



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Η πρωτεΐνη Gadd45a στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου»**

ΒΟΥΜΒΟΥΡΑΚΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Βιολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ , *Επιβλέπουσα*

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, Σύμβουλος/ *Συνεπιβλέπουσα*

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

MASTER’S THESIS

«Gadd45a in cell cycle regulation»

VOUMVOURAKI ANASTASIA

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την περάτωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποια άτομα που στάθηκαν δίπλα μου σε όλο αυτό το ταξίδι της γνώσης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Τραχανά Βαρβάρα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, καθώς και για τις παραγωγικές υποδείξεις και συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια διενέργειάς της.

Το ίδιο πολύτιμη ήταν και η βοήθεια του υποψήφιου διδάκτορα του εργαστηρίου, Γούτα Ανδρέα, ο οποίος ανταποκρίθηκε σε ό,τι απορία και δυσκολία προέκυψε και με βοήθησε, με όλη του την θετική ενέργεια και την άριστη μεταδοτικότητα του, να αποκτήσω πλήρη γνώση του αντικειμένου. Ακόμη, ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω και στην συμφοιτήτριά μου και lab partner Ζωζώ Ουτσκούνη, η οποία μού μεταλαμπάδευσε τις γνώσεις που έχει αποκομίσει από την εμπειρία της στο ερευνητικό αντικείμενο του εργαστηρίου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τις συνεπιβλέπουσες καθηγήτρίες μου, την κυρία Τσέζου Ασπασία και την κυρία Παπαθανασίου Ιωάννα, που μου παρείχαν τον τελευταίο χρόνο όλα τα απαραίτητα εφόδια για την σωστή διεκπεραίωση της συγκεκριμένης ερευνητικής διπλωματικής.

Τέλος, το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» το οφείλω στα αγαπημένα μου πρόσωπα, την οικογένειά μου και τους κοντινούς μου φίλους, οι οποίοι με στήριξαν σε κάθε μου επιλογή και μού έδωσαν όλη την δύναμη να εκπληρώσω τους στόχους που είχα θέσει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρική γήρανση είναι μια διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά σε όλα τα κύτταρα σε κάποια φάση της ζωής τους. Μπορεί να προκληθεί από βλάβες στο DNA μέσω εξωγενών παραγόντων (UV ακτινοβολία ή οξειδωτικό στρες), από την βράχυνση των τελομερικών άκρων μετά από συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων ή ακόμα και από ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Στη φάση αυτή τα κύτταρα αλλάζουν δομικά και μορφολογικά, ενώ γίνονται μεγαλύτερα και πιο πεπλατυσμένα. Μοριακά επίσης χαρακτηρίζονται από την έκφραση της SA-β-gal, της β-γαλακτοζιδάσης των λυσοσωμάτων των κυττάρων που βρίσκονται σε αναδιπλασιαστική ή επαγόμενη γήρανση και ανιχνεύεται σε pH 6, αλλά και των καταστολέων του κυτταρικού κύκλου, p21 και p16. Τα δύο είδη κυτταρικής γήρανσης που συναντώνται είναι η αναδιπλασιαστική γήρανση (Replicative Senescence: RS) -που κύρια σχετίζεται με τη βράχυνση των τελομερών- και η επαγόμενη από το στρες γήρανση (Stress-induced premature senescence: SIPS).

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης έχει η πρωτεΐνη Gadd45a, καθώς η αποσιώπησή της οδηγεί σε απώλεια της φυσιολογικής αυτής διαδικασίας. Η πρωτεΐνη αυτή βοηθάει στη διατήρηση της γενωμικής και κεντροσωμικής σταθερότητας συμμετέχοντας στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου έπειτα από συσσώρευση βλαβών. Γνωρίζουμε ότι ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από διάφορα σημεία ελέγχου ως προς την ακεραιότητα των κυττάρων που πρόκειται να διαιρεθούν. Ένα από αυτά είναι και το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου Spindle Assembly Checkpoint (SAC), το οποίο όταν ενεργοποιείται, τα κύτταρα σταματάνε στην μίτωση και δεν προχωράνε στην ανάφαση. Το SAC ελέγχει τη σωστή σύνδεση των κινητοχώρων των χρωμοσωμάτων με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου, με σκοπό να γίνει σωστά ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση.

Για να διερευνηθεί η σημαντικότητα της πρωτεΐνης Gadd45a στον κυτταρικό κύκλο και στο SAC, έγινε αποσιώπησή της με εισαγωγή siGadd45a σε νεαρά και γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Μετά από χρώση με το κατάλληλο αντίσωμα εναντίον της γ-τουμπουλίνης και ανοσοφθορισμό, επιβεβαιώθηκε μέσω παρατήρησης σε μικροσκόπιο φθορισμού ότι η απουσία της Gadd45a μπορεί να οδηγήσει σε

υπεράριθμα κεντροσώματα (centrosome amplification). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες. Στην συνέχεια, έπειτα από επιδράσεις με ταξόλη- που εμποδίζει τη φυσιολογική λειτουργία των μικροσωληνίσκων και συνεπώς οδηγεί σε διακοπή της μίτωσης εάν το SAC είναι λειτουργικό- σε κύτταρα όπου είχε αποσιωποιηθεί η Gadd45a (μέσω siGadd45a) και σε κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως control (siControl), καταμετρήθηκαν αυτά τα οποία τελικά σταμάτησαν στη μίτωση λόγω του ενεργοποιημένου SAC. Στα νεαρά αλλά και στα γηρασμένα siGadd45a κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση των μιτωτικών κυττάρων, κι άρα των κυττάρων που λειτουργούσε φυσιολογικά το SAC, γεγονός που πιθανά σχετίζεται με την αποσιώπηση της *gadd45a*.

Επιπλέον, για να αναλυθεί η ενεργότητα του SAC στα siGadd45a κύτταρα, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των βασικών πρωτεϊνών του, BubR1 και Mad2. Η έκφρασή τους φάνηκε να αυξήθηκε στα γηρασμένα siControl σε σχέση με τα νεαρά, ενώ στα siGadd45a μειώθηκε ραγδαία σε σύγκριση με τα siControl. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πρωτότυπα και συμβάλλουν στην διαλεύκανση του ρόλου της πρωτεΐνης Gadd45a στο SAC και τον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον πειράματα απαιτούνται προκειμένου να περιγραφεί ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκεται η Gadd45a, μέσω του οποίου επιδρά επί της ρύθμισης του σημείου ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC).

Λέξεις κλειδιά: WJ-MSCs, κυτταρική γήρανση, SAC, Gadd45a, υπεράριθμα κεντροσώματα

ABSTRACT

Cellular senescence is a normal process that occurs normally in every cell's life. It can be caused by DNA damages due to external factors (UV radiation or oxidative stress), by telomeres' shortening after a specific number of divisions or by the activation of oncogenes. These can result to irreversible growth arrest. At this phase, changes in cell's morphology and structure occur, for example it becomes larger and more flattened. At the molecular level, senescent cells are characterized by the expression of SA- β -gal, a senescence-associated lysosomal beta-galactosidase in replicative and stress-induced senescent cells, detected at pH 6. Moreover, senescent cells express cell cycle suppressors, such as p21 and p16. The two types of cellular senescence are the Replicative Senescence (RS) -mostly related to telomeres' shortening- and the Stress-Induced Premature Senescence (SIPS).

Gadd45a protein plays an important role in cellular senescence regulation, as *gadd45a* silencing can lead to loss of senescence's function. This protein helps maintaining genomic and centrosome stability, by participating in cell cycle arrest, after damage accumulation. As we know, cell cycle is controlled by checkpoints that check the integrity of dividing cells. Spindle Assembly Checkpoint (SAC) is one of them, and when it is activated, cells arrest in mitosis and don't proceed to anaphase. SAC controls the attachment of kinetochores to microtubules of mitotic spindle, verifying the correct chromosomal segregation in mitosis.

In order to investigate the importance of Gadd45a protein in cell cycle and SAC, we downregulated its levels by using siGadd45a in young and senescent mesenchymal stem cells. After staining with γ -tubulin antibody and immunofluorescence, it was confirmed -via fluorescence microscope- that lack of Gadd45a can lead to centrosome amplification. This result agrees with previous studies' findings. Subsequently, after taxol treatment -which prevents the normal function of microtubules and leads cells in mitotic arrest if SAC is functional- in siGadd45a and siControl cells, we calculated those who stopped at mitosis. Our results showed a reduction of mitotic cells in young and old cells, that were treated with siGadd45, implying a dysfunctional SAC, finding that is probably associated with *gadd45a* silencing.

Moreover, aiming to SAC activity analysis in siGadd45a cells, we monitored the protein levels of BubR1 and Mad2. It seemed that their expression increased in old compared to young siControl cells, while it rapidly decreased in siGadd45a. These results are novel, and they contribute to the clarification of the role of Gadd45a in SAC and cell cycle. More experiments are required to describe the exact mechanism that Gadd45a protein is involved, which mediates SAC regulation.

Key Words: WJ-MSCs, cellular senescence, SAC, Gadd45a, centrosome amplification

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. Εισαγωγή

I.A. Βλαστοκύτταρα	8
A.1. Ιεραρχία βλαστοκυττάρων βάσει δυναμικού διαφοροποίησης.....	9
A.2. Είδη βλαστοκυττάρων.....	10
A.3. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs).....	12
A.3.i. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα απομονωμένα από την γέλη Wharton (WJ-MSCs).....	12
I.B. Κυτταρική γήρανση	13
B.1. Μορφολογία γηρασμένων κυττάρων.....	14
B.2. Μοριακοί δείκτες γηρασμένων κυττάρων.....	17
B.3. Είδη κυτταρικής γήρανσης.....	18
B.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν γήρανση.....	19
B.4.i. Μονοπάτι p53/p21.....	19
B.4.ii. Μονοπάτι p16/Rb.....	21
I.Γ. Κυτταρικός κύκλος	22
Γ.1. Μίτωση.....	23
Γ.2. Ρόλος των κινητοχώρων.....	24
Γ.3. Ρόλος των κεντροσωμάτων.....	24
Γ.3.i. Υπεράριθμα κεντροσώματα και γήρανση.....	25
Γ.4. APC/C μηχανισμός στη φυσιολογική ροή του κυτταρικού κύκλου, μονοπάτι σεκιουρίνης-σεπαράσης-κοεζίνης.....	26
Γ.5. Σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC= spindle assembly checkpoint).....	26
Γ.5.i. Στρατολόγηση πρωτεϊνών του SAC, δημιουργία MCC συμπλόκου και αναστολή λειτουργίας APC/C-cdc20.....	26
Γ.5.ii. Αποσιώπηση του SAC.....	29
Γ.5.iii. SAC και κυτταρική γήρανση.....	29
I.Δ. Οικογένεια Gadd45 πρωτεϊνών	30

Δ.1. Η πρωτεΐνη Gadd45a.....	30
Δ.2. Gadd45a και κυτταρική γήρανση.....	33
Δ.3. Gadd45a και οξειδωτικό στρες.....	34
I.E. Σκοπός ερευνητικής διπλωματικής.....	35
<u>II. Υλικά και Μέθοδοι</u>	
II.A. Κυτταρικό μοντέλο.....	36
A.1. Καλλιέργειες κυττάρων.....	36
A.2. Κατάψυξη-Απόψυξη κυττάρων.....	38
II.B. Μέθοδος προσδιορισμού δραστηριότητας SA-b-gal.....	39
II.Γ. Αποσιώπηση του γονιδίου Gadd45a με χρήση siGadd45a.....	40
Γ.1. Επιδράσεις με ταξόλη.....	42
Γ.2. Μονιμοποίηση κυττάρων.....	43
Γ.3. Απομόνωση πρωτεϊνών.....	43
Γ.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	44
Γ.4.i. Αποδιάταξη και διαχωρισμός πρωτεϊνών.....	45
Γ.4.ii. Western Blot: Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών.....	47
II.Δ. Ανοσοφθορισμός.....	50
<u>III. Αποτελέσματα</u>	
III.A. Προσδιορισμός δραστηριότητας SA-b-gal.....	52
III.B. Αποσιώπηση γονιδίου <i>gadd45</i>	54
III.Γ. Αποτελέσματα έπειτα από τις επιδράσεις με ταξόλη και mitotic shake off.....	55
III.Δ. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων κυκλίνης B1, BubR1 και Mad2 σε siControl και siGadd45a κύτταρα.....	56
Δ.1. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης κυκλίνης B1.....	57
Δ.2. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης BubR1.....	58
Δ.3. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Mad-2.....	59
III.E. Εκτίμηση υπεράριθμων κεντροσωμάτων μετά από ανοσοφθορισμό.....	60
<u>IV. Συζήτηση</u>	62
<u>V. Βιβλιογραφία</u>	65

I. Εισαγωγή

I.A. Βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα είναι ένας αδιαφοροποίητος κυτταρικός πληθυσμός των πολυκύτταρων οργανισμών και κατέχουν 2 υψηλά ρυθμιζόμενες ιδιότητες.

Αρχικά, διακρίνονται από αυτο-ανανέωση, δηλαδή συνεχόμενη και απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού του εαυτού τους, καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του οργανισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με την συμμετρική διαίρεση, όπου προκύπτουν 2 ίδια θυγατρικά κύτταρα, αντίγραφα του μητρικού, με ακριβώς την ίδια δυναμικότητα με αυτό. Το τελευταίο βοηθάει στο να υπάρχει πάντα ένας αριθμός βλαστοκυττάρων στον οργανισμό (απόθεμα κυττάρων σε ιστούς με χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού) ώστε να μπορέσουν να ενεργοποιηθούν και να πολλαπλασιαστούν όταν υπάρξει ανάγκη (π.χ. τραυματισμός). Με άλλα λόγια, βοηθάει στη διατήρηση, επιδιόρθωση και αναγέννηση των ιστών μέσω σημάτων και αλληλεπιδράσεων με το μικροπεριβάλλον τους (stem cell niches= κρύπτες βλαστοκυττάρων), το οποίο και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους (Denham et al., 2005).

Παρόλα αυτά, υπάρχει και η ασύμμετρη διαίρεση, στην οποία το ένα εκ των δύο θυγατρικών είναι παρόμοιο με το μητρικό και ίσης δυναμικότητας, ενώ το άλλο είναι περισσότερο διαφοροποιημένο (progenitor cell), άρα και μικρότερης δυναμικότητας. Μια τρίτη περίπτωση είναι να προκύψουν 2 παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (progenitor cells), τα οποία καταλήγουν στην διαφοροποίηση, αφού πρώτα έχουν κάνει συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων. Με βάση όλα τα παραπάνω, πρόκειται για κύτταρα που οι απόγονοί τους είναι είτε βλαστικά, είτε κύτταρα που πρόκειται να διαφοροποιηθούν. Αυτό που τα κάνει να διαφέρουν είναι ο βαθμός δυναμικότητας τους (Kolios & Moodley, 2012).

Το δεύτερο χαρακτηριστικό των βλαστικών κυττάρων βασίζεται στην δυνατότητα που έχουν να διαφοροποιούνται σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους (Denham et al., 2005; Kolios & Moodley, 2012).

I.A.1. Ιεραρχία των βλαστοκυττάρων βάσει δυναμικού διαφοροποίησης

Τα βλαστοκύτταρα διαθέτουν δυναμικό διαφοροποίησης (potency) που καθορίζει την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται. Ανάλογα με το δυναμικό αυτό, χωρίζονται σε κατηγορίες (Kolios & Moodley, 2012).

