Dr. Albert J. Fornace Jr. το 1988.
- Η GADD45B (MyD118) ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε στα εργαστήρια των Drs. Dan A. Liebermann και Barbara Hoffman το 1991.
- Η GADD45G (CR6) ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε στα εργαστήρια των Drs. Kenneth Smith, Dan A. Liebermann και Barbara Hoffman το 1993 και το 1999

Όσον αφορά την λειτουργία της GADD45A, εκτός του ότι είναι μέλος της ομάδας των γονιδίων GADD45, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου αυξάνονται μετά από καταστάσεις στρες που προκαλούν διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης και μετά από θεραπεία με παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA (μεταλλαξιόγόνες ουσίες). Η επαγόμενη από βλάβη μεταγραφή αυτού του γονιδίου προκαλείται τόσο από εξαρτώμενους όσο και από μη-εξαρτώμενους από το p53 μηχανισμούς. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο, ανταποκρίνεται στις στρεσογόνες πιέσεις μέσω της ενεργοποίησης της οδού του p38 / JNK μέσω MTK1 / MEKK4 κινάσης¹⁵.

Το γεγονός ότι η έκφραση αυτού του γονιδίου είναι ένας δείκτης ένδειξης της βλάβης του DNA έχει αξιοποιηθεί για να κατασκευαστεί ένα in vitro τεστ μεταλλαξιόγένεσης, γνωστή ως δοκιμασία GADD45a-GFP GreenScreen HC. Αυτή η δοκιμασία αποτελείται από μια κυτταρική σειρά η οποία έχει κατασκευαστεί έτσι ώστε η έκφραση της GADD45a να οδηγήσει στην έκφραση της πράσινης

φθορίζουσας πρωτεΐνης, η οποία μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί. Για να δοκιμαστεί μια ουσία για μεταλλαξιγένεση, εφαρμόζεται σε αυτά τα κύτταρα και έπειτα μετράται ο φθορισμός¹⁵.

Όσον αφορά την GADD45B (MyD118) τα επίπεδα μεταγραφής της αυξάνονται μετά από καταστάσεις αγχωτικής ανάπτυξης και θεραπείας με παράγοντες που καταστρέφουν το DNA¹⁶.

Τα γονίδια αυτής της ομάδας ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικές πιέσεις με τη μεσολάβηση ενεργοποίησης της οδού p38 / JNK. Αυτή η ενεργοποίηση διαμεσολαβείται μέσω της πρόσδεσης των πρωτεϊνών τους και της ενεργοποίησης της κινάσης MTK1 / MEKK4, η οποία είναι ένας θετικός ενεργοποιητής τόσο των p38 όσο και των JNK MAPKs. Η λειτουργία αυτών των γονιδίων ή των πρωτεϊνικών τους προϊόντων εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της απόπτωσης. Αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς, αλλά συχνά εκφράζονται συντονισμένα και μπορούν να λειτουργούν συνεργατικά για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης¹⁷.

Η GADD45B απαιτείται για την επαγόμενη δράση της απομεθυλίωσης των ειδικών προαγωγέων DNA και για την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων που είναι απαραίτητα για την νευρογένεση του ενήλικα, συμπεριλαμβανομένου του νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τον εγκέφαλο και του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών. Ως εκ τούτου, το GADD45B εμπλέκεται στην επίδραση της συναπτικής πλαστικότητας¹⁷.

Όσον αφορά τώρα την GADD45G είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο GADD45G στο χρωμόσωμα 9. Η GADD45G είναι επίσης γνωστή ως CR6, DDIT2, GRP17, OIG37 και GADD45gamma. Η GADD45G εμπλέκεται σε πολλές διαφορετικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της σεξουαλικής ανάπτυξης, της ανθρώπινης εξειδικευμένης ανάπτυξης του εγκεφάλου, της καταστολής του όγκου και της απόκρισης του κυτταρικού στρες. Η GADD45G αλληλεπιδρά με αρκετές άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και τη γήρανση. Η χαμηλή έκφραση του GADD45G έχει συσχετιστεί με πολλούς τύπους καρκίνου¹⁸.

Γνωστοποιώντας στην δομή και την λειτουργία της GADD45G, πρόκειται για ένα μέλος μιας ομάδας γονιδίων των οποίων τα επίπεδα μεταγραφής αυξάνονται μετά από συνθήκες αγχωτικής ανάπτυξης και θεραπείας με παράγοντες που καταστρέφουν το DNA. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανταποκρίνεται σε

περιβαλλοντικές καταπονήσεις με τη μεσολάβηση της ενεργοποίησης της οδού p38 / JNK μέσω MTK1 / MEKK4 κινάσης. Το GADD45G με τη σειρά του ρυθμίζεται θετικά από το NF-κΒ¹⁸.

Η κρυσταλλική δομή του GADD45G αποκαλύπτει ένα διμερές που αποτελείται από τέσσερις παράλληλες έλικες. Η κεντρική περιοχή περιέχει ένα πολύ όξινο έμπλαστρο όπου επιτρέπει την αλληλεπίδραση με cdc2, PCNA και p21. Η παράλληλη ισομορφία του GADD45G είναι η ενεργός μορφή¹⁹. Αυτό το γονίδιο παίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Το GADD45G παρεμποδίζει την ικανότητα κινάσης του συμπλόκου κυκλίνης b1 / Cdk1 με έναν τρόπο που δεν διασπά το σύμπλοκο. Παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση των σημείων S και G2 / M.

Στην οδό της ανδρικής σεξουαλικής ανάπτυξης, η GADD45G είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του SRY, οδηγώντας σε κατάλληλο σχηματισμό των γονάδων και προσδιορισμό του φύλου. Αυτό θα μπορούσε να συμβεί μέσω της αλληλεπίδρασης GADD45G με το μονοπάτι σηματοδότησης p38 MAPK²⁰.

Η διαγραφή ενός ενισχυτή κοντά στο γονίδιο GADD45G συσχετίζεται με τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των νευρωνικών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει μέρος της διαφοράς στην νευρική ανάπτυξη μεταξύ ανθρώπων και άλλων ειδών. Η διαγραφή του ενισχυτή μειώνει την έκφραση του γονιδίου στον πρόσθιο εγκέφαλο επιτρέποντας μεγαλύτερη ανάπτυξη του εγκεφάλου στους ανθρώπους²¹.

Θα ήταν αξιοσημείωτο να αναφέρουμε ότι η GADD45G εμπλέκεται και στον πολλαπλασιασμό των οδοντικών επιθηλιακών κυττάρων. Το GADD45G εκφράζεται σε κόμβους σμάλτου, όπου ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση και την κυτταρική ανάπτυξη. Το γονίδιο ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων με τη μεσολάβηση του p21 μέσω ενεργοποίησης της οδού p38 MAPK κατά την ανάπτυξη των δοντιών.

Οι GADD45G και GADD45A δρουν μειωμένα για να ελέγξουν την κυτταρική ανάπτυξη, επιτρέποντας στα κύτταρα να μετακινούνται από την πολυδύναμη λειτουργία βοηθώντας τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν²¹.