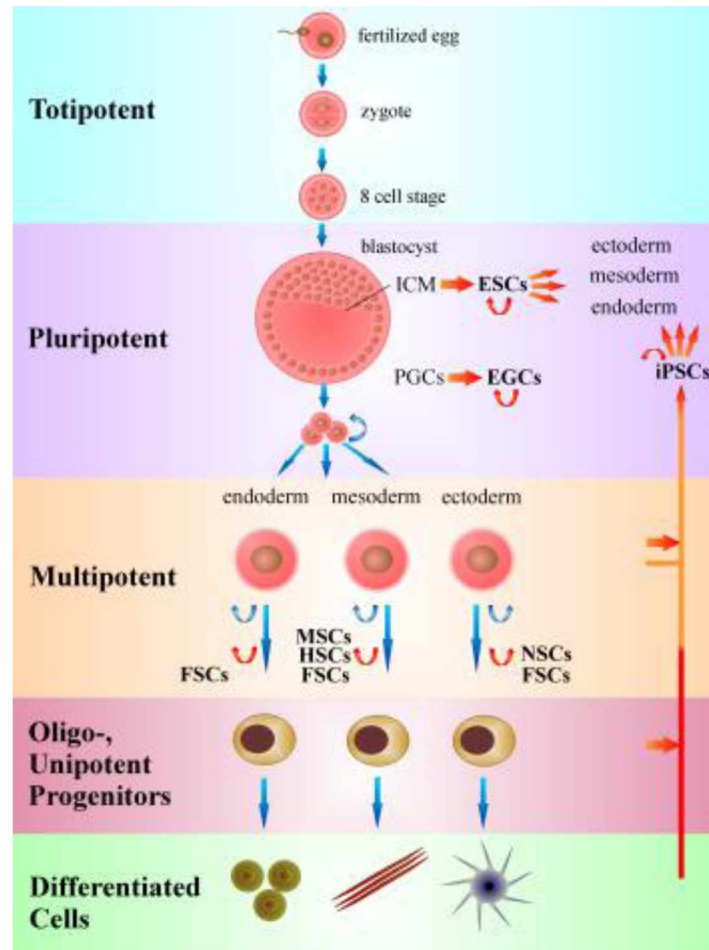
Στην κορυφή της πυραμίδας με το μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης βρίσκονται τα παντοδύναμα (totipotent stem cells) της πρώιμης ανάπτυξης, τα πιο αδιαφοροποίητα από όλα, στα οποία και ανήκει το γονιμοποιημένο ωάριο-ζυγωτό και τα κύτταρα που προκύπτουν από τις δύο πρώτες διαιρέσεις του. Με άλλα λόγια, κύτταρα που θα δημιουργήσουν έπειτα το έμβρυο και εξωεμβρυϊκούς ιστούς (πλακούντας) (Kolios & Moodley, 2012). Μοριακά αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από επιγενετικό επαναπρογραμματισμό, όπως η απομεθυλίωση του DNA στις αρχικές διαιρέσεις πριν την δημιουργία της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, όπου και μεθυλιώνεται σε μικρό βαθμό (C. L. Baker & Pera, 2018).

Καθώς τα κύτταρα του ζυγωτού συνεχίζουν να διαιρούνται, προκύπτει η βλαστοκύστη, μέσα στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, τα ολοδύναμα (pluripotent) εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Αυτά έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα προερχόμενα από τα 3 βλαστικά δέρματα: εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα (Liu et al., 2020).

Στους περισσότερους ιστούς διακρίνουμε πολυδύναμα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (multipotent) τα οποία διαφοροποιούνται με περιορισμένη ικανότητα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Το πρώτο πλεονέκτημα αυτού του είδους κυττάρων είναι ότι αρχικά θα ήταν περισσότερο επωφελή σε αυτόλογες μεταμοσχεύσεις σε σχέση με τα ολοδύναμα εμβρυϊκά όπου υπάρχει μεγάλος κίνδυνος απόρριψης. Το δεύτερο πλεονέκτημα είναι οι ηθικοί προβληματισμοί που δεν θα υπάρχουν. Τα παραπάνω έρχονται να ενισχυθούν και από το γεγονός ότι τα πολυδύναμα κύτταρα παράγουν αναπτυξιακούς παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό, καθώς και αντιφλεγμονώδεις πρωτεΐνες που καταπολεμούν τυχόν φλεγμονές στον ξένο οργανισμό (Mirzaei et al., 2018).

Προτελευταία στην πυραμίδα, και με περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης, έρχονται τα ολιγοδύναμα (oligopotent), τα οποία δίνουν 2 ή περισσότερες γενεαλογίες κυττάρων του ίδιου ιστού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών είναι τα αιμοποιητικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε μυελοειδή ή λεμφοειδή κύτταρα. Τέλος, υπάρχουν

και τα μονοδύναμα (unipotent) με το μικρότερο δυναμικό, που παράγουν ένα μόνο είδος κυττάρου σε έναν ιστό, όπως είναι τα μυϊκά κύτταρα (Kolios & Moodley, 2012).



Εικόνα 1: Η ιεραρχία των βλαστοκυττάρων (Virchov, 2016)

1.A.2. Είδη βλαστοκυττάρων

Ανάλογα με την πηγή από την οποία τα λαμβάνουμε, τα βλαστοκύτταρα χωρίζονται σε 4 κατηγορίες.

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs) είναι ολοδύναμα και βρίσκονται στην εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης που δημιουργείται περίπου 7 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Με απλά λόγια, τα κύτταρα αυτά προέρχονται από το ίδιο το έμβryo είτε μέσω εξωσωματικής γονιμοποίησης, είτε μέσω αποβολών και, ως επακόλουθο, προκύπτουν ηθικά διλήμματα για την ανθρώπινη ζωή. Επιπλέον, υπάρχει κίνδυνος

ανοσολογικής απόρριψης ή ακόμα και κίνδυνος να αναπτυχθεί κάποιο τεράτωμα. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι είναι ολοδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε είδος κυττάρου του οργανισμού, τα κάνει να πλεονεκτούν έναντι των ενήλικων βλαστοκυττάρων (Chagastelles & Nardi, 2011).

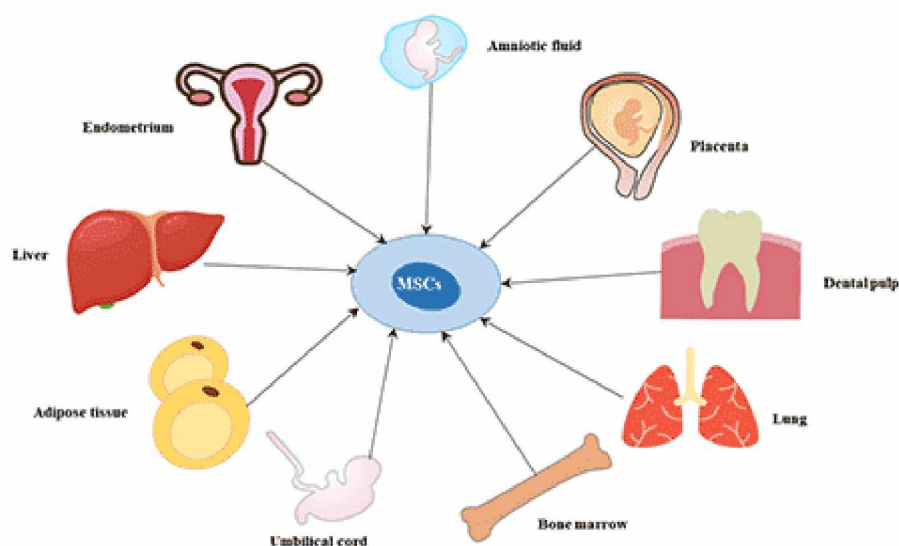
Τα περιγεννητικά βλαστοκύτταρα είναι κύτταρα που αφαιρούνται από περιγεννητικούς ιστούς όπως ο ομφάλιος λώρος, ο πλακούντας και το αμνιακό υγρό, δηλαδή ιστούς που δεν θα υπάρχουν μετά την γέννα, αποτελώντας πηγή μεσεγχυματικών, αιμοποιητικών και άλλων κυττάρων. Ο ομφάλιος λώρος, δηλαδή η σύνδεση μεταξύ πλακούντα και εμβρύου, περιέχει και τον συνδετικό ιστό της γέλης του Wharton, μια πλούσια πηγή μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (WJ-MSCs) (Monti, 2021).

Τα ενήλικα -ή αλλιώς σωματικά- βλαστοκύτταρα (ASCs) έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης και ευκολότερα απομονώνονται από το μυελό των οστών (το πιο συχνό), τον λιπώδη ιστό και τον πολφό των δοντιών. Τα ASCs βοηθάνε κυρίως στην ανάπτυξη, επούλωση και αντικατάσταση έπειτα από φυσιολογικές (τραυματισμός) ή παθολογικές καταστάσεις (ασθένεια). Τα βλαστοκύτταρα αυτά μπορούν να δώσουν νευρώνες, αιμοποιητικά κύτταρα ή μεσεγχυματικά (MSCs). Τα τελευταία είναι αυτά που διαθέτουν και τη μεγαλύτερη πλαστικότητα. Με βάση όλα τα παραπάνω, δεν υπάρχουν ηθικές ανησυχίες για τη χρήση των ASCs σε κυτταρικές θεραπείες (Chagastelles & Nardi, 2011).

Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Τα iPSCs είναι κύτταρα που έχουν προκύψει από σωματικά με επαναπρογραμματισμό. Αυτό επιτεύχθηκε εισαγάγοντας 4 γονίδια που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες: OCT3/4, SOX2, c-Myc και KLF4 σε ινοβλάστες ποντικών. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν ολοδύναμα κύτταρα, δηλαδή κύτταρα που πολλαπλασιάζονται συνεχώς και διαθέτουν υψηλό δυναμικό διαφοροποίησης, που τους δίνει την ικανότητα να παράξουν οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο ενός οργανισμού. Σε περίπτωση μεταμόσχευσης, δεν υπάρχει ο κίνδυνος ανοσολογική απόκρισης, αφού από του ίδιου οργανισμού τα σωματικά κύτταρα προέκυψαν τα επαγόμενα. Τέλος, η κατηγορία αυτή των κυττάρων πλέον χρησιμοποιείται και ως εργαλείο μοντελοποίησης σημαντικών ασθενειών αφού μπορεί να διερευνηθεί κάθε εξατομικευμένος ανθρώπινος ιστός (Kolios & Moodley, 2012).

1.A.3. Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs)

Τα πολυδύναμα μεσεγγυματικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από πολλούς διαφορετικούς ιστούς, όπως ο ομφάλιο λώρος, ο μυελός των οστών, τα λιπώδη κύτταρα και άλλα (εικόνα 2), και είναι εύκολα στην καλλιέργειά τους. Έχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα. Δείκτες όπως οι CD14, 34, 45 και HLA-DR, οι οποίοι απουσιάζουν από τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα, χρησιμοποιούνται για να διακριθούν από τα αιμοποιητικά όπου και εκφράζονται (Ding et al., 2011). Στα MSCs εκφράζονται στην επιφάνειά τους δείκτες όπως CD90, CD105, CD73 and CD44 (Ranjbaran et al., 2018).



Εικόνα 2: Ιστοί προέλευσης των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων (Ref: Cusabio.com)

1.A.3.i. Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα απομονωμένα από την γέλη του Wharton (WJ-MSCs)

Η γέλη του Wharton είναι ο συνδετικός ιστός που περιβάλλει τα αγγεία του ομφάλιου λώρου και είναι πλούσιος σε πλωτεογλυκάνες (Monti, 2021). Ιστολογικά, χωρίζεται σε 3 περιοχές: την υποαμνιακή που περιέχει λίγα κύτταρα, την μεσοαγγειακή με πληθώρα μεσεγγυματικών κυττάρων και κολλαγόνου τύπου I, και το περιγγειακό στρώμα (Paladino et al., 2019). Τα MSCs από την γέλη του Wharton μπορούν να

διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα. Σαν κύτταρα είναι πιο εύκολα να χρησιμοποιηθούν στην έρευνα, καθώς η απομόνωσή τους είναι εύκολη διαδικασία, η χρήση τους δεν εμπλέκει ηθικά ζητήματα σε αντίθεση με τα μεσεγχυματικά που αφαιρούνται από τον μυελό των οστών ή τα ESCs, και η αλλογενής μεταμόσχευσή τους δεν οδηγεί σε τερατώματα. Πρόκειται για ανοσορυθμιστικά (ανοσογονικά και ανοσοκατασταλτικά) κύτταρα, γεγονός το οποίο υποστηρίζεται και από την μεγάλη έκφραση των πρωτεϊνών ιντερλευκίνη 6 και 10, TGF- β , VEGF και την απουσία μορίων όπως CD40, CD80 και CD86. Επομένως, πρόκειται για μία δελεαστική και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην κυτταρική θεραπεία και την μηχανική των ιστών. Τέλος, πριν την απομόνωσή τους προηγείται έντυπη συναίνεση και των δύο γονέων (Joerger-Messerli et al., 2016; Marino et al., 2019)

I.B. Κυτταρική γήρανση

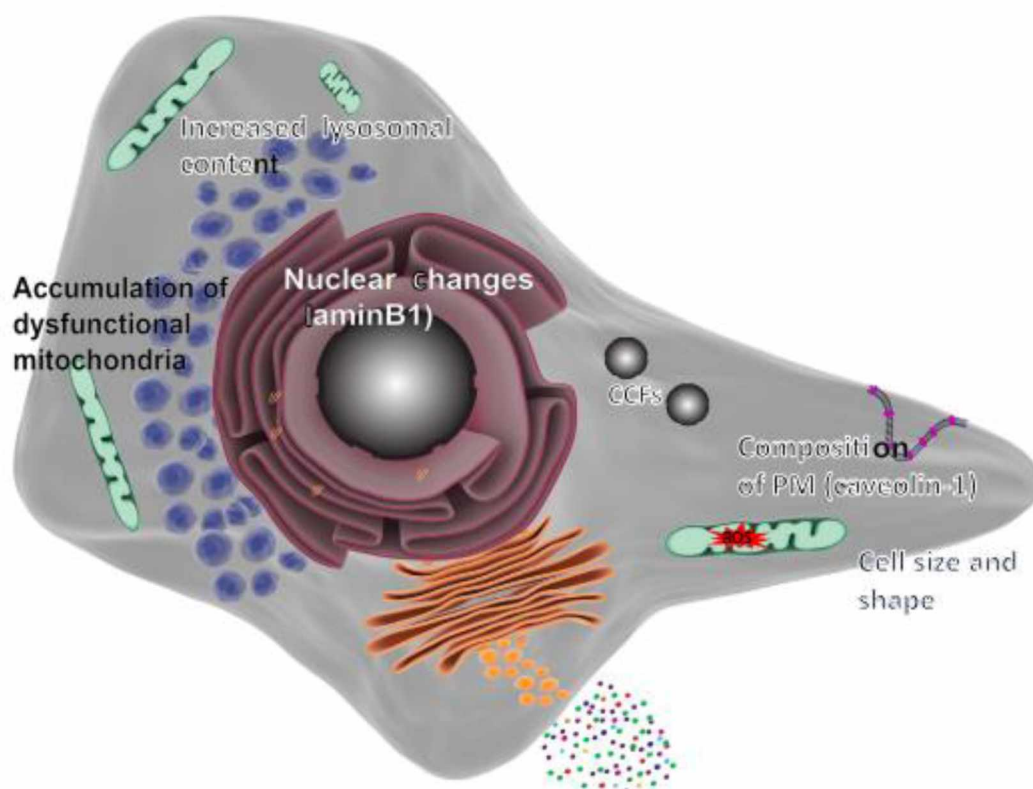
Η κυτταρική γήρανση είναι μία διαδικασία μη αναστρέψιμης διακοπής του κυτταρικού κύκλου -χωρίς όμως αυτό να αποτελεί μοναδικό κριτήριο, με σκοπό τη μη συσσώρευση ελαττωματικής γενετικής πληροφορίας έπειτα από στρες, και την αποφυγή δημιουργίας κακοήθους (καρκινικού) κυττάρου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στην φάση αυτή χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη μορφολογία, αντιστέκονται στην απόπτωση και έχουν αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Η διακοπή του κύκλου συμβαίνει, σε όρους κυτταροκαλλιέργειας, μετά από περίπου 50-60 κύκλους πολλαπλασιασμού (ανάλογα τον τύπο κυττάρων), φτάνοντας στο όριο μέγιστων διαιρέσεων, στο όριο Hayflick, όπου δεν μπορούν να πολλαπλασιάζονται περαιτέρω. Η κυτταρική γήρανση είναι στενά συνδεδεμένη με τη γήρανση του οργανισμού (χωρίς να έχει εξακριβωθεί ο πλήρης μηχανισμός) και με ασθένειες σχετιζόμενες με αυτήν (π.χ. οστεοαρθρίτιδα) (Calcinotto et al., 2019).