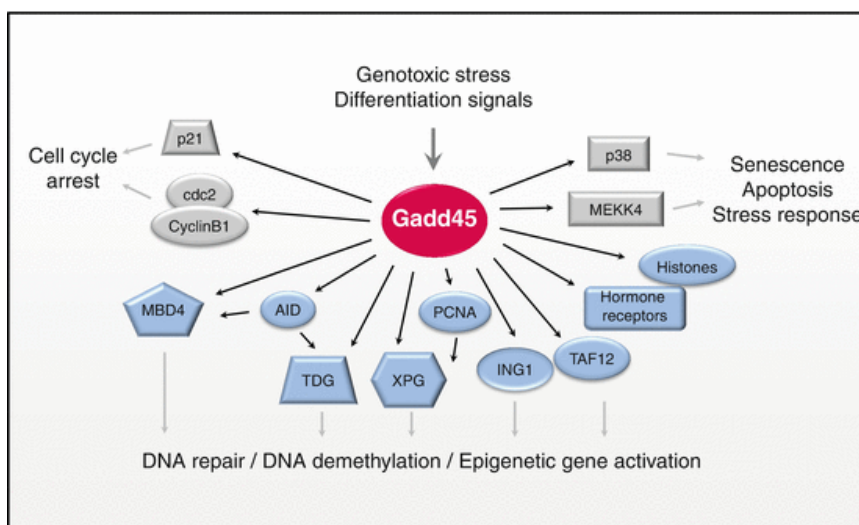
Η GADD45G εκτελεί τις λειτουργίες που έχουν αναφερθεί παραπάνω με πολλές διαφορετικές αλληλεπιδράσεις. Η GADD45G βρέθηκε να αναστέλλει τη δράση της Cdk1 κινάσης, η οποία θα προκαλούσε διαταραχή της κυτταρικής ανάπτυξης. Επίσης αλληλεπιδρά με το CRIF, το οποίο προκαλεί την αναστολή της Cdc2-κυκλίνης B1 και της Cdk-κυκλίνης E. Επίσης συνεργάζεται με τον εξαρτώμενο από κυκλίνη αναστολέα κινάσης p21, ο οποίος μπορεί επίσης να προκαλέσει διακοπή της

ανάπτυξης. Η GADD45G βρέθηκε να εμπλέκεται με την οδό p38 MAPK μέσω αλληλεπιδράσεων με το MAP3K4, η οποία μπορεί να είναι σημαντική στον προσδιορισμό του φύλου. Επιπρόσθετα, το GADD45G ρυθμίζει την αντιγραφή του DNA και την επιδιόρθωση μέσω των αλληλεπιδράσεών του με το PCNA.

Θα πρέπει να αναφέρουμε και την ιστική κατανομή της πρωτεΐνης τον άνθρωπο. Η GADD45G εκφράζεται περισσότερο στον σκελετικό μυ, στους νεφρούς και στο ήπαρ. Αυτό το γονίδιο έχει χαμηλή έκφραση στην καρδιά, τον εγκέφαλο, τον σπλήνα, τον πνεύμονα και τους όρχεις. Η GADD45G εκφράζεται και σε μεγάλο βαθμό στον πλακούντα²².

Κύτταρα νεφρικών εσωτερικών μυελικών (IM) θηλαστικών αντιμετωπίζουν συνήθως και αντιστέκονται στο υπερτονικό στρες. Ένα τέτοιο στρες προκαλεί βλάβη στο DNA στην οποία τα IM κύτταρα ανταποκρίνονται με διακοπή κυτταρικού κύκλου.

Και οι τρεις ισομορφές της GADD45, GADD45A, GADD45B και GADD45G, έχει αναφερθεί ότι επάγονται από οξεία υπερτονικότητα σε κύτταρα IM ποντικού. Η μέγιστη επαγωγή λαμβάνει χώρα 16-18 ώρες μετά την έναρξη της υπερτονίας. Το GADD45G επάγεται περισσότερο (7 φορές) από το GADD45B (3 φορές) και το GADD45A (2 φορές). Η υπερτονικότητα των διαφόρων μορφών (NaCl, KCl, σορβιτόλη ή μαννιτόλη) προκαλεί πάντοτε μεταγραφές στη GADD45, ενώ η μη υπερτονική υπεροσμωτικότητα (ουρία) δεν έχει καμία επίδραση. Η ακτινομυκίνη D δεν εμποδίζει την υπερτονική επαγωγή της GADD45, υποδεικνύοντας ότι η σταθεροποίηση του mRNA είναι ο μηχανισμός που μεσολαβεί στην επαγωγή αυτή²³.



Εικόνα 9: Αλληλεπιδράσεις GADD45

B. Οξειδωτικό Στρες και GADD45a

Τα μέλη της οικογένειας Gadd45 επάγονται ταχέως από παράγοντες γενοτοξικού στρες, καθώς και από τερματική διαφοροποίηση και αποπτωτικές κυτοκίνες.

Αναδύομενα στοιχεία δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια παίζουν κεντρικούς ρόλους ως αισθητήρες στρες που ρυθμίζουν την απόκριση των κυττάρων θηλαστικών σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών και ενδογενών στρεσογόνων παραγόντων, είτε εξαρτημένα είτε ανεξάρτητα της p53. Επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση του σχηματισμού όγκου σε απόκριση σε ογκογονικό στρες.

Οι πρωτεΐνες Gadd45 φαίνεται να εξυπηρετούν παρόμοιες, αλλά όχι πανομοιότυπες, λειτουργίες κατά μήκος διαφόρων οδών απόκρισης στο στρες. Για παράδειγμα, μόνο ο gadd45b επάγεται από τον TOP-β, ενώ μόνο ο Gadd45a είναι ένας στόχος του p53²⁴.

Είναι σημαντικό ότι τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας Gadd45 επάγονται από διαφορετικούς γενοτοξικούς παράγοντες. Σε ποιο βαθμό η λειτουργία καθεμιάς από τις πρωτεΐνες Gadd45 είναι μοναδική ή επικαλύπτεται με τις λειτουργίες των άλλων πρωτεϊνών, παραμένει να καθοριστεί.

Παρακάτω περιγράφεται λεπτομερώς πως τα γονίδια GADD45 και κυρίως το γονίδιο της GADD45a, έχουν ενοχοποιηθεί στον έλεγχο της ανακοπής του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA, η επιβίωση των κυττάρων, την απόπτωση, την γήρανση και την ευαισθησία των κυττάρων για μετασχηματισμό *in vitro* και για ανάπτυξη όγκου *in vivo*²⁴.

Διακοπή κυτταρικού κύκλου

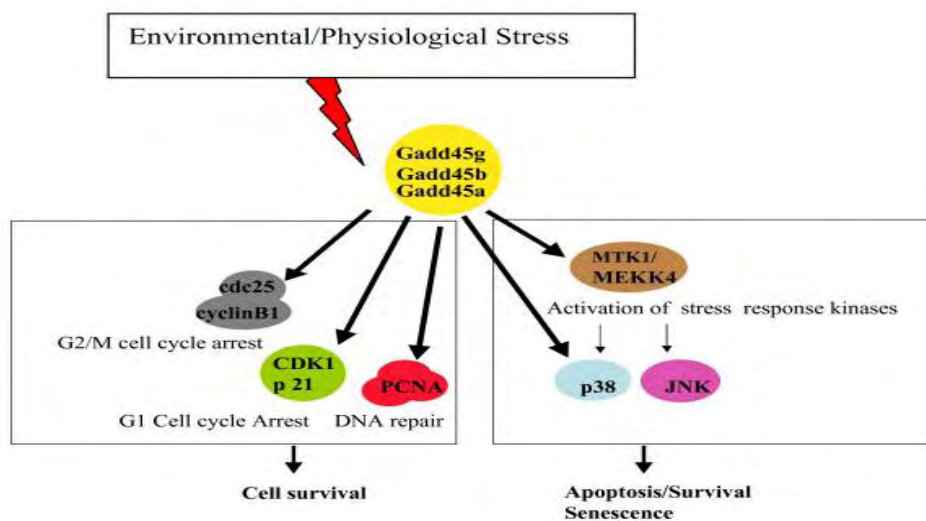
Αναστέλλοντας την ενδογενή έκφραση της GADD45a, σε ανθρώπινα κύτταρα με κατασκευάσματα αντινοσηματικής gadd45 βρέθηκε ότι βλάπτεται το σημείο ελέγχου G2 / M μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Υπερέκφραση της είχε ως αποτέλεσμα οι άνθρωποι ινοβλάστες να διακόπτουν τον κύκλο στο G2 / M. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 / M που διαμεσολαβείται από την GADD45a αποδείχθηκε ότι οφείλεται στην ικανότητά της να αλληλεπιδρά και να αναστέλλει τη δραστηριότητα της κινάσης της εξαρτώμενη από το σύμπλοκο cdc2 / cyclinB1. Η ικανότητά τους να διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο στη G1 είναι λιγότερο κατανοητή. Είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών Gadd45 με p21 παίζει ρόλο στη διακοπή κυτταρικού κύκλου G1. Ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί εάν αυτό συμβαίνει²⁵.

Επιδιόρθωση DNA

Έχει αποδειχθεί ότι η Gadd45a και η Gadd45b συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA μέσω της αλληλεπίδρασής τους με PCNA. Περαιτέρω αξιολόγηση του ρόλου που διαδραματίζει η Gadd45a στις οδούς επιδιόρθωσης του DNA έδειξε ότι λειτουργεί στη γενική γονιδιωματική αποκατάσταση (GGR), η οποία είναι μια δευτερεύουσα οδός επιδιόρθωσης μέσω αποκοπής νουκλεοτιδίων (NER). Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ένα ρόλο για την Gadd45a στην προαγωγή της επιγενετικής γονιδιακής ενεργοποίησης με απομεθυλίωση DNA με μεσολαβούμενη από επιδιόρθωση²⁶.

Απόπτωση

Υπάρχουν άφθονα στοιχεία ότι οι πρωτεΐνες Gadd45 έχουν προ-αποπτωτική λειτουργία. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι η δέσμευση του MyD118 (Gadd45b) με αντινοσηματική έκφραση σε κύτταρα μυελοβλαστικής λευχαιμίας M1 επηρέασε τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από TOP-β, εμπλέκοντας έτσι το Gadd45b ως θετικό διαμορφωτή της απόπτωσης που επάγεται από τον TGFβ. Σύμφωνα με αυτή την έννοια, η εκτοπική έκφραση Gadd45b που επάγεται με IPTG επιτάχυνε την απόπτωση που προκαλείται από TGFβ σε κύτταρα M1. Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η επαγόμενη από TOP-β απόπτωση, διαμεσολαβείται από Gadd45b μέσω ενεργοποίησης p38 σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα από ποντίκια wild-type και παρεμποδίστηκε σε ηπατοκύτταρα από Gadd45b - / - ποντικούς.



Εικόνα 10: Gadd45 σε στρες. Συντονισμός των αποκρίσεων του κυτταρικού στρες μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες εταίρους

Επιπλέον, έκτοπη έκφραση και των τριών πρωτεϊνών GADD45 δείχθηκε ότι επάγει απόπτωση σε κύτταρα HeLa. Επίσης, η ενεργοποίηση της gadd45a με τη μεσολάβηση του BRCA-1 έχει εμπλακεί στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού, ενώ η έκφραση του gadd45g έχει αποδειχθεί ότι έχει ρόλο στο θάνατο νευρωνικών κυττάρων. Επιπλέον, το gadd45a έχει επίσης εμπλακεί στην απόπτωση των κερατινοκυττάρων που ακτινοβολήθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία²⁷.

Επιβίωση

Εντυπωσιακά, σε προφανή αντίφαση με τον ρόλο που παίζουν οι πρωτεΐνες GADD45 στο κυτταρικό θάνατο, πολλές παρατηρήσεις ενισχύουν τον ρόλο τους στην επιβίωση των κυττάρων. Οι δοκιμασίες επιβίωσης σε GADD45a - / - MEFs ή σε κύτταρα που εκφράζουν το αντιπληροφοριακό GADD45a RNA έδειξαν ότι ανεπάρκεια στο GADD45a αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην υπεριώδη ακτινοβολία ή τη σισπλατίνη με συνέπεια τον θάνατό τους. Πρόσφατα τεκμηριώθηκε η έλλειψη της GADD45a και GADD45b σε ευαισθητοποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα που οδηγούνται σε απόπτωση μέσω γενοτοξικού στρες. Αποδείχθηκε ότι σε αιμοποιητικά κύτταρα εκτεθειμένα σε υπεριώδη ακτινοβολία, τα GADD45a και GADD45b συνεργάζονται για να προάγουν την κυτταρική επιβίωση με δύο διαφορετικές οδούς σηματοδότησης που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μιας νέας διαδρομής επιβίωσης με τη μεσολάβηση p38-NP-κB μεσολαβούμενης από GADD45a

και με τη μεσολάβηση GADD45b στο σηματοδοτικό μονοπάτι των MKK4 -JNK. Ο ρόλος που διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες GADD45 στην επιδιόρθωση του DNA και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου είναι συμβατή με τη λειτουργία επιβίωσης. Συνεπώς με την ιδέα αυτή, είναι η διαπίστωση ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών GADD45 PCNA μπορεί να προάγει κυτταρική επιβίωση μέσω της ενίσχυσης της επιδιόρθωσης του DNA, και η αλληλεπίδραση GADD45 / PCNA παρεμποδίζει την απόπτωση²⁸.

C. Γήρανση και GADD45a

Η μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης του στρες είναι ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της γήρανσης. Η αντοχή στο στρες είναι ένας από τους σημαντικούς καθοριστικούς παράγοντες της επιβίωσης και της μακροζωίας των οργανισμών. Πράγματι, σε μια ευρεία ποικιλία ειδών, άτομα ή στελέχη με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής επιδεικνύουν γενικά μεγαλύτερη αντοχή στο περιβαλλοντικό ή / και φυσιολογικό στρες²⁹.

Μεταξύ των γονιδίων που σχετίζονται με το στρες, τα μέλη της οικογένειας GADD45 παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση σε μια μεγάλη ποικιλία στρες όπως αναφέρθηκε. Σε βασικές συνθήκες, τα επίπεδα έκφρασης των μελών της οικογένειας GADD45 είναι σχετικά χαμηλά, αλλά είναι εξαιρετικά επαγώγιμα σε μια μεγάλη πληθώρα στρεσογόνων ερεθισμάτων, τόσο φυσιολογικών όσο και περιβαλλοντικών³⁰.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μέσος χρόνος ημιζωής του mRNA της GADD45 είναι ασυνήθιστα σύντομος (λιγότερο από 1 ώρα), υποδεικνύοντας μια ρυθμιστική και όχι μεταβολική λειτουργία για τις πρωτεΐνες της Gadd45.

Το γενοτοξικό και οξειδωτικό στρες μπορούν να προκαλέσουν την ταχεία μεταγραφή και να αυξήσουν τη σταθερότητα του mRNA της GADD45. Η έκφραση της GADD45a διεγείρεται από φυσικό στρες όπως η ακτινοβολία, οι ακτίνες X και γ, τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία χαμηλής, καθώς επίσης και από υποξία, καθώς επίσης και το ογκογονικό στρες και το χαμηλό pH. Διεγείρεται επιπλέον και από μεταβολίτη του αραχιδονικού οξέος και του αναστολέα ανάπτυξης Delta12-προσταγλανδίνη J2, το οποίο είναι ένα συστατικό του συστήματος συμπληρώματος C5b-9. Επηρεάζεται και από ξενοβιοτικά όπως το αρσενικό, η αιθανόλη, το συμπύκνωμα καπνού και από πολλούς άλλους ρύπους του εδάφους, του αέρα και του νερού³¹.