Ως διαδικασία, η κυτταρική γήρανση προκύπτει έπειτα από συσσωρευμένη βλάβη, και στόχο έχει την αδρανοποίηση των δυσλειτουργικών γηρασμένων κυττάρων. Συμβαίνει φυσιολογικά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Η αναδιοργάνωση της χρωματίνης σε ετεροχρωματίνη, οι μεταβολικές αλλαγές, η απορρυθμισμένη ενεργότητα αυτοφαγίας και οι προφλεγμονώδεις εκκρίσεις είναι κάποιες από τις αλλαγές που εντοπίζονται στα γηρασμένα κύτταρα (McHugh & Gil, 2018). Παρόλες αυτές τις αλλαγές, η

βιωσιμότητα και η μεταβολική ενεργότητά τους παραμένουν ακέραιες (McHugh & Gil, 2018).

I.B.1. Μορφολογία γηρασμένων κυττάρων

Τα γηρασμένα κύτταρα διαφέρουν μορφολογικά από τα φυσιολογικά, καθώς είναι μεγαλύτερα, πιο πεπλατυσμένα, με πληθώρα λυσοσωμάτων και μιτοχονδρίων και η πλασματική τους μεμβράνη παρουσιάζει διαφοροποιημένη σύνθεση (Εικόνα 3) (Hernandez-Segura et al., 2018).



Εικόνα 3: Η διαφοροποιημένη μορφολογία ενός γηρασμένου κυττάρου (Hernandez-Segura et al., 2018)

Οι αλλαγές στο μέγεθός τους μπορούν να διακριθούν είτε σε μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου είτε σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας ανιχνευτές για τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (π.χ. βιμεντίνη, ακτίνη). Επιπλέον, τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από έλλειψη της λαμίνης B1, ενός βασικού συστατικού του πυρηνικού υμένα (=ειδικής κατηγορίας ενδιάμεσο νημάτιο του πυρήνα). Η ακεραιότητα του πυρήνα επηρεάζεται από την έλλειψη της πρωτεΐνης αυτής, και έχει

ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ελεύθερης χρωματίνης στο κυτταρόπλασμα με την μορφή των CCFs. Τα τελευταία μπορούν να ενεργοποιήσουν τον DDR μηχανισμό σε γειτονικά κύτταρα μέσω της έκκρισής τους (Hernandez-Segura et al., 2018).

Εκτός του ότι είναι μεγαλύτερα σε όγκο, τα κύτταρα στη γήρανση είναι και πιο πεπλατυσμένα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σχηματίζονται ίνες ακτίνης και τα κύτταρα προσκολλούνται ισχυρά στις επιφάνειες, με επακόλουθο να μην μπορούν να μετακινηθούν (Pospelova et al., 2013).

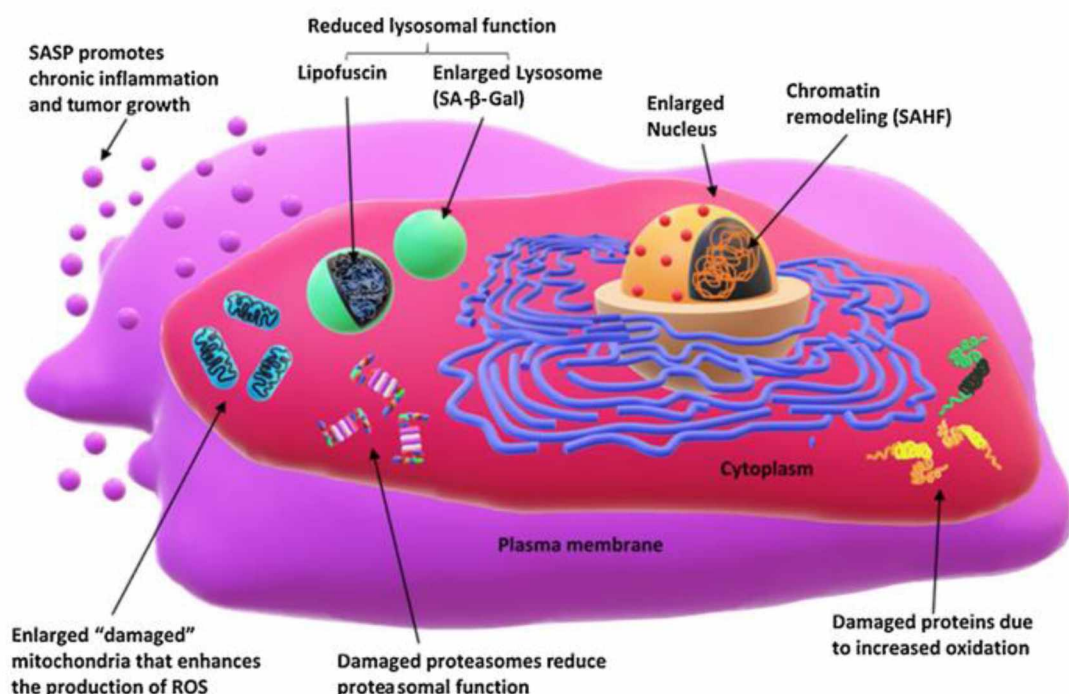
Με την γήρανση τα επίπεδα της λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα επίσης αυξάνονται (von Kobbe, 2018). Η λιποφουσκίνη αποτελεί ένα κίτρινο καστανόχρωμο μόριο από παραπροϊόντα λυσοσωμικής πέψης (κυρίως λιπίδια) (Blasiak, 2020). Τα λυσοσώματα αυξάνονται σε όγκο λόγω μεγάλου λυσοσωματικού περιεχομένου στα γηρασμένα κύτταρα, γεγονός που ανιχνεύεται από τα υψηλά επίπεδα της SA-β-gal (Mohamad Kamal et al., 2020). Η SA-β-gal είναι μία β-γαλακτοζιδάση των κυττάρων που βρίσκονται σε αναδιπλασιαστική ή επαγόμενη γήρανση και η δράση της εντοπίζεται στα λυσοσώματα σε pH 6. Αντίθετα, η φυσιολογική β-γαλακτοζιδάση των κυττάρων που έχουν ακόμα την δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται, δρα σε όξινο pH 4. Ο εντοπισμός της συσχετιζόμενης με την γήρανση β-γαλακτοζιδάσης (SA-β-gal) γίνεται με χρήση χρωμογόνου x-gal (Lee et al., 2006).

Τα μιτοχόνδρια επηρεάζουν κι αυτά τη διαδικασία της γήρανσης. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) από κύτταρα, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες και βλάβες, γεγονότα που επάγουν την κυτταρική γήρανση (Janikiewicz et al., 2018). Στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται αύξηση του μεγέθους και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, και -ως επακόλουθο- αύξηση στα επίπεδα των ROS. Το τελευταίο οδηγεί σε αύξηση της οξείδωσης, που οδηγεί σε κυτταροτοξικές αντιδράσεις, δηλαδή κατεστραμένα μόρια, πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA (Hernandez-Segura et al., 2018). Συγχρόνως, η μιτοφαγία μειώνεται, δηλαδή τα μη λειτουργικά μιτοχόνδρια δεν αυτοφαγώνονται και συσσωρεύονται, επηρεάζοντας μακροπρόθεσμα τις μεταβολικές λειτουργίες του κυττάρου και ως εκ τούτου τον οργανισμό (McHugh & Gil, 2018).

Κατά τη γήρανση, υπάρχουν κι άλλα σημεία μέσα στον πυρήνα με συσσωρευμένη ετεροχρωματίνη απομακρυσμένα από την κύρια εστία. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται SAHF's (=εστίες ετεροχρωματίνης συσχετιζόμενες με τη γήρανση), είναι σιωπηλές και

δεν εκφράζονται. Η ανίχνευσή τους γίνεται με χρήση χρωστικών για ιστόνες και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Στο μικροσκόπιο βρίσκονται διασκορπισμένες σε όλο το πεδίο και όχι σε μία κύρια περιοχή (Mohamad Kamal et al., 2020).

Τέλος, πέρα από τους σημαντικούς δείκτες της διαδικασίας που θα αναλυθούν παρακάτω, τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν πληθώρα πρωτεασών (π.χ. μεταλλοπρωτεάσες -MMPs), αυξητικών και φλεγμονωδών παραγόντων και κυτοκινών. Συνολικά, οι εκκρινόμενοι από τα γηρασμένα κύτταρα παράγοντες αποτελούν το SASP (=εκκριτικός φαινότυπος συσχετιζόμενος με τη γήρανση) (Mohamad Kamal et al., 2020). Οι κύριοι ρυθμιστές του SASP σε μεταγραφικό επίπεδο είναι οι C/EBP-β (=CCAAT/πρωτεΐνη β συνδεδεμένη με τον ενισχυτή), NF-κB και mTOR (μέσω ελέγχου της IL-1α). Οι πλέον χαρακτηριστικοί από τους εκκρινόμενους παράγοντες του SASP είναι οι IL-8, GROα, IL-6, και IGBP-7 (McHugh & Gil, 2018). Τα εκκρινόμενα αυτά μόρια μπορεί να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον των γηρασμένων ιστών και μπορούν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργίες ή και ασθένειες (von Kobbe, 2018).



Εικόνα 4: Σύσταση γηρασμένου κυττάρου και βασικά χαρακτηριστικά του (Mohamad Kamal et al., 2020)

I.B.2. Μοριακοί δείκτες γηρασμένου κυττάρου

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο πιο χαρακτηριστικός βιοδείκτης των γηρασμένων κυττάρων είναι η SA-β-gal. Η SA-β-gal είναι χαρακτηριστική στη γήρανση (Bernadotte et al., 2016) και η δράση της εντοπίζεται λόγω αυξημένης λυσοσωμικής δραστηριότητας σε pH 6, καθώς και της αύξησης στον αριθμό των ίδιων των οργανιδίων σε γηρασμένα κύτταρα. Είναι αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου *glb1* που κωδικοποιεί την β-γαλακτοζιδάση, το λυσοσωμικό ένζυμο των κυττάρων που διασπά την β-γαλακτόζη και δρα σε pH 4 σε φυσιολογικά νεαρά κύτταρα (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Η ιστόνη γ-H2AX είναι ένας δείκτης που χαρακτηρίζει τα κύτταρα στη γήρανση, ο οποίος όμως δεν αρκεί μόνος του. Πρόκειται για την ιστόνη H2AX η οποία είναι φωσφορυλιωμένη στην Σερίνη 139 του καρβοξυτελικού της άκρου. Η γ-H2AX εντοπίζεται κυρίως στα DSBs (=θραύσεις και των δύο αλυσίδων DNA) -οι οποίες αυξάνονται κατά τη γήρανση των κυττάρων λόγω και της αύξησης των ROS (Dodig et al., 2019). Σε αυτήν την περίπτωση, η γ-H2AX σημαίνει τα DSBs για περίπου 24 ώρες, με σκοπό να επιδιορθωθούν οι βλάβες αυτές και η ιστόνη τελικά να εξαφανιστεί (Goutas et al., 2020).

Όπως στην περίπτωση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ-H2AX, έτσι και αναφορικά με την πρωτεΐνη p53, ο οργανισμός προσπαθώντας να ανταποκριθεί σε βλάβες ενεργοποιεί τα μονοπάτια DDR (= απάντηση σε DNA βλάβες). Δίνοντας το σήμα για ενεργοποίηση του μονοπατιού ATM/ATR, ακολουθεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της p53, η οποία εντοπίζει ελλατωματικές περιοχές στο DNA -με τη βοήθεια της γ-H2AX. Για να λάβουν χώρα τα γεγονότα αυτού του βιοχημικού μονοπατιού, το κύτταρο έχει σταματήσει τον κυτταρικό του κύκλο όσο οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες προσπαθούν να επιδιορθώσουν τις βλάβες. Στην περίπτωση που αυτές οι βλάβες δεν επιδιορθωθούν, το κύτταρο μπαίνει στη φάση της γήρανσης που χαρακτηρίζεται κι από την υπερέκφρασή της πρωτεΐνης p53 (Pospelova et al., 2013).

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 επάγει την έκφραση του p21, αναστολέα του κυτταρικού κύκλου μέσω του ίδιου μονοπατιού p53/ p21, γεγονός που τον καθιστά κεντρικό βιοδείκτη της κυτταρικής γήρανσης (Dodig et al., 2019).

Τέλος, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού p16/Rb (Rb: πρωτεΐνη του ρετινοβλαστόμαστος) λόγω βλαβών στο DNA, ενεργοποιείται η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p16, ένας ακόμα αναστολέας του κυτταρικού κύκλου, που αναστέλλει σύμπλοκα κινασών-κυκλινών (cdk-cyclins), όπως και η p21, και αυτό την καθιστά έναν ακόμη μοριακό δείκτη της κυτταρικής γήρανσης (Wang & Dreesen, 2018).

I.B.3. Είδη κυτταρικής γήρανσης

Η κυτταρική γήρανση διακρίνεται σε δύο βασικού τύπους, την αναδιπλασιαστική γήρανση (Replicative Senescence -RS) και την επαγόμενη από στρες γήρανση (stress-induced premature senescence -SIPS) (Ben-Porath & Weinberg, 2005).

Η αναδιπλασιαστική γήρανση προκύπτει έπειτα από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό λόγω βράχυνσης των τελομερικών άκρων των χρωμοσωμάτων μετά από κάθε κύκλο διαίρεσης (von Kobbe, 2018). Τα τελομερή, που αποτελούνται από επαναλήψεις της εξαμελής αλληλουχίας 5'-TTAGGG-3', προσφέρουν προστασία στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Giardini et al., 2014). Τα τελομερή, λόγω του τρόπου λειτουργίας της DNA πολυμεράσης, χάνουν περίπου 50-200 βάσεις σε κάθε κύκλο- το οποίο αποτελεί το end replication problem- και έτσι, έπειτα από περίπου 40-60 διαιρέσεις, φθάνουν σε ένα κρίσιμο μήκος που προσδίδει μια αστάθεια στο γενετικό υλικό και που αν συνεχιστεί θα έχει κακοήθεις συνέπειες. Το όριο αυτό των διαιρέσεων που επιτρέπεται να κάνουν ονομάζεται Hayflick όριο, καθώς ήταν ο πρώτος στην δεκαετία του 1960 που το παρατήρησε και το εντόπισε σε καλλιέργειες φυσιολογικών ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Ωστόσο, υπάρχουν κύτταρα στα οποία αυτό μπορεί να αποφευχθεί. Τα βλαστοκύτταρα αλλά και τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ' άπειρον λόγω της παρουσίας μιας αντίστροφης μεταγραφάσης, της τελομεράσης, η οποία απουσιάζει από τα φυσιολογικά κύτταρα. Ο ρόλος της είναι να επιμηκύνει τα τελομερικά άκρα ώστε να μην υπάρχει βράχυνση και να μην προκύπτει ως εκ τούτου η αναδιπλασιαστική γήρανση (Bernardes de Jesus & Blasco, 2013).