Οι πρωτεΐνες GADD45 εμπλέκονται σε πολλές βασικές διεργασίες που αποδεικνύονται ότι συνδέονται στενά με τις παθήσεις που σχετίζονται με τη γήρανση και την ηλικία (ARDs), συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης DNA, διατηρώντας τη σταθερότητα του γονιδιώματος, της επιγενετικής ρύθμισης, την ανακοπή του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής γήρανσης, της απόπτωσης, της κυτταρικής επιβίωσης, τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και την ανοσία, καθώς και την εμβρυογένεση.

Η μελέτη της οικογένειας Gadd45 των θηλαστικών μπορεί να παρέχει δυνητικά θεραπευτικούς στόχους για την καταπολέμηση των ARD και την προώθηση της μακροζωίας³².

Οι γνώσεις μας σχετικά με τον αντίκτυπο των πρωτεϊνών GADD45 στα ARD και στις σχετιζόμενες με τη γήρανση συνθήκες δεν έχουν ακόμη επανεξεταστεί συστηματικά. Με αυτό το σκεπτικό, θελήσαμε να διερευνήσουμε τη σχέση της GADD45a με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες νεαρών και γηρασμένων βλαστοκυττάρων.

5. Σκοπός και Στόχοι Διπλωματικής

Με βάση την βιβλιογραφία που αφορά αυτή την εργασία, γνωρίζουμε την ύπαρξη σχέσης μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της γήρανσης, αλλά και ενδείξεις που αφορούν στην επίδραση αυτής της σχέσης στη διάρκεια της ζωής των βλαστοκυττάρων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση αυτής της σχέσης, μέσω της μελέτης της απόκρισης των βλαστοκυττάρων στο εξωγενώς επαγόμενο οξειδωτικό στρες

Έτσι, επιχειρήσαμε να αναλύσουμε τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της, ύστερα από πρόκληση οξειδωτικού στρες τόσο σε νεαρά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, όσο και σε κύτταρα μέσης ηλικίας, αλλά και κύτταρα που εισέρχονται στην κυτταρική γήρανση στην *in vitro* καλλιέργεια.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ασθενείς και Δείγματα Βλαστοκυττάρων

Για την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας καλλιεργήθηκαν βλαστοκύτταρα που απομονώθηκαν από το ομφαλοπλακουντιακό αίμα νεογνών που μας έδωσε η Biohellenika, τράπεζα φύλαξης βλαστοκυττάρων με έδρα στη Θεσσαλονίκη.

Συνολικά για τον πρώτο κύκλο πειραμάτων, αυτού της σχετικής ποσοτικοποίησης των μεταγραφικών επιπέδων των υπό μελέτη γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα νεογνών. Ενώ για τις επιδράσεις με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα νεογνών.

2. Καλλιέργεια Βλαστοκυττάρων

Υλικά καλλιέργειας

• Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ήταν το Dulbeco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM) της BOWEST. Στο θρεπτικό πριν την χρήση του στα πειράματα, προστίθεται ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) και αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin streptomycin, P/S) σε αναλογία 10% και 1% του όγκου του θρεπτικού DMEM αντίστοιχα. Σε 500ml θρεπτικού υλικού προστίθεται 50ml FBS και 5ml P/S. Το FBS προστίθεται γιατί παρέχει παράγοντες που βοηθούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων. Το έτοιμο θρεπτικό για χρήση φυλάσσεται και διατηρείται στο ψυγείο στους 4°C.

• Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS, Gibco).

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των κυττάρων είναι το PBS χωρίς CaCl₂ και MgCl₂. Ρόλος του είναι η σταθεροποίηση του PH της καλλιέργειας. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου 25°C.

• Θρυψίνη (Trypsin, Lonza).

Η θρυψίνη χρησιμοποιήθηκε για την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα καθώς πρόκειται για ένα ένζυμο που προκαλεί τη διάσπαση των συνδέσμων των κυττάρων στην επιφάνεια προσκόλλησης. Η κατάλληλη

θερμοκρασία χρήσης της Θρυψίνης είναι 37°C, προκειμένου να μην μειώνεται απότομα η θερμοκρασία των βλαστοκυττάρων, ενώ διατηρείται στους 4°C.

Συνθήκες Καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των βλαστοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες t75 χρησιμοποιώντας το έτοιμο θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη τους έγινε σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και σταθερή εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε στείρο περιβάλλον και όλες οι διεργασίες των κυττάρων έγιναν μέσα σε Θάλαμο Κάθετης Νηματικής Ροής. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε Ανεστραμένο.

Πρωτόκολλο Καλλιέργειας

Τα βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια των μέσων που καλλιεργούνται. Γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται θρυψίνη για την αποκόλληση τους. Η διαδικασία μεταφορά τους στις φλάσκες για την καλλιέργεια τους περιλαμβάνει:

- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα t75 και προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) Τα κύτταρα μετά την ανάπτυξη τους και την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας διαιρούνται σε δύο νέες φλάσκες με το παρακάτω πρωτόκολλο ώστε να συνεχιστεί η καλλιέργειά τους:
- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 2ml θρυψίνη και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 4ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scraper)
- 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 4ml PBS

- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 4ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά 2ml θρεπτικού υλικού σε κάθε νέα φλάσκα και προσθήκη 6ml θρεπτικού υλικού σε κάθε φλάσκα για συνολικό όγκο 10 ml σε κάθε φλάσκα t75.
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37°C)

Τα βλαστοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τόσο για απομόνωση RNA όσο και για την απομόνωση πρωτεϊνών.

3. Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες σε 6-well plates

Τα δείγματα που προορίζονται για επιδράσεις μετά την πλήρη κάλυψη σε δύο φλάσκες t75, διαιρούνται σε δύο 6-well plates από πέντε πηγαδάκια στο καθένα με τον ίδιο τρόπο που διαιρούνται σε δύο φλάσκες. Το ένα 6-well plate το έχουμε για απομόνωση πρωτεϊνών ενώ το άλλο για απομόνωση RNA. Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας από το κάθε πηγαδάκι, η διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει. Στην περίπτωση μας η διαφορά μεταξύ των διαφορετικών πηγαδακίων έγκειται στον χρόνο ανάκαμψης, ύστερα από την επίδραση με H₂O₂ ίδιας συγκέντρωσης (300 μM), για μία ώρα. Χρόνος ανάκαμψης είναι ο χρόνος που είχαν τα κύτταρα έπειτα από την επίδραση, σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική οι χρόνοι ανάκαμψης που επιλέχθηκαν ήταν: 0 ώρες, 1 ώρα, 6 ώρες, 24 ώρες και 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)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Διαχωρισμός μετά από την πλήρη κάλυψη σε δύο φλάσκες από το ίδιο δείγμα σε δύο 6–well plates από πέντε πηγαδάκια στο καθένα
- Συνέχεια καλλιέργειας των κυττάρων στα 6–well plates
- Στο 80-90% κάλυψης σε κάθε πηγαδάκι ξεκινάει η διαδικασία επίδρασης
- Δημιουργία διαλύματος θρεπτικού με H_2O_2 (300 μ M)
- Απομάκρυνση θρεπτικού από τα 6–well plates
- Ξέπλυμα κάθε πηγαδακιού με 2ml PBS
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού H_2O_2 σε κάθε πηγαδάκι εκτός του πρώτου (χωρίς επίδραση-no treat-control)
- Επώαση για μία ώρα στον κλίβανο
- Απομάκρυνση του θρεπτικού με το H_2O_2 μετά από μία ώρα
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού σε κάθε πηγαδάκι
- Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα που ορίστηκαν (1h, 6h, 24h, 48h) απομάκρυνση του θρεπτικού.