Το δεύτερο είδος γήρανσης προκύπτει έπειτα από στρεσογόνο ερέθισμα και ονομάζεται SIPS. Τέτοιο ερέθισμα μπορεί να είναι το οξειδωτικό στρες, η ακτινοβολία ή η υπερέκφραση ενός ογκογονιδίου (π.χ. *Ras*) (OIPS) (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Μια βασική πηγή οξειδωτικού στρες είναι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS),

όπως αναλύθηκε παραπάνω, που παράγονται κυρίως από τα μιτοχόνδρια κατά τον μεταβολισμό του οξυγόνου. Μεγάλες ποσότητες ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, στον πολλαπλασιασμό και την γονιδιακή έκφραση. Στην περίπτωση υπερέκφρασης ενός ογκογόνου γονιδίου, τα κύτταρα σταματάνε να πολλαπλασιάζονται και εισάγονται σε κατάσταση γήρανσης (μέσω p53 και p16) πριν να συμβεί βράχυνση των τελομερικών άκρων (Dodig et al., 2019; Rattan, 2016).

Αν και η RS και η SIPS διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αιτιολογικό παράγοντα, παρουσιάζουν ομοιότητες στο βιοχημικό μονοπάτι που οδηγεί στην κατάσταση γήρανσης. Η απάντηση του οργανισμού στα μικρότερα τελομερή, το «χάσιμο» της πληροφορίας και τα στρεσογόνα ερεθίσματα οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού ATM/ATR με τους ρυθμιστές p56, p21 και Rb, που σταματάνε τον κυτταρικό κύκλο στα G1/S και G2/M σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints), με σκοπό να επιδιορθωθούν οι βλάβες. Εφόσον η επιδιόρθωση των βλαβών δεν είναι δυνατή και προκειμένου να μην κληρονομηθούν στην επόμενη γενιά κυττάρων, καθώς και για να αποφευχθεί η ανάπτυξη κακοήθειας, τα κύτταρα μπαίνουν σε φάση γήρανσης (Ben-Porath & Weinberg, 2005; von Kobbe, 2018).

I.B.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν γήρανση

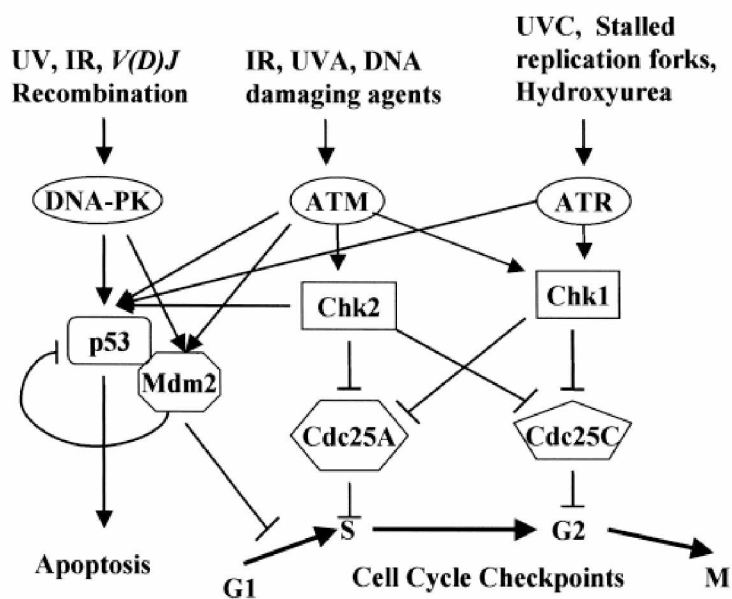
Καθώς συσσωρεύονται οι βλάβες στο γενετικό υλικό του κυττάρου, κι αφού ανιχνευτούν τα DSBs, το κύτταρο δίνει εντολή να ενεργοποιηθεί ο DDR μηχανισμός (=DNA-Damage Response), με σκοπό να ανασταλεί ο κυτταρικός κύκλος και να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός. Τα δύο ογκοκατασταλτικά επί της ουσίας μονοπάτια που όπως ήδη αναφέρθηκε ενεργοποιούνται είναι το μονοπάτι p53/p21 και το p16/Rb (Hernandez-Segura et al., 2018; Olivieri et al., 2015).

I.B.4.i. Μονοπάτι p53/p21

Οι βλάβες εντοπίζονται μέσω της γ -H2Ax, η οποία και φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες ATM και ATR που δεσμεύονται στις περιοχές με βλάβες του DNA (Hernandez-Segura et al., 2018). Οι παραπάνω κινάσες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις κινάσες σημείου ελέγχου (chk= checkpoint kinases) CHK2 και CHK1

αντίστοιχα (McHugh & Gil, 2018). Στην συνέχεια, οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν αντίστοιχα την πρωτεΐνη p53, η οποία και ενεργοποιείται, και την φωσφατάση cdc25c, η οποία και αποικοδομείται. Έτσι, η τελευταία, δεν μπορεί να αποφωσφορυλιώσει τις κυκλοεξαρτώμενες κινάσες cdk2 και cdk1 (=cyclin dependent kinase) και έτσι προκύπτει διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1/S και G2 αντίστοιχα. Η ενεργοποιημένη p53 από την άλλη, επάγει την έκφραση του p21, αναστολέα της κυτταρικής διαίρεσης και των cdk κυκλοεξαρτώμενων κινασών (=CDKI), καθώς καταστέλλει το σύμπλοκο cdk2/cyclin E, που φυσιολογικά δρα στην φάση G1, οπότε ο κύκλος σταματάει σε αυτήν (Yang et al., 2003).

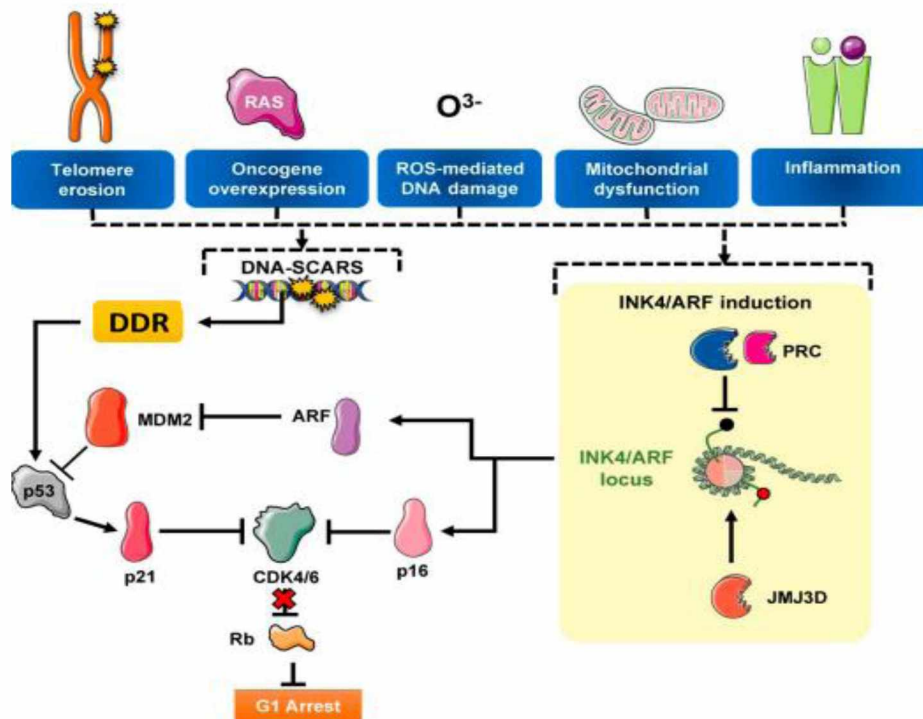
Ένας άλλος παράγοντας που συμμετέχει στην αύξηση της πρωτεΐνης p53 είναι η πρωτεΐνη ARF, κωδικοποιημένη από τον γονίδιο *INK4/ARF*, η οποία καταστέλλει τη λειτουργία της E3 λιγάσης mdm2, που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ουβικουιτινώνει την p53 και θα την οδηγεί για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Με την καταστολή της λιγάσης λοιπόν, έχουμε αυτή τη συνεχόμενη επαγωγή έκφρασης της p53 (εικόνα 5) (McHugh & Gil, 2018).



Εικόνα 5: Σηματοδοτικά μονοπάτια των ATM και ATR έπειτα από βλάβη στο DNA (Yang et al., 2003)

I.B.4.ii. Μονοπάτι p16/Rb

Το δεύτερο ογκοκατασταλτικό μονοπάτι που αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου είναι αυτό στο οποίο μεσολαβούν η πρωτεΐνη αναστολέας CDKI p16^{INK4a} και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb (Mohamad Kamal et al., 2020). Η πρώτη (CDKN2A ή INK4a αλλιώς) ανήκει στον γενετικό τόπο INK4a/ARF -του κύριου ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN2A* και είναι χαρακτηριστικός βιοδείκτης της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, αφού τα επίπεδα της είναι υψηλά στην γήρανση, όπως αναφερθήκαμε πιο πάνω. Αποτελεί αναστολέα (CDKI) των κυκλοεξαρτώμενων κινασών *cdk4* και *cdk6*, γεγονός που σημαίνει ότι το κύτταρο σταματάει στην G1 φάση του κύκλου (McHugh & Gil, 2018; Rattan, 2016). Όσο αφορά στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb, πρόκειται για μια πρωτεΐνη 928 αμινοξέων που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rb1* και εκφράζεται σταθερά στον πυρήνα. Μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη Rb να χάσει τη λειτουργικότητά της και να προκύψει καρκίνος του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού (ρετινοβλάστωμα). Φυσιολογικά, σε έναν κυτταρικό κύκλο, υπερφωσφορυλιώνεται από τις *cdks* (μπορεί να λάβει μέχρι και 4 φωσφορικές ομάδες, όσες περισσότερες τόσο μεγαλύτερη απενεργοποίησή της), ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα E2F που προσδέεται σε αλληλουχίες υποκινητών, ενεργοποιούνται περαιτέρω *cdks* και το κύτταρο μπαίνει στη φάση αντιγραφής του γενετικού του υλικού, δηλαδή περνάει από την φάση G1 στην φάση S (Dimaras et al., 2015; Harbour et al., 2000). Στη γήρανση συναντάται η μη φωσφορυλιωμένη της μορφή (που αποτελεί και βιοδείκτη της), η οποία δεν μπορεί να απενεργοποιήσει τον παράγοντα E2F, ο οποίος πλέον δεν μπορεί να επάγει την μεταγραφή γονιδίων σημαντικών για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διαίρεσης του κυττάρου (εικόνα 6) (Rattan, 2016).



Εικόνα 6: Τα μονοπάτια $p16^{\text{INK4a}}/\text{Rb}$ και $p53/p21$ που οδηγούν σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και είσοδο του κυττάρου στην κυτταρική γήρανση (McHugh & Gil, 2018).

1.Γ. Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε φάσεις. Αρχικά είναι η G1 όπου λαμβάνει χώρα η αύξηση του κυττάρου, ακολουθεί η S όπου γίνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού, δηλαδή η σύνθεση νέου DNA, έπειτα η G2 που προετοιμάζει το κύτταρο για την μίτωση και τέλος η μίτωση (M) που οδηγεί στην κυτταροκίνηση, δηλαδή την διαίρεση του μητρικού κυττάρου σε δύο επιμέρους θυγατρικά. (Molecular Biology of the Cell, Chapter.19, Alberts et al. 2014).

Κυρίαρχο ρόλο στην εναλλαγή φάσεων και τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης παίζουν οι κυκλίνες και οι cdk's κινάσες (=κυκλοεξαρτώμενες κινάσες σερίνης/θρεονίνης) -απαραίτητες για την ενζυμική ενεργότητα των κυκλινών- οι οποίες πραγματοποιούν μία σειρά από φωσφορυλιώσεις αντίστοιχων μορίων σε κάθε στάδιο (Malumbres, 2014). Οι κυκλίνες παίρνουν το όνομά τους από το συγκεκριμένο στάδιο του κύκλου στο οποίο δρουν. Για παράδειγμα, υπάρχουν οι κυκλίνες της G1 φάσης,

της G1/ S, της S και της M. Τα κύτταρα συνθέτουν και αποικοδομούν τις κυκλίνες αυτές σύμφωνα με τις ανάγκες της κάθε φάσης και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Hochegger et al., 2008).

I.Γ.1. Μίτωση

Από το στάδιο του διπλασιασμού του γενετικού υλικού και της δημιουργίας αδελφών χρωματίδων (που είναι ενωμένες μεταξύ τους με κοεζίνες), μέχρι την πλήρη διαίρεση του κυττάρου (κυτταροκίνηση), μεσολαβεί η φάση της μίτωσης. Η τελευταία ξεκινάει με το στάδιο της πρόφασης, ακολουθεί η δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου κατά την προμετάφαση, έπειτα η μετάφαση με το πλήρες συμπυκνωμένο γενετικό υλικό, η ανάφαση με τον ισόποσο και ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, και τέλος η τελόφαση με τη δημιουργία των 2 νέων πυρήνων (Mcintosh, n.d.).

Στην μετάβαση από το στάδιο της αντιγραφής στην μίτωση, σημαντικό ρόλο παίζει το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdk1. Το σύμπλοκο αυτό υπάρχει ήδη από τη φάση G2 στο κυτταρόπλασμα και τα κεντροσώματα, αλλά είναι ανενεργό. Η ανενεργή του κατάσταση οφείλεται στο γεγονός ότι είναι φωσφορυλιωμένο στα αμινοξικά κατάλοιπα Thr14 και Tyr15 από την κινάση Wee1. Με την είσοδο του κυττάρου στην μίτωση, το σύμπλοκο κυκλίνη B-cdk1 αποφωσφορυλιώνεται μέσω της cdc25 φωσφατάσης και ενεργοποιείται. Το ενεργό πλέον σύμπλοκο μπαίνει στον πυρήνα και συμμετέχει ενεργά στις δομικές αλλαγές που υφίσταται το κύτταρο κατά τη μετάφαση, όπως είναι η αποικοδόμηση του πυρηνικού φακέλου, η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και η δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου (Hochegger et al., 2008).

Η μιτωτική άτρακτος, η σημαντικότερη δομή της μίτωσης, αποτελείται από μικροσωληνίσκους που απορρέουν από τα 2 κεντροσώματα που έχουν σχηματιστεί στους δύο αντίθετους πόλους της. Ο ρόλος της είναι να προσανατολίσει και να διατάξει σωστά τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα στον ισημερινό της. Οι μικροσωληνίσκοι σταθεροποιούνται όταν τελικά ενωθούν με τους κινητοχώρους της κάθε αδελφής χρωματίδας και, με την δυναμική που αναπτύσσεται, τις διαχωρίζει -σπάζοντας τις δομές κοχεζίνης. Το ένα αντίγραφο κάθε χρωμοσώματος μεταναστεύει έπειτα -μέσω ελκτικών δυνάμεων προερχόμενων από τα κεντροσώματα- προς τον αντίθετο πόλο. Εκεί, κατά την κυτταροκίνηση, τα διαχωρισμένα χρωμοσώματα καταλήγουν στο νέο (θυγατρικό) κύτταρο (Mcintosh, n.d.).