Αντίστοιχο πρωτόκολλο ακολουθούμε για απομόνωση RNA ή πρωτεϊνών για κάθε πηγαδάκι.

4. Απομόνωση Πρωτεϊνών

Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis buffer) 30 mM Tris (Invitrogen) 10% Glycerol (Invitrogen) 150 mM NaCl (Sharlau) 1% NP40 (Ambion)
- Αναστολείς πρωτεασών
- Αναστολείς φωσφατασών

Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών

- Απομάκρυνση θρεπτικού από τη φλάσκα ή τα πηγαδάκια.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS δύο φορές (5ml για τις φλάσκες, 2ml για κάθε πηγαδάκι)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο

- 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. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scrapper)
- 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 100μl διαλύματος λύσης, στο οποίο είχε προστεθεί 15μl αναστολείς πρωτεασών
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του σε eppendorf
- Διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 40 λεπτά και ανάδευση της σε vortex ανά 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο eppendorf
- Αποθήκευση της στους -80°C

Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών – μέθοδος Bradford

Ο υπολογισμός έγινε με την μέθοδο Bradford, κατά την οποία μία χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250), όταν δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Έτσι με χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών δημιουργήσαμε μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης τιμών απορρόφησης με πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις. Με βάση αυτήν την καμπύλη υπολογίσαμε τις άγνωστες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών των δειγμάτων μας υπολογίζοντας την τιμή της απορρόφησης που προέκυψε από 5μl της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε 495μl διαλύματος Bradford (5%)

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl ddH₂O

- Προσθήκη 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα
- Επώαση μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου • Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά σε 96wells και φωτομέτρηση στα 595nm
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης βάσει των τιμών απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων.

5. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και τον συντελεστή τριβής (f):

$$U = E z / f$$

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού βάρους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα με αποτέλεσμα να καταστρέφονται μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Έτσι το σύμπλοκο του SDS με την αναδιατεταγμένη πρωτεΐνη έχει μεγάλο φορτίο ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό αυτό φορτίο που αποκτά η πρωτεΐνη είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που είχε αρχικά η φυσική πρωτεΐνη και έτσι το αρχικό φορτίο της θεωρείται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και έτσι η μετακίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

Υλικά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (NuPage Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen)

- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
- Αντιοξειδωτικό (NuPage Antioxidant, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMOS.A.)

Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Πριν την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται αποδιάταξη και διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 35μg

Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε:

- Πρωτεΐνη: xμl
- Sample buffer: 5μl
- Reducing buffer: 2μl
- ddH₂O: γμl (μέχρι τελικό όγκο 20μl)

τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 950C για 5 λεπτά.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- στήσιμο της συσκευής (Bio-Rad)
- προσθήκη 600ml (50ml Running buffer σε 950ml ddH₂O) στο μπροστινό και οπίσθιο μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο τμήμα της συσκευής προστίθενται 200ml Running buffer και 500ml Antioxidant
- Φόρτωση δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου. (στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών)

6. Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών- Western Blot

Έπειτα από τον διαχωρισμό τους, στόχος είναι να οπτικοποιήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

Προκειμένου να ανιχνευθεί η επιλεγμένη πρωτεΐνη απαιτείται η χρήση ενός αντισώματος που θα προσκολληθεί στην υπό μελέτη πρωτεΐνη καθώς θα την

αναγνωρίσει σαν αντιγόνο, και στην συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο θα είναι ειδικό για το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα συνήθως είναι σεσημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) με αποτέλεσμα να δημιουργείται σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτινών X (αυτοραδιογραφίας) η οποία αντιπροσωπεύει τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνη. Η όλη διαδικασία των αντισωμάτων πραγματοποιείται πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η επιφάνειες αυτές βοηθούν τις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα.

Υλικά ανοσοαποτύπωσης

- Διάλυμα μεταφοράς 1. 5% Transfer buffer (NuPage Transfer buffer, Invitrogen) 2. 1% μεθανόλη (Applichem)
- Χαρτί Whitman
- Μεμβράνη PVDF
- Χρωστική μεμβράνης
- Διάλυμα πλύσης 1. 50mM Tris (Invitrogen) 2. 150mM NaCl (Sharlau) 3. 1mM EDTA (Sharlau) 4. 0.05% Tween (Bio-Rad)
- Σκόνη μπλοκαρίσματος
- Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen)
- Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, Thermo Scientific)
- Rabbit polyclonal anti-Bcl-1, anti-LC3A/B, (Cell Signaling)
- Mouse monoclonal anti-actin, 1:1000, #SC5737 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- Goat anti-rabbit HRP, 1:10000, #196832 (Thermo Scientific)
- Goat anti-mouse HRP, 1:10000, #G21040

Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Trans-Blot wet Transfer Cell (Bio-Rad) και η διαδικασία ήταν η εξής:

- Πριν την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών επωάζονται σε transfer buffer για 20 λεπτά η μεμβράνη PVDF (αφού έχει πρώτα επωαστεί για 15 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη), δύο χαρτάκια Whitman και η πηκτή πολυακριλαμίδιου

- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατασκευάζεται το sant wits (με σειρά τοποθέτησης): 2 χαρτάκια Whitman - μεμβράνη PVDF - πηκτή πολυακρυλαμιδίου - 2 χαρτάκια Whitman
- Μεταφορά του sant wits στο κουτί στην συσκευή
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 100V για 60 λεπτά
- Μετά το τέλος της μεταφοράς ακολουθεί βάνψιμο της μεμβράνης με Ponceau, μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες των πρωτεϊνών
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5gr σκόνης 50ml TBST) • Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα στους 40C με ανάδευση ολονύκτια. Το αντίσωμα έχει διαλυθεί πρώτα σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5%
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Επώαση στο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)

Στη συνέχεια ακολουθεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων (αυτοραδιογραφία).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Επώαση της μεμβράνης σε ενισχυτικό σήματος ECL για 3 λεπτά
- Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί και μεταφορά της μεμβράνης σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance) το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Τρέξιμο του ανάλογου προγράμματος από τον υπολογιστή (προ) και αναγνώριση του σήματος των μπαντών
- Ποσοτικοποίηση με το πρόγραμμα IMAGE J

7. Απομόνωση RNA

Υλικά απομόνωσης RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies) B.7.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA
- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
- 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 πηγαδάκια, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scrapper)
- 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
- Επώαση για 5 λεπτά στους 15-30°C στο υδατόλουτρο
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου για κάθε και ανάδευση με vortex για 15 δευτερόλεπτα
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 40°C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf των 2ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 40°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης

- Ανάδευση με και φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 40C
- 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 570C στο υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του στους -800C

Για απομόνωση RNA από wells πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία από το στάδιο προσθήκης του Trizol και έπειτα, η διαφορά έγκειται στην αρχή της διαδικασίας στην οποία αφού απομακρύνουμε το θρεπτικό από τα wells και ξεπλύνουμε με 2ml PBS προσθέτουμε 0,5ml Trizol.

8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου

Όπως και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) όπου μέσω του ενζύμου Taq πολυμεράσης από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και κατάλληλων εκκινητών πραγματοποιείται ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA. Έτσι και η real time PCR αποτελεί μία αντίστοιχη τεχνική η οποία επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευση και παράλληλα μέτρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR για κάθε κύκλο τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσοστό του μητρικού DNA, κατά την έναρξη της, καθώς στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα ποσοτικοποίησης αποτελεί το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems). Τη βασική αρχή του συστήματος αποτελεί η ανίχνευση του φθορισμού των ειδικών φθορίζουσών χημικών ουσιών, που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος που ενισχύεται. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία η οποία συνδέεται επιλεκτικά σε δίκλιωνα μόρια DNA και ενισχύει το φθορισμό της. Υπάρχουν δύο τρόποι υπολογισμού της αρχικής ποσότητας DNA στην real time PCR, ο απόλυτος και ο σχετικός προσδιορισμός. Στον απόλυτο προσδιορισμό υπολογίζονται με ακρίβεια τα αντίγραφα που υπήρχαν πριν την ενίσχυση στο δείγμα μας για το υπό μελέτη γονίδιο, ενώ στον σχετικό προσδιορισμό υπολογίζεται η ποσότητα των αντιγράφων σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (που

εκφράζεται πάντα στο υπό μελέτη ιστό) για το υπό μελέτη δείγμα. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σχετικός προσδιορισμός και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH.

Υλικά για την real time PCR

- cDNA
- ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5μM) για το γονίδιο Gadd45a
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH2O) (DEMO)

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
- ddH2O 3,9μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο ήταν οι εξής:

Gadd45a F : GAGCAGAAGACCGAAAGCGAC με Tm στους 61,8°C

Gadd45a R : GAATGTGGATTTCGTCACCAGC με Tm στους 59,8°C

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:
 - a) Αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - b) Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 60 δευτερόλεπτα
 - c) Επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

9. Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22 και πιο συγκεκριμένα οι δοκιμασίες independent-sample T-test και Mann Whitney. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p\text{-value} < 0,05$ ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean+standard deviation, SD).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

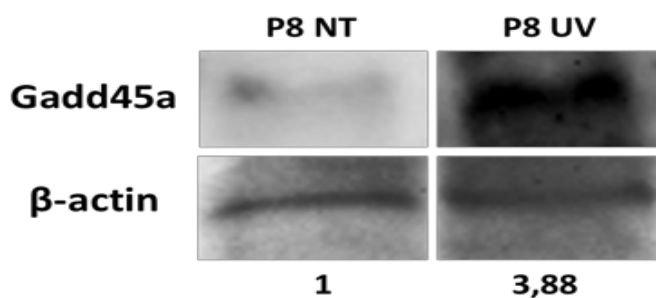
1. Ποσοτικός Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της GADD45a μετά από έκθεση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε UV ακτινοβολία

Ως γνωστών η GADD45a εμπλέκεται στην απόκριση σε διάφορες μορφές στρες που έχει ως αποτέλεσμα να εκτελεί τις παρακάτω διεργασίες με παρακάτω σειρά:

- παύση του κυτταρικού κύκλου και
- επιδιόρθωση των βλαβών του DNA

διεργασίες που σχετίζονται με την επιβίωση και την κυτταρική γήρανση καθώς και την απόπτωση του κυττάρου.

Στη συγκεκριμένη Διπλωματική εκθέσαμε νεαρά μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα σε UV ακτινοβολία. Κάνοντας ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών της GADD45A και χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την β-ακτίνη (β-actin), μετά την επίδραση της GADD45a σε UV ακτινοβολία, πήραμε ως αποτέλεσμα ότι στα νεαρά βλαστοκύτταρα - passage 8 (p8), έχουν αυξημένη την ποσότητα της πρωτεΐνης GADD45A σε σχέση με τη φυσιολογική συνθήκη στο ίδιο passage (p8 NT) (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Επίδραση UV στο p8.

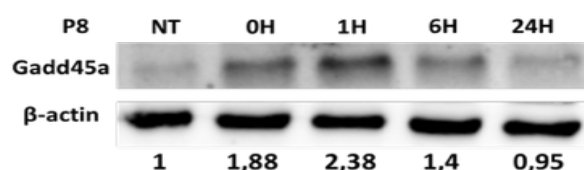
Συμπεραίνουμε λοιπόν πως τα επίπεδα της GADD45A αυξήθηκαν ραγδαία μετά από επίδραση με UV ακτινοβολία.

2. Ποσοτικός Προσδιορισμός mRNA της GADD45a μετά από έκθεση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε οξειδωτικό στρες (ROS) κατά την γήρανσή τους

Ελέγχθηκαν στη συνέχεια τα μεταγραφικά επίπεδα της GADD45a σε φυσιολογικά μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (NT) αλλά και σε βλαστοκύτταρα που έχουν υποστεί Οξειδωτικό Στρες (ROS) με την βοήθεια Οξειδωτικού Μέσου (H_2O_2) σε νεαρή ηλικία αλλά και σε μεγαλύτερα passages.

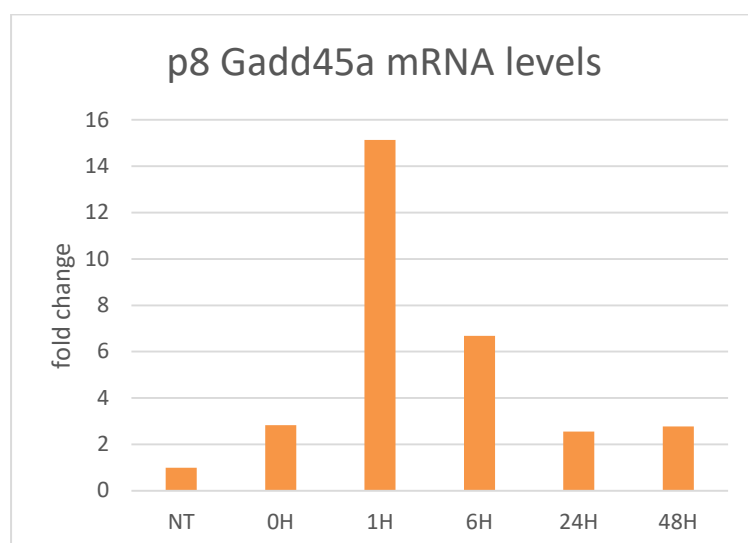
Στο συγκεκριμένο πείραμα, πρωτεΐνες και mRNA απομονώθηκαν από κύτταρα διαφόρων σταδίων χωρίς την επίδραση με H_2O_2 αλλά και μετά την επίδραση με H_2O_2 και ανάκαμψη των κυττάρων για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Αποτέλεσμα του πειράματος αυτού είναι ότι στα νεαρά βλαστοκύτταρα (p8) μετά από την επίδραση με ROS, τα επίπεδα του mRNA της GADD45A, δείχνουν να αυξάνονται δραματικά μετά την 1 ώρα (1h) ανάκαμψης και έπειτα να μειώνονται ξανά έως ότου να φτάσουν σχεδόν στα αρχικά επίπεδα που ήταν χωρίς την επίδραση με ROS (NT),(Εικόνα 12).



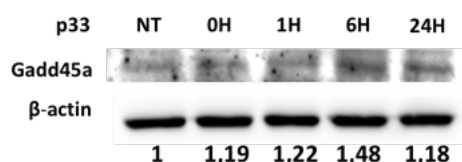
Εικόνα 12: Ποσοτικός Προσδιορισμός στο p8 μετά από ROS.