Για να αποφευχθούν τυχόν λάθη κατά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στο στάδιο της μετάφασης-ανάφασης, το κύτταρο έχει έναν μηχανισμό ελέγχου κατά τη μίτωση, το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου, SAC (=spindle assembly checkpoint). Το SAC κάνει όλους τους απαραίτητους ελέγχους που χρειάζονται με σκοπό τα χρωμοσώματα να χωριστούν σωστά και να περάσει το κύτταρο στο στάδιο της ανάφασης. Με άλλα λόγια, τα χρωμοσώματα πρέπει να έχουν ενωθεί σωστά, μέσω των κινητοχώρων των κεντρομεριδίων τους, με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου, με σκοπό να διαχωριστούν σωστά προς τους αντίθετους πόλους και να δημιουργηθούν εντέλει τα δύο θυγατρικά κύτταρα με τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων (Marston & Wassmann, 2017).

I.Γ.2. Ρόλος των κινητοχώρων

Οι κινητοχώροι βρίσκονται στην περιοχή των κεντρομεριδίων στα χρωμοσώματα στη φάση της μίτωσης (κάθε αδελφή χρωματίδα έχει 1 κινητοχώρο) και αποτελούνται από πολυάριθμες πρωτεΐνες (περίπου 30 συντηρημένες κατά την εξέλιξη) που βοηθάνε στην σύνδεση του DNA με τον κυτταροσκελετό (Musacchio, 2011). Είναι δομές πολύ σημαντικές για τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς ο κινητοχώρος από κάθε αδελφή χρωματίδα ενώνεται απευθείας με τους πολικούς μικροσωληνίσκους (νημάτια), με σκοπό να διαταχθούν και να προσανατολιστούν τα χρωμοσώματα σωστά στον ισημερινό της ατράκτου. Έχει βρεθεί ότι στα ανθρώπινα κύτταρα κάθε κινητοχώρος μπορεί να ενωθεί με περίπου 17 μικροσωληνίσκους. Στην ευθυγράμμιση και τη σωστή ένωση των νηματίων με την περιοχή, σημαντικό ρόλο παίζουν η δυνεΐνη και η κεντρομερική πρωτεΐνη 3 (CENP-3). Πέρα όμως από αυτά τα δύο μόρια, εξίσου σημαντικά είναι και η Aurora B κινάση, η φωσφατάση 2A (PP2A), το σύμπλοκο αστρίνης-SKAP και η Skal για την τελική σωστή και ισχυρή σύνδεση που θα αντέξει τις δυνάμεις έλξης των νηματίων (Monda & Cheeseman, 2018).

I.Γ.3. Ρόλος των κεντροσωμάτων

Το κεντροσωμάτιο είναι υπεύθυνο για την οργάνωση των μικροσωληνίσκων (primary microtubule organizing centre=MTOC) και είναι το οργανίδιο που δημιουργεί την μιτωτική άτρακτο. Είναι πολωμένο και αποτελείται από δύο κεντριόλια, ένα από τον προηγούμενο κυτταρικό κύκλο (mother centriole) και ένα από την S φάση του ίδιου κύκλου (daughter centriole). Με την είσοδο του κυττάρου στην φάση αντιγραφής (S

φάση), το κεντρόσωμα διπλασιάζεται (απαραίτητα μία μόνο φορά σε κάθε κύκλο) και τα δύο νέα κεντροσώματα καθοδηγούν την δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου (Fukasawa, 2005). Η διαδικασία ξεκινάει με την προέκταση των θετικών (+) άκρων των μικροσωληνίσκων από τους πόλους, με τη βοήθεια της γ-τουμπουλίνης και της δυνείνης. Η γ-τουμπουλίνη συντονίζεται μέσω κινασών, όπως την Aurora A. Η συγκρότηση όλων αυτών αποτελεί το microtubule nucleation, το οποίο ακολουθείται από την μετακίνηση των κεντροσωμάτων στους δύο αντίθετους πόλους για να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου (Bose & Dalal, 2019).

Τα κεντροσώματα βρίσκονται υπό συχνό κυτταρικό έλεγχο, που αν χαθεί, τότε έχει σαν αποτέλεσμα δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες. Οι πρώτες αναφέρονται σε λάθη στη μορφολογία (σχήμα, μέγεθος) αυτών, ενώ οι δεύτερες στον αυξημένο αριθμό τους, γεγονός που αναφέρεται ως centrosome amplification (Bose & Dalal, 2019). Τα υπεράριθμα κεντροσώματα οδηγούν σε χρωμοσωμική αστάθεια και πολλές φορές σε ανευπλοειδία, που μπορεί να έχει και κακοήγη κατάληξη (Cosenza & Krämer, 2016). Τέλος, με τα περισσότερα κεντροσώματα, δημιουργούνται περισσότερες κατευθύνσεις που μπορούν να «τραβηχτούν» τα χρωμοσώματα, άρα και περισσότεροι των 2 πυρήνες (Chae et al., 2005).

1.Γ.3.ι. Υπεράριθμα κεντροσώματα και γήρανση

Από προηγούμενες έρευνες της ομάδας του εργαστηρίου, έχειδειχθεί ότι κύτταρα που υπέστησαν οξειδωτικό στρες (μέσω επιδράσεων με υπεροξειδίο του αζώτου, H₂O₂) και οδηγήθηκαν σε γήρανση, καθώς και φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, είχαν υπεράριθμα κεντροσώματα, γεγονός που συνδέει την κυτταρική γήρανση με το φαινόμενο centrosome amplification (Ohshima, 2012). Αυτό μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολυπυρηνικών κυττάρων (Chae et al., 2005). Σε μοριακό επίπεδο φαίνεται πως η μειωμένη έκφραση της Gadd45a σχετίζεται με την εμφάνιση υπεράριθμων κεντροσωμάτων (Armandis et al., 2018; Shao et al., 2006). Τέλος, φαίνεται πως, πέραν του ότι τα γηρασμένα κύτταρα τείνουν να έχουν πολυάριθμα κεντροσώματα, το φαινόμενο αυτό λειτουργεί και αντίστροφα, αφού το centrosome amplification μπορεί εντέλει να διακόψει τον κυτταρικό κύκλο μέσω του p53 και να προάγει τη γήρανση (Armandis et al., 2018)

I.Γ.4. APC/C μηχανισμός στη φυσιολογική ροή του κυτταρικού κύκλου, μονοπάτι σεκιουρίνης-σεπαράσης-κοεζίνης

Αν γίνουν όλα σωστά και τα χρωμοσώματα διαταχθούν όπως πρέπει με τους μικροσωληνίσκους σωστά ενωμένους στους κινητοχώρους, τότε γίνεται κανονικά η μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση μέσω του μηχανισμού APC/C (=anaphase promoting complex, or cyclosome). Το σύμπλοκο APC/C αποτελείται από 2 υπομονάδες E₃ λιγάσης, την Apc2 και την Apc11, οι οποίες ουβικουιτινώνουν και οδηγούν προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα την κυκλίνη B₁ (που είναι ενωμένη με την cdk1 κατά τη μίτωση) και την σεκιουρίνη. Η σεκιουρίνη είναι μία πρωτεΐνη της οποίας ο ρόλος είναι να ενωθεί και να αναστέλλει την πρωτεάση σεπαράση η οποία σπάει την Scc1 -κύριο συστατικό της κοεζίνης που κρατάει σφιχτά τις αδελφές χρωματίδες μεταξύ τους. Συνεπώς, με την αποδόμηση της σεκιουρίνης, η σεπαράση μπορεί να λειτουργήσει και να προχωρήσει στον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (Lara-Gonzalez et al., 2012).

I.Γ.5. Σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC= spindle assembly checkpoint)

I.Γ.5.i. Στρατολόγηση πρωτεϊνών του SAC, δημιουργία MCC συμπλόκου και αναστολή λειτουργίας APC/C-cdc20

Αν οι μικροσωληνίσκοι παρόλα αυτά δεν έχουν συνδεθεί καθόλου ή έχουν συνδεθεί λανθασμένα στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων, τότε ενεργοποιείται το SAC που θα αποτρέψει το κύτταρο να περάσει στην ανάφαση, μη επιτρέποντας έτσι τις αδελφές χρωματίδες να διαχωριστούν (Musacchio, 2015). Χωρίς το σημείο αυτό ελέγχου, τα κύτταρα θα περνούσαν πρόωρα στην ανάφαση. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να έχει καταστροφική για τον οργανισμό κατάληξη (Musacchio, 2011).

Κύριος ρυθμιστής του SAC είναι το MCC το οποίο αναστέλλει τον μηχανισμό APC/C-cdc20 και το κύτταρο σταματάει στην μίτωση. Οι πρωτεΐνες του MCC στρατολογούνται στην εξωτερική μεριά των κινητοχώρων, στην επονομαζόμενη KMN περιοχή τους (Lara-Gonzalez et al., 2012).

Η περιοχή KMN αποτελείται από 3 σύμπλοκα, το Knl1, το Mis12 που συντονίζει και τα 3 μαζί και το Ndc80 που ενώνεται με τον κυτταροσκελετό (Corbett, 2017). Το Knl1

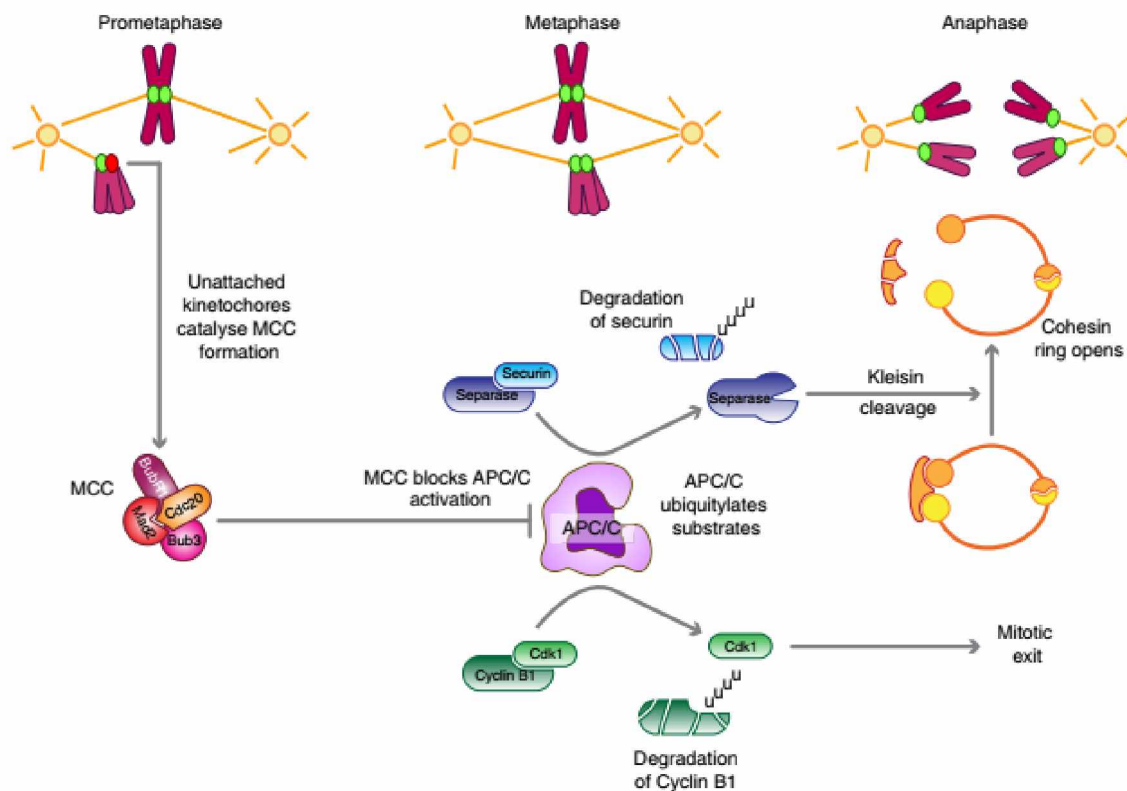
είναι αυτό που φωσφορυλιώνεται πρώτο από την κινάση Mps1 στις περιοχές MELT, δηλαδή σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από το επαναλαμβανόμενο μοτίβο αμινοξικών καταλοίπων Μεθειονίνη-Γλουταμικό οξύ-Λευκίνη-Θρεονίνη (Met-Glu-Leu-Thr). Η κινάση Mps1 είναι το κύριο μόριο του SAC που ξεκινάει την διαδικασία συνάθροισης των πρωτεϊνών στην KMN περιοχή και η ένταξή της στους κινητοχώρους επάγεται μέσω της πρωτεΐνης Aurora B. Η τελευταία είναι μία κινάση Σερίνης/Θρεονίνης στην περιοχή των κεντρομεριδίων που φωσφορυλιώνει εσωτερικές και εξωτερικές πρωτεΐνες αυτών, όπως την κεντρομερική πρωτεΐνη A (CENP-A) και τα μόρια της KMN περιοχής αντίστοιχα (Musacchio, 2015). Η δράση της Aurora B είναι ισχυρή μέχρι να γίνει η ένωση των κινητοχώρων με τους μικροσωληνίσκους, και όταν αυτό επιτευχθεί, η ενεργότητά της καταστέλλεται (Corbett, 2017). Ωστόσο, δεν εντοπίζεται μόνο σε αυτό το στάδιο του κυτταρικού κύκλου, καθώς συμμετέχει και στην συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και στην κυτταροκίνηση (Marston & Wassmann, 2017).

Οι Bub1 και Bub3 είναι οι πρώτες που προσδένονται στους κινητοχώρους μετά τη φωσφορυλίωση του Knl1. Κύριος σκοπός της Bub1 είναι να «τραβήξει» τις BubR1 και cdc20 στην περιοχή των μη προσδεδεμένων με τον κυτταροσκελετό κινητοχώρους (Marston & Wassmann, 2017). Ακολουθεί η φωσφορυλίωση της Bub1 που κάνει τις Mad1 και C-Mad2 να προσδεθούν επίσης στους κινητοχώρους, μέχρι να φωσφορυλιωθεί εντέλει και η Mad1 και να δημιουργήσει σύμπλοκο με την cdc20 (Corbett, 2017). Η Mad2 υιοθετεί 2 μορφές, την ανοιχτή O-Mad2 που βρίσκεται διαλυμένη στο κυτταρόπλασμα, και την κλειστή C-Mad2 στην οποία υπάρχει μία δομική αλλαγή (safety belt) που επιτρέπει την πρόσδεση της με την Mad1 και το cdc20 στα σημεία MIMs (=Mad2-interacting motifs) της Mad2 (Bokros & Wang, 2016; Musacchio, 2015). Οι ονομασίες των κύριων πρωτεϊνών δεν είναι τυχαίες, καθώς τα αρχικά του mad προέρχονται από το «mitotic arrest deficient» και του bub από το «budding uninhibited by benzimidazole» (Lara-Gonzalez et al., 2012).

Όλα τα προαναφερόμενα αποτελούν το σύμπλοκο MCC, του οποίου ο ρόλος είναι να αποτρέψει την αποικοδόμηση της κυκλίνης B και της σεκιουρίνης από το πρωτεάσωμα, ώστε τα κύτταρα να μείνουν για όσο χρόνο χρειαστεί σε μιτωτικό έλεγχο (Musacchio, 2011). Οι πρωτεΐνες του MCC σταθεροποιούνται ακόμα παραπάνω με την BubR1, ομόλογη της Mad3 που βρίσκεται στους μύκητες, και μέσω αυτής απενεργοποιείται η

δράση του APC/C-cdc20. Παρ' όλη λοιπόν την ενεργή συμμετοχή όλων αυτών των μορίων, φαίνεται ότι το Mad2 είναι αυτό που αποτελεί την κινητήρια δύναμη να αλληλεπιδράσει η BubR1 με το cdc20, να δημιουργηθεί σύμπλοκο MCC-APC/C-cdc20, να ανασταλεί η δράση του APC/C-cdc20 και να ενεργοποιηθεί το SAC (εικόνα 7) (Lara-Gonzalez et al., 2012). Συγκεκριμένα, μετά την σύνδεση των Mad2-cdc20 μέσω των MIMs φαίνεται ότι προκύπτει σύνδεση της διμερικής Mad2 με την BubR1. Η αλληλεπίδραση αυτή αποκαλύπτει την συντηρημένη περιοχή KEN του αμινοτελικού άκρου της BubR1, μέσω της οποίας ενώνεται με το cdc20. Μόλις το σύμπλοκο αυτό σχηματιστεί, τότε η Mad2 μπορεί να αποδεσμευτεί από το MCC (Lischetti & Nilsson, 2015).