Επιπλέον στην εικόνα 13 βλέπουμε την αύξηση των επιπέδων mRNA της GADD45a που υπολογίσαμε μέσω RT-PCR έπειτα από την επίδραση του οξειδωτικού στρες και ανάκαμψη για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

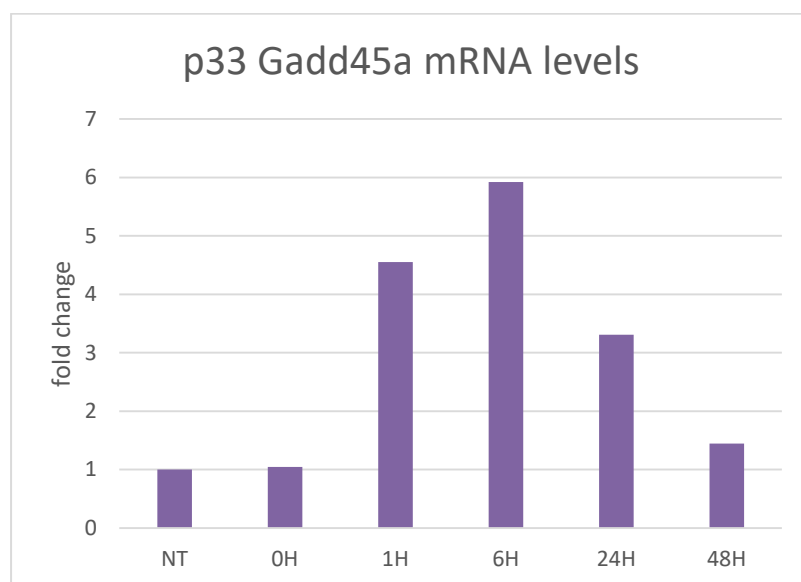


Εικόνα 13: Γράφημα Επίδρασης ROS στο p8 της GADD45 κατά την ανάκαμψή της.

Επιπρόσθετα, μετρήσεις της πρωτεΐνης και των επιπέδων mRNA της GADD45a έγιναν και σε κύτταρα πολύ μεγαλύτερου passage (p33). Τα επίπεδα της GADD45a αυξήθηκαν όπως και στα νεαρά αλλά με καθυστέρηση, καθώς η μέγιστη αύξηση παρατηρείται στα γηρασμένα μετά από 6 ώρες (6h) ανάκαμψης, αντί στη 1h που ήταν στα νεαρά βλαστοκύτταρα. Ανάλογα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA της GADD45a έπειτα από την επίδραση του οξειδωτικού στρες που όμως εμφανίζεται με σχετική καθυστέρηση (6h) σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα (1h) (Εικόνα 14 και 15).

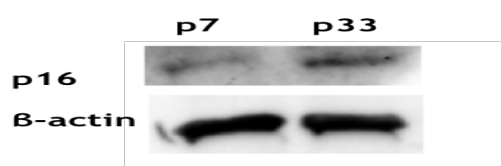


Εικόνα 14: Ποσοτικός Προσδιορισμός στο p33 μετά από ROS.



Εικόνα 15: Γράφημα Επίδρασης ROS στο p33 της GADD45A κατά την ανάκαμψή της.

Στα κύτταρα στο passage 7 και 33 έγινε επιπλέον και προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης p16. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του p16 είναι αυξημένα στο p33 όπως αναμένονται, γεγονός που υποδηλώνει την είσοδο των βλαστοκυττάρων στην κυτταρική γήρανση (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Ποσοτικός Προσδιορισμός p16 στο p8 και στο p33

ΣΥΖΗΣΗ

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα μη-αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστέοκύτταρα, μυοκύτταρα, χονδροκύτταρα και άλλα. Δίνουν, επίσης, στα αιμοποιητικά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα το απαραίτητο υπόστρωμα για την διαφοροποίηση και την αυτοανανέωση τους (stemness). Επιπλέον θα πρέπει να αναφέρουμε την ιδιότητα τους να εξυπηρετούν στην αναγνώριση την αποκατάσταση ή την επανόρθωση των κατεστραμμένων ιστών και οργάνων. Τα βλαστοκύτταρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε κλινικές μελέτες για την χρήση τους σε θεραπείες αυτοάνοσων και εκφυλιστικών νοσημάτων, καθώς και για αρκετές ακόμα θετικές χρήσεις³. Η λειτουργία των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, καθώς και η αποτελεσματικότητά τους και το stemness τους, μειώνονται κατά την γήρανσή τους^{10,12}. Την κατάσταση επιδεινώνει περισσότερο το Οξειδωτικό Στρες (ROS)^{9,12,13}.

Όσον αφορά τα ROS, πρόκειται για την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου όπου μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία ενός βιολογικού συστήματος και να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες. Οι μεγάλες ποσότητες ROS μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις και κατ'επέκταση την ταχύτερη απόπτωση του βλαστοκυττάρου, στην περίπτωση μη επιδιόρθωση της βλάβης από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου¹⁰.

Η οικογένεια GADD45 αποτελεί μια ομάδα πρωτεϊνών που έχει εμπλακεί στα σηματοδοτικά μονοπάτια απόκρισης σε διάφορες μορφές στρες με τελικό σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA²⁴. Έτσι λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι αφού το οξειδωτικό στρες συνδέεται στενά με τις βλάβες στο DNA, όπως αναφέρθηκε παραπάνω και σε συνδυασμό με την μείωση της λειτουργικότητας του κυττάρου που προκαλεί το οξειδωτικό στρες πιθανότατα η GADD45a θα ανταποκρίνεται στην εξωγενή προσβολή.

Επιπλέον είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό φορτίο των κυττάρων αυξάνεται κατά την κυτταρική γήρανση²⁹, έτσι είναι πολύ πιθανό η απόκριση της GADD45a στην οξειδωτική προσβολή να διαφέρει κατά την γήρανση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.

Με δεδομένα όλα αυτά τα στοιχεία που συνδέονται, σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της GADD45a καθώς και οι μεταβολές στα επίπεδά της

έπειτα από την εξωγενή οξειδωτική προσβολή νεαρών και γηρασμένων βλαστοκυττάρων.

Αρχικά κάναμε ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων της GADD45a έπειτα από UV ακτινοβολία, καθώς μελέτες έχουν δείξει πως η UV επηρεάζει τα επίπεδα της GADD45a³³. Το αποτέλεσμα που είχαμε συμβάδιζε με τις έρευνες που το αναφέρουν, αφού παρατηρήθηκε πως στα νεαρά βλαστοκύτταρα (p8) η GADD45a αυξάνεται μετά την έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία.

Ύστερα, ελέγξαμε τα πρωτεϊνικά και μεταγραφικά επίπεδα της GADD45a σε νεαρά και γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έπειτα από εξωγενή οξειδωτική προσβολή. Μελέτες στο συγκεκριμένο κομμάτι δείχνανε πως η GADD45a επηρεάζεται από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί βλάβες στο DNA ανεξαρτήτως ηλικίας του βλαστοκυττάρου. Οι βλάβες έδειξαν να μειώνονται κατά την ανάκαμψη των κυττάρων αλλά όχι ολοκληρωτικά όπως ήταν στα μη επηρεασμένα βλαστοκύτταρα στα οποία εν πραγματοποιήθηκε επίδραση από οξειδωτικό μέσο²⁶. Επίσης αναφέρθηκε πως κατά την γήρανση των βλαστοκυττάρων η λειτουργικότητα της διαδικασίας της ανάκαμψης μειώνεται αλλά παρόλα αυτά οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης λειτουργούν με αργότερους απλά ρυθμούς σε σχέση με αυτούς των νεαρών¹. Τα αποτελέσματα της δική μας μελέτης, όπου έχουν αναφερθεί παραπάνω, δείχνουν να ταιριάζουν με τα αποτελέσματα των υπολοίπων ερευνών που έχουν γίνει στο συγκεκριμένο κομμάτι καθώς παρατηρούμαι στα νεαρά μια άμεση απόκριση στο οξειδωτικό στρες, με αύξηση τόσο των πρωτεϊνικών όσο και των μεταγραφικών επιπέδων της GADD45a αμέσως μετά την επίδραση η οποία ακολουθείται με επιστροφή στα φυσιολογικά επίπεδα έπειτα από 24h. Αντίστοιχα στα γηρασμένα παρατηρούμαι μια καθυστέρηση στην απόκριση καθώς η αύξηση παρατηρείται μετά από 6h και τα επίπεδα παραμένουν αυξημένα σε σχέση με τα νεαρά ακόμη και έπειτα από 24h.

Τέλος, έγινε και επιπλέον προσδιορισμός της πρωτεΐνης p16. Ως γνωστόν η ενεργοποίηση της p16 έχει ως αποτέλεσμα την έξοδό του από τον κυτταρικό κύκλο και την απόκρισή του στην γήρανση, δηλαδή εν συντομία υποδηλώνει την γήρανση του³⁴. Παρατηρήθηκε ότι έπειτα από το passage33 η p16 αυξήθηκε κάτι που υποδηλώνει την είσοδο των κυττάρων στην γήρανση. Έτσι επιλέχθηκε, να πραγματοποιηθούν οι επιδράσεις για τα γηρασμένα βλαστοκύτταρα στο συγκεκριμένο στάδιο.

Προκειμένου να επέλθει η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών, των μεταγραφικών επιπέδων και του ρόλου της πρωτεΐνης GADD45a κατά την γήρανση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες που μπορεί να τους προκληθεί, προτείνεται να διεξαχθούν κάποια επιπλέον εξειδικευμένα πειράματα για την πλήρη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Η χρήση περισσότερων δειγμάτων και διαφορετικών αναστολέων γονιδίων ίσως επιφέρουν θετικά αποτελέσματα στην συγκεκριμένη έρευνα. Η πρόκληση οξειδωτικού στρες στα βλαστοκύτταρα με κάποιο νέο μέσο ή η πρόκληση αλλαγών στην γήρανση των βλαστοκυττάρων ίσως αποτελέσουν μερικούς ακόμη μελλοντικούς στόχους. Ακόμη και η επέμβαση στο σηματοδοτικό μονοπάτι της GADD45a και των επιδιορθωτικών μηχανισμών, ίσως θεωρηθεί ένας ακόμη μελλοντικός στόχος για διερεύνηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Moskalev, A. A. *et al.* Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Research Reviews* (2012). doi:10.1016/j.arr.2011.09.003
2. Daley, G. Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**, 20140376 (2015).
3. Bhartiya, D. Pluripotent Stem Cells in Adult Tissues: Struggling To Be Acknowledged Over Two Decades. *Stem Cell Rev. Reports* **13**, 713–724 (2017).
4. So, W.-K. & Cheung, T. H. Molecular Regulation of Cellular Quiescence: A Perspective from Adult Stem Cells and Its Niches. in 1–25 (Humana Press, New York, NY, 2018). doi:10.1007/978-1-4939-7371-2_1
5. Τι είναι το Οξειδωτικό Στρες και γιατί συμβάλει στην πρόωρη γήρανση; Available at: <https://www.doctorsformulas.com/category/νεα-δημοσιευσεις/τι-ειναι-το-οξειδωτικο-stre>. (Accessed: 10th September 2019)
6. *Κεφάλαιο 5-Οξειδωτικό Στρες: Μοριακοί Μηχανισμοί Πρόκλησης Βλαβών σε Κυτταρικά Συστατικά.*
7. Bigarella, C. L., Liang, R. & Ghaffari, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* **141**, 4206–18 (2014).
8. Cieślak-Pobuda, A., Yue, J., Lee, H.-C., Skonieczna, M. & Wei, Y.-H. ROS and Oxidative Stress in Stem Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 5047168 (2017).
9. Ren, R., Ocampo, A., Liu, G.-H. & Izpisua Belmonte, J. C. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metab.* **26**, 460–474 (2017).
10. Oh, J., Lee, Y. D. & Wagers, A. J. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat. Med.* **20**, 870–80 (2014).
11. Revuelta, M. & Matheu, A. Autophagy in stem cell aging. *Aging Cell* **16**, 912–915 (2017).
12. Schultz, M. B. & Sinclair, D. A. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* **143**, 3–14 (2016).
13. Chen, F., Liu, Y., Wong, N.-K., Xiao, J. & So, K.-F. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. *Cell Transplant.* **26**, 1483–1495 (2017).
14. Abdollahi, A., Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A.

- Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* **6**, 165–7 (1991).
15. Gadd45 - Βικιπαίδεια. Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Gadd45>. (Accessed: 22nd July 2019)
 16. Kaufmann, L. T., Gierl, M. S. & Niehrs, C. Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns* **11**, 465–70 (2011).
 17. Zhang, W. *et al.* CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene* **18**, 4899–907 (1999).
 18. Chung, H. K. *et al.* CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **278**, 28079–88 (2003).
 19. Vairapandi, M., Balliet, A. G., Hoffman, B. & Liebermann, D. A. GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J. Cell. Physiol.* **192**, 327–38 (2002).
 20. Johnen, H. *et al.* Gadd45g is essential for primary sex determination, male fertility and testis development. *PLoS One* **8**, e58751 (2013).
 21. Kovalsky, O., Lung, F. D., Roller, P. P. & Fornace, A. J. Oligomerization of human Gadd45a protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 39330–9 (2001).
 22. Sytnikova, Y. A., Kubarenko, A. V., Schäfer, A., Weber, A. N. R. & Niehrs, C. Gadd45a is an RNA binding protein and is localized in nuclear speckles. *PLoS One* **6**, (2011).
 23. Nakayama, K., Hara, T., Hibi, M., Hirano, T. & Miyajima, A. A novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family with MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth. *J. Biol. Chem.* **274**, 24766–72 (1999).
 24. Li, D. *et al.* GADD45a regulates olaquinox-induced DNA damage and S-phase arrest in human hepatoma G2 cells via JNK/p38 pathways. *Molecules* **22**, (2017).
 25. Chakravarty, D. *et al.* Three GADD45 isoforms contribute to hypertonic stress phenotype of murine renal inner medullary cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**, F1020-9 (2002).

26. Guo, W. *et al.* Methylation-mediated repression of GADD45A and GADD45G expression in gastric cardia adenocarcinoma. *Int. J. cancer* **133**, 2043–53 (2013).
27. Zhan, Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **569**, 133–143 (2005).
28. Liebermann, D. A. & Hoffman, B. Gadd45 in stress signaling. *J. Mol. Signal.* **3**, 15 (2008).
29. Moskalev, A. A. *et al.* Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Res. Rev.* **11**, 51–66 (2012).
30. Kaufmann, L. T. & Niehrs, C. Gadd45a and Gadd45g regulate neural development and exit from pluripotency in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **128**, 401–11 (2011).
31. Jiang, F. & Wang, Z. Gadd45gamma is androgen-responsive and growth-inhibitory in prostate cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **213**, 121–9 (2004).
32. Gong, R. *et al.* Assignment of human GADD45G to chromosome 9q22.1-->q22.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**, 95–6 (2000).
33. Wan, Y. *et al.* UV-induced expression of GADD45 is mediated by an oxidant sensitive pathway in cultured human keratinocytes and in human skin in vivo. *Int. J. Mol. Med.* **6**, 683–8 (2000).
34. D’Arcangelo, D., Tinaburri, L. & Dellambra, E. The Role of p16INK4a Pathway in Human Epidermal Stem Cell Self-Renewal, Aging and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1591 (2017).