Έχει παρατηρηθεί ότι όταν το σημείο ελέγχου δεν ενεργοποιείται, η έκφραση της κυκλίνης B1 και της σκειουρίνης είναι χαμηλές κατά την μεσόφαση της G2, γεγονός που σημαίνει ότι το APC/C είναι ενεργό από εκείνη κιάλας την φάση (Musacchio, 2015).



Εικόνα 7: Μονοπάτια λειτουργίας της σηματοδότησης SAC από το στάδιο της προμετάφασης της μίτωσης μέχρι το στάδιο της ανάφασης (Lara-Gonzalez et al., 2012)

I.Γ.5.ii. Αποσιώπηση του SAC

Η αποσιώπηση του SAC ακολουθείται από πολλές δομικές αλλαγές στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων, όπως απομάκρυνση των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για αυτό το σημείο ελέγχου. Οι αλλαγές αυτές προκύπτουν από μία σειρά γεγονότων. Ενεργό ρόλο παίζει η φωσφατάση 1 (PP1) η οποία προσδένεται σε ειδική θέση στην KNL1 και στοχεύοντας την φωσφορυλιωμένη -από την κινάση Mps1- περιοχή MELT της KNL1, την αποφωσφορυλιώνει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες Bub1 και BubR1 από τους κινητοχώρους (Lischetti & Nilsson, 2015). Η απομάκρυνση αυτή μπορεί να επιτευχθεί επίσης και αφού οι μικροσωληνίσκοι ενωθούν με το Ndc80, η δράση της κινάσης Mps1 κατασταλεί και οι Mps1 και Ndc80 δεν αλληλεπιδρούν πλέον.

Η αποφωσφορυλίωση της Knl1 απομακρύνει επίσης την Bub3 και το MCC σταματάει πλέον να δημιουργείται. Το τελευταίο συμβαίνει με την απομάκρυνση του C-Mad2 και μπορεί να προκύψει είτε με την ουβικουΐτινωση και αποικοδόμηση της cdc20^{MCC} από το APC/C, είτε μέσω του p31^{comet} που απομακρύνει την C-Mad2 από την BubR1 και την απελευθερώνει στην ανοιχτή της μορφή ως O-Mad2 (Corbett, 2017; Lischetti & Nilsson, 2015; Musacchio, 2011).

I.Γ.5.iii. SAC και κυτταρική γήρανση

Οι πρωτεΐνες που πλαισιώνουν το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου SAC είναι πολύ σημαντικές για τη σωστή λειτουργία του. Έχειδειχθεί ότι καθώς τα κύτταρα «γερνάνε», η λειτουργικότητα του μηχανισμού αυτού αρχίζει και εξασθενεί (D. J. Baker et al., 2005; Ma et al., 2005). Συγκεκριμένα, σε μεγάλης ηλικίας ωκύτταρα γουρουνιού έχει παρατηρηθεί σταδιακή μείωση της Mad2, αρκετά μεγάλης σημαντικότητας πρωτεΐνη του SAC (Ma et al., 2005). Η πρωτεΐνη BubR1 επίσης έχει βρεθεί να έχει μειωμένη έκφραση σε πεπερασμένα στάδια εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικών, σε αντίθεση με την Bub3 που φαίνεται να αυξάνει (D. J. Baker et al., 2004). Επιπλέον, στα ίδια κύτταρα, επαγόμενη μείωση της BubR1 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ανευπλοειδία και κυτταρικά μορφολογικά χαρακτηριστικά συσχετιζόμενα με πρόωρη κυτταρική γήρανση (π.χ. μειωμένος χρόνος ζωής, μυϊκή ατροφία) (D. J. Baker et al., 2004, 2005).

I.Δ. Οικογένεια Gadd45 πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη που θα μας απασχολήσει στην συγκεκριμένη εργασία είναι η Gadd45a που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Gadd45. Στις πρωτεΐνες της οικογένειας Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage) γενικά ανήκουν οι Gadd45α, Gadd45β, Gadd45γ, των οποίων τα γονίδια εδράζονται στα χρωμοσώματα 1, 19, 9 αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι μικρές (18 kDa), πυρηνικές κι αρνητικά φορτισμένες (Hildesheim et al., 2002) και συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η επιδιόρθωση του DNA, η απόπτωση, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η γενωμική ακεραιότητα, η κυτταρική γήρανση, κι άλλες διαδικασίες συνδεδεμένες έμμεσα με τη γήρανση του οργανισμού. Έχουν χαμηλή έκφραση στον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά η έκφρασή τους αυξάνεται ραγδαία όταν ο οργανισμός λάβει ένα στρεσογόνο ερέθισμα όπως η UV-ακτινοβολία (Moskalev et al., 2011). Επιπλέον, η έκφρασή των γονιδίων τους μπορεί να διαφέρει στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων και στις διάφορες φάσεις του κύκλου, με ανεβασμένα τα επίπεδα τους κατά την G1 φάση, και χαμηλότερα στην S (Hildesheim et al., 2002).

I.Δ.1. Η πρωτεΐνη Gadd45a

Η πιο καλά μελετημένη ισομορφή των παραπάνω πρωτεϊνών είναι η Gadd45a, μια μικρή και πολύ όξινη πρωτεΐνη, που βοηθάει στην διατήρηση γενωμικής ακεραιότητας και στη σωστή λειτουργία των κεντροσωμάτων (όσο αφορά στον διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων, τον σωστό διαχωρισμό τους και, συνεπώς, τον αριθμό τους). Το τελευταίο συμβαίνει καθώς η έκφρασή της ρυθμίζεται, είτε θετικά είτε αρνητικά, από πρωτεΐνες όπως Bca1, Atm, p53 και c-myc (Hollander et al., 1999).

Η p53 ενεργοποιεί την Gadd45a μετά από βλάβη στο γενετικό υλικό από γενοτοξικούς παράγοντες, έτσι ώστε να προκληθεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1/S, δηλαδή πριν τον πολλαπλασιασμό του κατεστραμμένου DNA, με σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών (Hollander & Fornace, 2002). Από την μεριά της, η Gadd45a συνεισφέρει στην ενεργοποίηση της p53 -μέσω της p38 που την φωσφορυλιώνει και επάγει την έκφρασή της. Βοηθάει επίσης στην διατήρηση της MAPK σηματοδότησης (πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/Θρεονίνης που ενεργοποιείται από μιτογόνο) και της έκφρασης των p38 και JNK πρωτεϊνών, με σκοπό την ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών (Hildesheim et al., 2002).

Η πρωτεΐνη Gadd45a είναι αρκετά σημαντική, καθώς η αποσιώπησή αυτής και της p53 δημιουργεί ανωμαλίες στην ανάπτυξη και ακεραιότητα των κυττάρων, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στην περίπτωση του p21 knockdown, επίσης αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται από το p53 (όπως αναλύθηκε και παραπάνω)(Hollander et al., 1999). Παρ'όλα αυτά, η ανάπτυξη σε ποντίκια που δεν εκφράζουν Gadd45a, p53 και p21 είναι σχετικά φυσιολογική, ενώ οι δυσλειτουργίες παρατηρούνται *in vitro* κατά την μίτωση των Gadd45a knockdown -όσο αφορά τον αριθμό κεντροσωμάτων και τη γενικότερη μορφολογία των κυττάρων (Hollander et al., 1999).

Η πρωτεΐνη Gadd45a αλληλεπιδρά επίσης με την ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνη p21 (η οποία, στοχεύοντας το σύμπλοκο cdk2/κυκλίνη E, συμμετέχει στον σωστό διπλασιασμό των κεντροσωμάτων), την cdc2 (βοηθώντας στην διάσπαση του συμπλόκου κυκλίνη B1/cdc2, που συμμετέχει στον διαχωρισμό των κεντροσωμάτων) και τις ιστόνες (τροποποιώντας την προσβασιμότητα στο DNA) (Hollander & Fornace, 2002; Shao et al., 2006). Γενικά, όταν εντοπιστούν βλάβες του DNA και κατεστραμμένα κύτταρα λόγω γενοτοξικού στρες, τότε επάγεται κυτταρική γήρανση μέσω του μονοπατιού p38/p53, ή απόπτωση μέσω του p38/JNK (Liebermann & Hoffman, 2013).

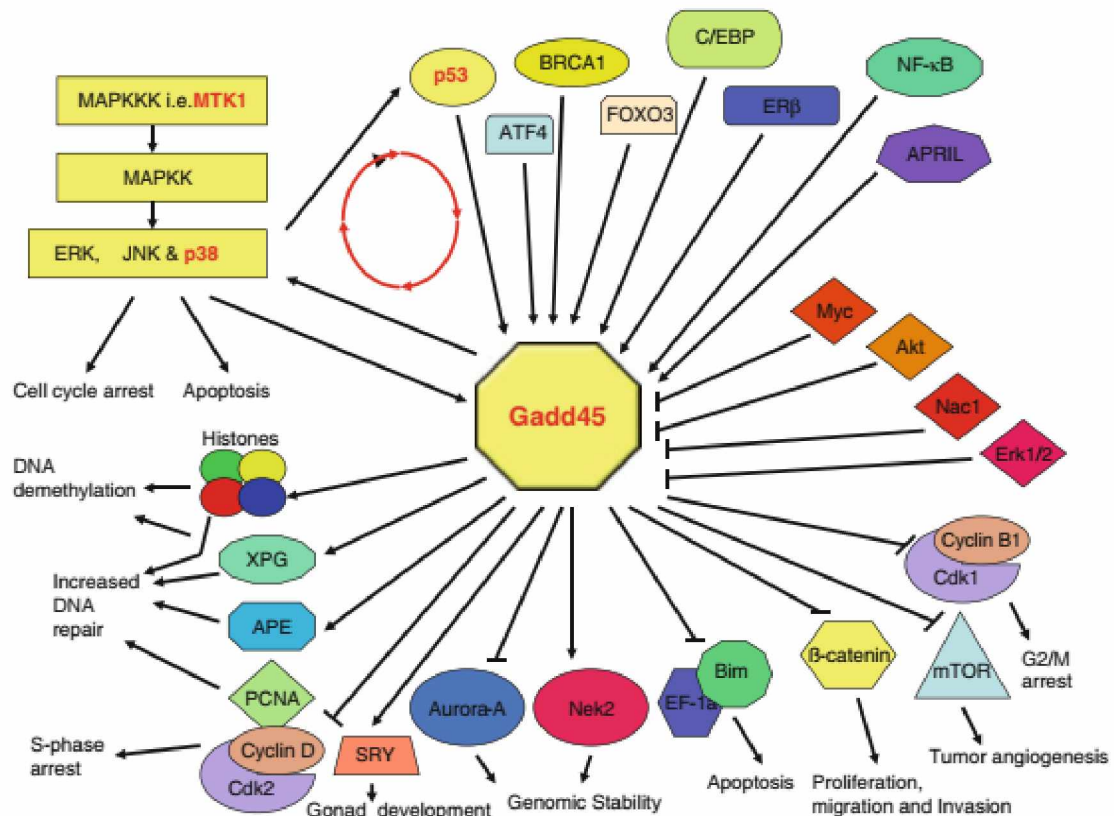
Όσο αφορά στα καρκινικά κύτταρα, η Gadd45a αναστέλλει την ικανότητα μετάστασης, καθώς βοηθάει στη διατήρηση των συνδέσμων προσκόλλησης μεταξύ των γειτονικών κυττάρων και στη ρύθμιση των μεταλλοπρωτεασών, γεγονότα που εμποδίζουν τα κύτταρα να έχουν «επιθετικό χαρακτήρα» και να οδηγήσουν σε διήθηση ιστών. Το κύριο συστατικό των συνδέσμων αυτών είναι η β-κατενίνη, η οποία παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη με τη βοήθεια της καβεολίνης-1, και η αλληλεπίδρασή τους ενισχύεται από την παρουσία της Gadd45a πρωτεΐνης (Ji et al., 2007).

Η πρωτεΐνη Gadd45a, η δράση της οποίας στοχεύει στη γενωμική σταθερότητα, συμμετέχει και στον έλεγχο της σταθερότητας των κεντροσωμάτων. Αν και αλληλεπιδρά με 12 πρωτεΐνες που συμμετέχουν ενεργά στον διπλασιασμό των κεντροσωμάτων, κύριος ρυθμιστής της κεντροσωμικής λειτουργίας και ωρίμανσης φαίνεται να είναι η πρωτεϊνική κινάση Aurora A. Όπως είδαμε παραπάνω, η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει και στην έναρξη της μίτωσης (Ι.Γ.), καθώς και στην δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου (Ι.Γ.3.). Η κινάση Σερίνης/Θρεονίνης Aurora A είναι

ογκοπρωτεΐνη καθώς η απορρύθμιση της έκφρασής της μπορεί να προκαλέσει κεντροσωμική δυσλειτουργία και αστάθεια και, ως επακόλουθο, υπεράριθμα κεντροσώματα (centrosome amplification). Η δημιουργία του τελευταίου παρεμποδίζεται από την Gadd45a η οποία αλληλεπιδρά -μέσω του αμινοτελικού της άκρου- με την κινάση και καταστέλλει την δράση της (Shao et al., 2006).

Τέλος, η Gadd45a φαίνεται να αλληλεπιδρά με την BECN1, εμποδίζοντάς την να αλληλεπιδράσει με το PIK3C3, που είναι θετικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας, αναστέλοντας έτσι την αυτοφαγική διαδικασία (Zhang et al., 2015).

Όπως βλέπουμε από όλα τα παραπάνω, η Gadd45a συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, που όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 8* μπορούν να ρυθμίσουν τον κυτταρικό κύκλο, τη διακοπή του και έμμεσα την κυτταρική γήρανση.



Εικόνα 8: Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις Gadd45 και σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται (Liebermann & Hoffman, 2013)

I.Δ.2. Gadd45a και κυτταρική γήρανση

Όπως ήδη αναφέραμε, τα φυσιολογικά κύτταρα δεν μπορούν να διαιρούνται επ'άπειρον. Υπάρχει ένα όριο στον αριθμό διαιρέσεων (όριο Hayflick) όπου επέρχεται το σταμάτημα σύνθεσης DNA και η -μη αναστρέψιμη- αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1. Αυτό συμβαίνει λόγω της συνεχούς μείωσης του μήκους των τελομερών κατά τους κύκλους αντιγραφής, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR (=μηχανισμός απόκρισης σε βλάβες DNA) και τελικά στην αναδιπλασιαστική γήρανση (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Οι φθορές στα τελομερή ή και σε άλλα σημεία των χρωμοσωμάτων μπορεί να είναι και αποτέλεσμα περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. οξειδωτικού στρες) και έχουν ως αποτέλεσμα πρόωρη γήρανση (=SIPS) (McHugh & Gil, 2018; Petr et al., 2020; Trachana et al., 2017).

Έπειτα από φθορές στο γενετικό υλικό και ένα μονοπάτι φωσφορυλιώσεων πολλών μορίων (H2AX ιστόνη, BRCA1, CHK2 κινάση) του μηχανισμού DDR που ακολουθεί, ενεργοποιείται η p53 η οποία και επάγει την έκφραση της Gadd45a στα σημεία των βλαβών. Εκεί, η Gadd45a βοηθάει στην απομεθυλίωση των CpG νησίδων και, τελικά, στην αποσυμπείρωση της ετεροχρωματίνης, με σκοπό να στρατολογηθούν όλες οι απαραίτητες πρωτεΐνες του DDR και να γίνει η επιδιόρθωση των βλαβών. Η p53 επίσης αλληλεπιδρά με την p21, που σταματάει τον κύκλο στην G1 φάση, και την PCNA, οι οποίες αμφότερες οδηγούν σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Η Gadd45a, πέρα από το γεγονός ότι συμμετέχει στη συγκρότηση των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών, έχει ρόλο και στην επιδιόρθωση, καθώς αλληλεπιδρά και η ίδια απευθείας με την PCNA (=proliferating cell nuclear antigen). Η τελευταία βρίσκεται στα σημεία όπου αναγνωρίζεται η βλάβη, καθώς και κατά το στάδιο που λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός κατά τον μηχανισμό επιδιόρθωσης NER (= nucleotide excision repair= επιδιόρθωση μέσω εκτομής νουκλεοτιδίου) (Diao et al., 2018).

Πρόωρη κυτταρική γήρανση προκύπτει επίσης λόγω συσσωρευμένων βλαβών του DNA από υπεριώδη ακτινοβολία, στρεσογόνους παράγοντες ή υπερέκφραση ογκογονιδίου (π.χ. Ras, Raf). Στην διατήρηση της κατάστασης αυτής, για τον άμεσο σταματημό του πολλαπλασιασμού κατεστραμμένου DNA, βοηθάει η έκφραση των Gadd45a, p38 και p53 (Hildesheim et al., 2002). Αντίθετα, σε κύτταρα όπου έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου Gadd45a, υπάρχει απώλεια φυσιολογικής κυτταρικής

γήρανσης, ανωμαλίες στην ανάπτυξη, δυσλειτουργικά κεντροσώματα και, συνεπώς, μη φυσιολογική κυτοκίνηση (Hollander & Fornace, 2002).

I.Δ.3. Gadd45a και οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα έχει δείχθει ότι προκαλεί βλάβες σε πυρηνικό και μιτοχονδριακό γενετικό υλικό, πρωτεΐνες κι άλλα μακρομόρια, καθώς και ότι ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια, με σκοπό να επιδιορθωθούν οι βλάβες αυτές. Αν δεν επιδιορθωθούν οι επαγόμενες από το οξειδωτικό στρες βλάβες, θα επαχθεί όπως έχει αναφερθεί η γήρανση του κυττάρου που πιθανά έχει σχέση και με την εμφάνιση των ηλικιοσχετιζόμενων παθήσεων (π.χ. οστεοαρθρίτιδα) (Finkel & Holbrook, 2000; Goutas et al., 2020).

Στρες μπορεί να προκληθεί από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες παράγονται φυσιολογικά μέσω του οξειδωτικού μεταβολισμού των κυττάρων, βοηθάνε στην διατήρηση της ομοιόστασης και μεσολαβούν στην διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης (Finkel & Holbrook, 2000). Χαρακτηριστική μιτοχονδριακή ROS είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο επάγει τη δημιουργία γηρασμένων κυττάρων, δηλαδή πεπλατυσμένων κυττάρων με διογκωμένο πυρήνα και μέγεθος, αυξημένη έκφραση β-γαλακτοζιδάσης και p53/p21, κι άλλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά της γήρανσης (Höhn et al., 2017).

Το οξειδωτικό στρες, πέρα από κυτταρική γήρανση, προκαλεί γενικότερη γενωμική αστάθεια, όπως δημιουργία μικροπυρήνων και ανευπλοειδιών (πιθανά μέσω της δυσλειτουργίας του SAC), μορφολογικές ανωμαλίες πυρήνα, καθώς και μείωση βλαστικότητας των MSCs, δηλαδή της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησής τους (Trachana et al., 2017).

Όλα τα παραπάνω σχετίζονται και με προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου που έδειξαν πως τα επίπεδα της Gadd45a αυξήθηκαν μετά από έκθεση σε οξειδωτικό στρες (εξωγενές H_2O_2) σε νεαρά hMSCs -όπως ήταν αναμενόμενο, ενώ σε μεγαλύτερα κύτταρα η ανταπόκριση της Gadd45a στο OS ήταν μικρή κι άργησε να συμβεί, γεγονός που πιθανά να σχετίζεται με μιτωτικές ανωμαλίες και με την διαδικασία επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης.

I.E. Σκοπός ερευνητικής διπλωματικής

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας θα επιχειρηθεί αποσιώπηση της πρωτεΐνης Gadd45a σε νεαρά και γηρασμένα hMSCs, ώστε να ερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και πιο ιδιαίτερα, στο σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC). Αρχικά, θα επιχειρήσουμε, με τη χρήση ανοσοφθορισμού για την γ-τουμπουλίνη, να διερευνήσουμε τον αριθμό των κεντροσωμάτων σε κύτταρα όπου έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου Gadd45a. Επιπλέον, με τη χρήση ταξόλης, η οποία διαταράσσει την δυναμική ισορροπία πολυμερισμού-αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιώντας το SAC, θα ελέγξουμε εάν η αποσιώπηση του γονιδίου επηρεάζει αυτήν την ενεργοποίηση.

II. Υλικά και Μέθοδοι

II.A. Κυτταρικό μοντέλο

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) απομονωμένα από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Τα κύτταρα αυτά πλεονεκτούν έναντι των ESCs και iPSCs, καθώς απομονώνονται εύκολα από ιστούς κατά την γέννα. Είναι πολυδύναμα (multipotent), δεν έχουν τόση ετερογένεια όση τα ενήλικα μεσεγχυματικά και η καλλιέργειά τους είναι εύκολη, καθώς έχουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού για αρκετούς κύκλους (passages) (Liau et al., 2020).

II.A.1. Καλλιέργειες κυττάρων

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν WJ-MSCs του δότη B σε passage 11 και 73 που αντιστοιχούν σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα. Οι διαδικασίες που αφορούν την καλλιέργειά τους γίνονται κάτω από αυστηρά στείρες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Vertical laminar flow hood) ώστε να μην υπάρχει κάποια μόλυνση.

Υλικά

- ΗMSCs κύτταρα B. p11 και p73
- Πλήρες θρεπτικό υλικό: μέσο ανάπτυξης Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρείας Biowest, εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό βοός (FBS) και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη για αποφυγή επιμολύνσεων από βακτήρια και μύκητες (διατηρείται στους 4°C)
- Φλάσκες καλλιέργειας πολυστερινίου 75 cm²
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (phosphate buffer saline-PBS), το οποίο διατηρεί το pH της καλλιέργειας (διατηρείται στους 25°C)
- Θρυψίνη-EDTA 1x PBS, με σκοπό να σπάσουν οι σύνδεσμοι μεταξύ καλλιεργούμενων κυττάρων και φλάσκας και να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της (διατηρείται στους 4°C)
- Κωνικοί σωλήνες των 15 ml
- Κλίβανος επώασης

Πειραματική διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C, 5% CO₂ και 80% υγρασία

- Προθέρμανση πλήρους θρεπτικού υλικού και θρυψίνης στους 37°C, με σκοπό να μην υπάρχει διαφορά στη θερμοκρασία καλλιέργειας.
- Προσθήκη 10 ml θρεπτικού υλικού σε φλάσκα 75 cm² το οποίο και ανανεώνεται κάθε δύο μέρες.

Η καλλιέργεια παρακολουθείται καθημερινά μέσω μικροσκοπίου αντίθετης φάσης, για να επιβεβαιώση ότι δεν υπάρχει εμφάνιση κάποιας μόλυνσης και ότι γίνεται σταθερά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Μόλις τα κύτταρα φτάσουν σε πυκνότητα 80% στο τοίχωμα της φλάσκας, τότε πραγματοποιείται αποκόλληση αυτών.

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα και έκπλυση με χρήση 5 ml αποστειρωμένου PBS για απομάκρυνση των νεκρών και άχρηστων κυττάρων
- Προσθήκη 1,5 ml θρυψίνης -αφού πρώτα ξεπαγώσει και φτάσει σε θερμοκρασία 37°C μέσω του υδατόλουτρου- με σκοπό να καλύψει όλη την επιφάνεια των κυττάρων
- Επώαση φλάσκας για 4 λεπτά με σκοπό να δράσει η θρυψίνη και να αποκολληθούν τα κύτταρα από το τοίχωμα της φλάσκας
- Παρατήρηση καλλιέργειας στο μικροσκόπιο για επιβεβαίωση ότι υπάρχει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης

Σε περίπτωση που συνεχιστεί η καλλιέργεια των κυττάρων:

- Προσθήκη 8,5 ml θρεπτικού υλικού και ανάδευση του διαλύματος με χρήση πιπέτας για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων που υπάρχουν
- Μεταφορά περίπου 3x10⁶ κυττάρων σε νέα φλάσκα 75 cm² αραιωμένα σε νέο θρεπτικό υλικό μέχρι τα 10 ml. Ο αριθμός των κυττάρων καθορίζεται πάντα ανάλογα με τον τρόπο και τον ρυθμό ανάπτυξης αυτών

Στην περίπτωση που τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιηθούν σε κάποιο πείραμα, η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων επιστρώνεται σε 6-well plate ώστε να δημιουργηθεί το σωστό confluency -ανάλογα με το πείραμα και τις επιθυμητές μέρες επώασης.

Π.Α.2. Κατάψυξη-Απόψυξη κυττάρων

Σε περίπτωση που ακολουθήσει αποθήκευση σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων αυτών ή δημιουργία stock, τότε γίνεται κατάψυξη των συγκεκριμένων φλασκών.

Υλικά

- PBS
- Θρυψίνη
- Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM
- 15 ml falcon
- FBS
- DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο): οργανικός διαλύτης που βοηθάει στην σταδιακή ψύξη των κυττάρων/ τοξικός σε μεγάλες συγκεντρώσεις
- Cryovials: ειδικά tubes για πάγωμα κυττάρων στους -80°C
- Mr.Frosty Freezing Container: επιταχύνει την σταδιακή μείωση θερμοκρασίας

Πειραματική Διαδικασία Κατάψυξης κυττάρων

Τα πρώτα βήματα είναι ίδια με την αλλαγή passage. Αναλυτικότερα:

- Αφαίρεση θρεπτικού από την φλάσκα, ξέπλυμα με PBS, προσθήκη θρυψίνης και επώαση στον incubator (37°C) για 4'
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο ότι όλα τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας
- Προσθήκη 5 mL πλήρες θρεπτικού υλικού, ανάδευση και μεταφορά όλης της ποσότητας σε 15 ml falcon
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά ($\theta=22^{\circ}\text{C}$)
- Αφαίρεση του υπερκείμενου κάτω από αυστηρά στείρες συνθήκες
- Προσθήκη 3,6 mL FBS στο ίζημα και ανάδευση
- Διαχωρισμός αραιωμένου ιζήματος σε 4 tubes (900 μL στο καθένα), με σκοπό κάθε cryovial να έχει 4×10^6 κύτταρα
- Προσθήκη 100 μL DMSO (10% v/v) σε κάθε tube και καλή ανάδευση
- Αποθήκευση στο Mr.Frosty και μεταφορά στους -80°C για μελλοντική χρήση

Πειραματική Διαδικασία Απόψυξης κυττάρων

Το επιθυμητό cyonial αφαιρείται από τους -80°C και μένει για λίγο στο υδατόλουτρο να ξεπαγώσει. Η θερμοκρασία αυτού δεν πρέπει να φτάσει τους 37°C , καθώς το DMSO που έχει είναι τοξικό για τα κύτταρα. Πρωτού ξεπαγώσει πλήρως, μεταφέρεται το εσωτερικό του σε falcon με 4 mL πλήρες θρεπτικό.

- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά (22°C)
- Αφαίρεση του υπερκειμένου που έχει μέσα το DMSO
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε θρεπτικό μέχρι τελικό όγκο 10 mL και μεταφορά της ποσότητας σε μικρή φλάσκα 25 cm³
- Αποθήκευση στον incubator (37°C) για συνέχιση κυτταροκαλλιέργειας

II.B. Μέθοδος προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal

Για να προσδιοριστεί ότι τα κύτταρα p.11 και p.73 είναι νεαρά και γηρασμένα αντίστοιχα, πραγματοποιείται ανίχνευση SA-β-gal. Πρόκειται για έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο βιοδείκτη κυττάρων στα οποία έχει επαχθεί κυτταρική γήρανση κι έχει διακοπεί η ικανότητα της αντιγραφής. Η β-γαλακτοζιδάση SA-β-gal είναι ανιχνεύσιμη αυστηρά σε pH 6, το οποίο και την διαφοροποιεί από την όξινη ευκαρυωτική β-γαλακτοζιδάση των λυσοσωμάτων (pH: 3-5). Η ανίχνευσή της στα γηρασμένα κύτταρα βασίζεται στο χρωμογόνο υπόστρωμα x-gal το οποίο και διασπά και προκύπτει μια αδιάλυτη μπλε ένωση.

Υλικά

- Κρύο PBS
- **Διάλυμα μονιμοποίησης (fixative):** 2% φορμαλδεύδη + 0,2% γλουταραλδεύδη διαλυμένα σε PBS
- **Διάλυμα χρώσης (staining solution)** που περιλαμβάνει τα παρακάτω άλατα:
 - α. 40 mM κιτρικό οξύ/φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (διάλυμα απαραίτητα σε pH=6 για να υπάρξει χρώση)
 - β. 5 mM potassium ferrocyanide ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$)
 - γ. 5 mM potassium ferricyanide ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$)
 - δ. 150 mM NaCl
 - ε. 2 mM mgCl_2

στ. 1 mg/ml 5-βρόμο-4-χλώρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (x-gal)

- Κλίβανος χωρίς διοξείδιο του άνθρακα

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα του δότη B στα στάδια p.11 και p.73 καλλιεργούνται και αναπτύσσονται για 2 μέρες σε 6-well plate. Αφού φτάσουν να είναι περίπου $0.3-2 \times 10^5$ /well, ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού τους
- 2 πλύσεις με κρύο PBS

Η διαδικασία μπορεί να συνεχιστεί πλέον σε μη στείρες συνθήκες.

- Προσθήκη μονιμοποιητικού διαλύματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Δύο πλύσεις με κρύο PBS
- Προσθήκη 1-2 ml/ well plate διάλυμα χρώσης
- Αποθήκευση σε κλίβανο χωρίς διοξείδιο του άνθρακα για 16-24 ώρες
- Αφαίρεση διαλύματος χρώσης την επόμενη μέρα και 3 πλύσεις με κρύο PBS
- Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο

Όπου παρατηρείται μπλε χρώμα σε κύτταρο, πρόκειται για γηρασμένο.

Π.Γ. Αποσιώπηση του γονιδίου Gadd45a με χρήση siGadd45a

Υλικά

- HMSCs κύτταρα B. p11 και p73
- 6-well plate
- Πλήρες θρεπτικό (DMEM + 10% FBS + 1% pen-stp)
- DMEM
- FBS
- Opti-Mem I (1X) (Reduced Serum Medium)
- Lipofectamine RNAiMAX Reagent, Invitrogen
- SiGadd45a, Invitrogen
- Κλίβανος επώασης

- Countess (Invitrogen)
- PBS
- Ice cold μεθανόλη

Πειραματική Διαδικασία

Για την διαδικασία αποσιώπησης του γονιδίου *gadd45a* χρησιμοποιούνται νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, p.11 και p.73 αντίστοιχα, από φλάσκες που βρίσκονται σε 50-60% confluency.

- Αραίωση 250.000 κυττάρων από την καθε φλάσκα σε 1.5 ml πλήρες θρεπτικό και μεταφορά τους σε 6-well plate

Σε 4 από τα plates προστέθηκαν καλυπτρίδες από πριν, με σκοπό να γίνει ανοσοφθορισμός έπειτα.

- Επώαση σε κλίβανο για μία μέρα
- Αφαίρεση του πλήρες θρεπτικού την επόμενη μέρα
- Προσθήκη DMEM με 10% FBS για λίγη ώρα, έτσι ώστε να συνηθίσουν τα κύτταρα στο νέο μέσο ανάπτυξης πριν την προσθήκη του siRNA

Προετοιμασία siGadd45a

Σε κάθε well plate πρέπει να περιέχονται 25 pmol siRNA.

Οι παρακάτω υπολογισμοί αναφέρονται σε διάλυμα που προορίζεται για 1 well plate

Αρχικά γίνεται αραίωση λιποφεκταμίνης στο Opti-Mem Medium:

- 1^ο eppendorf: 5 μl λιποφεκταμίνης σε 125 μl Opti-Mem Medium
- 2^ο eppendorf: 2.5 μl siGadd45a σε 125 μl Opti-Mem Medium
- Προσθήκη του αραιωμένου siGadd45a στην αραιωμένη λιποφεκταμίνη (σε αναλογία 1:1) και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 250 μl του μίγματος σε κάθε well plate και επώαση στον κλίβανο για 2 μέρες

Π.Γ.1. Επιδράσεις με ταξόλη

Μετά τις δύο μέρες, ακολουθεί προσθήκη ταξόλης, που στοχεύει την δυναμική των μικροσωληνίσκων, με σκοπό να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος στο σημείο της μίτωσης.

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από κάθε well
- Προσθήκη 2 ml από αραιωμένη ταξόλη συγκέντρωσης 500 nM σε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά
- Επώαση κυττάρων για 16 ώρες

Μετά το πέρας των 16 ωρών, παρατηρείται αν τα κύτταρα έχουν «σηκωθεί» από την επιφάνεια και αιωρούνται στο θρεπτικό, διαδικασία που ονομάζεται mitotic shake off (mso). Αυτό σημαίνει ότι έχουν σταματήσει στην μίτωση. Ακολουθεί κυτταρομέτρηση όπου παρατηρείται αν η αποσιώπηση του γονιδίου επιτρέπει το σταμάτημα του κύκλου ή αν με κάποιο τρόπο τα κύτταρα “ξεφεύγουν” από την μίτωση, συγκριτικά με τα si-control τους.

Κυτταρομέτρηση

Η κυτταρομέτρηση έγινε με χρήση Countess και βρέθηκε το ποσοστό ολικών, ζώντων και πεθαμένων κυττάρων του κάθε well. Έπειτα, αφαιρέθηκαν όλα τα κύτταρα από κάθε well, αιωρούμενα (mso) και προσκολλημένα, χρησιμοποιώντας τρυψίνη (0,5 ml/well plate) για τα τελευταία, και τοποθετούνται σε 15ml falcon με σκοπό να γίνει απομόνωση πρωτεϊνών έπειτα

- Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 12.000 στροφές για 5 λεπτά

Από εδώ και στο εξής, τα πειράματα μπορούν να συνεχιστούν σε μη στείρες συνθήκες.

- Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml PBS με αρκετές αναδεύσεις, ώστε να διαλυθεί και να ομογενοποιηθεί
- Μεταφορά του ομογενοποιημένου διαλύματος σε eppendorf των 2 ml
- Φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκείμενου, με πλήρη αφαίρεση υδάτων, ώστε το ίζημα (όλα τα κύτταρα) να είναι αφυδατωμένο

Ακολουθεί απομόνωση πρωτεϊνών ή αποθήκευση στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Π.Γ.2. Μονιμοποίηση κυττάρων στις καλυπτρίδες

Τα κύτταρα που έχουν προστεθεί σε well plates με καλυπτρίδες, ακολουθώντας τις ίδιες πειραματικές διαδικασίες με τα υπόλοιπα κύτταρα, πρέπει να μονιμοποιηθούν (fixation) πάνω σε αυτές, πρώτου γίνει ο ανοσοφθορισμός

- Αφαίρεση του θρεπτικού (δεν γίνεται σε αυτά μέτρηση κυττάρων)
- Μία προσεκτική πλύση με κρύο PBS
- Προσθήκη 500 μL παγωμένης (-20°C) μεθανόλης και επώαση για 10' στους -20°C
- Αφαίρεση μεθανόλης και πλύση με PBS
- Αποθήκευση των πλήρως αφυδατωμένων καλυπτρίδων στους -20°C σε σκοτεινό σημείο για μελλοντική χρήση

Π.Γ.3. Απομόνωση πρωτεϊνών

Υλικά

- Lysis Buffer: RIPA (30 mM Tris, 10% Γλυκερόλη, 150 mM NaCl, 1% NP40) και PI (αναστολείς πρωτεασών) σε αναλογία 7:1 αντίστοιχα
- Vortex
- Φυγόκεντρος

Πειραματική διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών

Γίνεται χρήση των eppendolfs με το ίζημα που προέκυψαν προηγουμένως (Π.Γ.1.)

- Προσθήκη lysis buffer στο pellet (τοποθετείται ποσότητα που αναλογεί στο μέγεθος του συγκεκριμένου ιζήματος, ξεκινώντας από 50 μl για μικρό pellet)
- Επώαση με το lysis buffer για 40 λεπτά (vortex ανά 5'), με σκοπό να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων και να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες
- Φυγοκέντρηση διαλύματος στις 6.000 στροφές για 5 λεπτά

Το μικρό ίζημα που προκύπτει είναι το DNA και συστατικά που δεν είναι απαραίτητα στην συγκεκριμένη διαδικασία, ενώ οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο διάλυμα.

- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube
- Φωτομέτρηση για μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων ή αποθήκευση στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Φωτομέτρηση

Η φωτομέτρηση προσδιορίζει την απόλυτη συγκέντρωση πρωτεΐνης που χρειάζεται ώστε να ισοφορτωθούν τα δείγματα. Γίνεται με τη μέθοδο Bradford, που βασίζεται στην απορρόφηση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρωστική αυτή συνδέεται ισχυρά με τα καρβοξυλικά άκρα των αμινοξέων των πρωτεϊνών, δίνοντας σύμπλοκο μπλε χρώματος. Όταν συμβεί η αλληλεπίδραση αυτή, τότε το φάσμα απορρόφησης της χρωστικής γίνεται από 465 nm, 595 nm. Γι αυτό και η μέτρηση απορρόφησης γίνεται στο τελευταίο μήκος κύματος.

Για να γίνει ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων, είναι απαραίτητη η δημιουργία πρότυπης καμπύλης απορρόφησης δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Παίρνοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης (μg/ml) από ορό βοός (BSA= Bovine Serum Albumine) αραιωμένη σε RIPA, προστίθεται διάλυμα Bradford και dH₂O, και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης. Οι τιμές των δειγμάτων πρέπει να βρίσκονται στην κεντρική περιοχή τιμών απορρόφησης της καμπύλης αναφοράς.

Π.Γ.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι η μέθοδος κίνησης ουσιών μέσα σε gel, εξαρτώμενη από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος αυτών, με επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αυτό γίνεται με σκοπό τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) της πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f). Ο τύπος που προκύπτει είναι: $v = Ez / f$.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (ακρυλαμίδη και δυσ-ακρυλαμίδη) είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφαντικές αλυσίδες και αποτελεί μοριακό ηθμό κάνοντας ευκολότερο τον διαχωρισμό μορίων, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από τις διαφορετικές θερμοκρασίες. Αφού πολυμεριστεί το διάλυμα ακρυλαμίδης και δυσ-ακρυλαμίδης, σχηματίζει ένα δίκτυο με πόρους

συγκεκριμένης διαμέτρου. Η διάμετρος αυτή καθορίζεται από την αναλογία των δύο υλικών. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο γρήγορα και εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα δυσκολεύονται να τους διαπεράσουν και γι αυτό καθυστερείται η κίνησή τους.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με χρήση δυο πολυμεριστικών παραγόντων που επιταχύνουν τον πολυμερισμό της πολυακρυλαμίδης. Οι παράγοντες αυτοί είναι το APS (υπερθειϊκό αμμώνιο), που βοηθάει να γίνει γρήγορα ο πολυμερισμός, και το TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο βοηθάει στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS που κατευθύνουν τον πολυμερισμό, καθώς και στην γρήγορη πήξη του πηκτώματος.

Υλικά για ηλεκτροφόρηση

- Πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS (NuPage NovexTris – Acetate MiniGels, Invitrogen)
- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (sample buffer= reducing buffer αναγωγικό διάλυμα για εμφάνιση επιτόπων μετά την αποδιάταξη + loading buffer που βοηθάει στο φόρτωμα των δειγμάτων) (Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών πρωτεϊνικών μοριακών βαρών
- dH₂O
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης- Running Buffer 1x= 100mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x (NuPageMES Running buffer) + 900 mL dH₂O

Π.Γ.4.i. Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Για να μπορέσουν οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν βάσει μοριακού βάρους κατά την ηλεκτροφόρηση, πρέπει πρώτα να αποδιαταχθούν και να επιστρέψουν στην αρχική πρωτοταγή τους δομή. Για να γίνει η αποδιάταξη, δημιουργείται το εξής διάλυμα για κάθε δείγμα:

- 4 μl sample buffer + (X μl πρωτεΐνης ώστε να υπάρχει συγκέντρωση 20 μg + Y μl dH₂O) για τελικό όγκο 24 μl
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή για αποδιάταξη πρωτεϊνών στους 95°C για 5 λεπτά

Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση απαιτεί δύο ειδών πηκτώματα, το πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel) και το πηκτώμα πακεταρίσματος (stacking gel). Το δεύτερο χρειάζεται για να στοιχθούν όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα, έτσι ώστε να περάσουν ταυτόχρονα στο separating gel. Το separating, ή αλλιώς resolving gel, είναι αυτό που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει του μοριακού τους βάρους. Πρόκειται για δύο διαφορετικά πηκτώματα που διαφέρουν ως προς το pH τους, τη συγκέντρωση διαλύματος πολυακρυλαμίδης και συνεπώς, το μέγεθος των πόρων.

Υλικά για δημιουργία gel πολυακρυλαμίδης

Οι πρωτεΐνες που θα μελετηθούν είναι οι εξής: **actin** (43 kDa) (για επιβεβαίωση ακεραιότητας του κυττάρου), **Gadd45a** (18 kDa), **Cyclin B1** (48 kDa), **BubR1** (120 kDa), και **Mad2** (22 kDa). Επομένως, δημιουργούνται δύο πηκτώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμίδης, ένα 10% και ένα 12%. Πρώτα τοποθετείται στην ειδική συσκευή δημιουργίας πηκτωμάτων το separating gel και αφού αυτό πήξει, προστίθεται και το stacking gel.

Separating gel 12%
2 ml 30% Acrylamide/ 0,8% Disacrylamide
1,25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8
1,75 mL dH ₂ O
0,05 ml 10% (w/v) ammonium persulfate (APS)
0,01 ml TEMED

Separating gel 10%
1,67 ml 30% Acrylamide/ 0,8% Disacrylamide
1,25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8
2,083 mL dH ₂ O
0,05 ml 10% (w/v) ammonium persulfate (APS)
0,01 ml TEMED

Stacking gel
0,65 mL 30% Acrylamide/0,8% Bisacrylamide
1,25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8
3,05 mL dH ₂ O
25 μL 10%(w/v) ammonium persulfate (APS)
5 μL TEMED

Πειραματική διαδικασία αποδιάταξης και διαχωρισμού πρωτεϊνών

- Τοποθέτηση των δύο πήκτωμάτων (10% και 12%) στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Προσθήκη Running buffer 1X (περίπου 200 ml) στο κενό μεταξύ των 2 gels
- Φόρτωση πρώτα του ladder και έπειτα των δειγμάτων στα πηγαδάκια
- Επιπλέον προσθήκη 600 ml Running buffer 1X μέσα στη συσκευή

Για τα πρώτα 15 λεπτά περίπου, μέχρι δηλαδή να «τρέξει» ο ladder, η τάση ορίζεται στα 80 volt. Μετά τα 15 λεπτά, ρυθμίζεται στα 180 volt -όπου και διατηρείται.

Όταν τα δείγματα «τρέξουν» και παρατηρηθούν οι επιθυμητές -ως προς το μέγεθος- μπάντες του ladder, τότε η συσκευή κλείνει και τα 2 πήκτώματα μεταφέρονται σε Transfer buffer 1X για 10'.

II.Γ.4.ii. Western Blot: Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Πρόκειται για μία μέθοδο που αφορά την μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε μία λεπτή μεμβράνη (=αποτύπωμα) και έπειτα, την ανοσολογική ανίχνευση τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Στην μεμβράνη αυτή προσδένονται και ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες με τη σειρά που διαχωρίστηκαν στο πήκτωμα και είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα σε σχέση με όταν βρίσκονται πάνω στο gel. Στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης οι αντιδράσεις είναι πιο επιφανειακές, άρα και οι χρόνοι επώασης με τα αντιδραστήρια πιο σύντομοι, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί παραπάνω από μία φορές για ανοσοανίχνευση.

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη δράση του πρωτοταγή και του δευτεροταγή αντισώματος. Το πρωτοταγές αντίσωμα αναγνωρίζει και προσδένεται σε συγκεκριμένη πρωτεΐνη στόχο. Το δευτεροταγές είναι αυτό που θα αναγνωρίσει και θα προσδεθεί στο πρωτοταγές και είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο HRP, το οποίο παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα. Πρόκειται για χαρακτηριστικές σκουρόχρωμες ζωνώσεις, οι οποίες αντιστοιχούν στις ζώνες της πρωτεΐνης που αντέδρασε με το αντίσωμα και είναι αντιπροσωπευτικές της έκφρασης της πρωτεΐνης στόχου. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται

οπτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών στόχων, και στη συνέχεια μπορεί να γίνει η ποσοτικοποίησή τους.

Υλικά για Western Blot

- Transfer buffer 1X (ρυθμιστικό διάλυμα για την μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης): 100 mL transfer buffer 10x + 700 mL dH₂O + 100 mL μεθανόλη
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Διηθητικό χαρτί
- Ειδικά σφουγκαράκια
- Μεθανόλη
- Ponceau (άλας νατρίου μιας χρώσης κόκκινου χρώματος που ανιχνεύει ταινίες πρωτεϊνών πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης)
- TBS-T 1X (Tris-buffered Saline- Tween), διάλυμα πλύσης 1L: 100 mL TBS 10X + 900 mL dH₂O + 1 ml Tween
- Blocking Buffer 5% (διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων για την σύνδεση αντισωμάτων) για 40 ml: 2 gr σκόνη γάλατος + 40 ml TBS-T 1X
- Διάλυμα αραιώσης αντισωμάτων: 5% BSA (διάλυμα ορού αλβουμίνης του βοός) διαλυμένο σε TBS-T 1X
- Αντισώματα αραιωμένα σε διάλυμα 5% BSA:

Πρωτοταγή Αντισώματα	Δευτεροταγή αντισώματα
Mouse monoclonal anti gadd45a 1/100 (Santa Cruz, 6850)	Monoclonal anti-mouse 1/5000 (Boster, ba-1050-1)
Mouse monoclonal anti actin 1/100 (Santa Cruz, 8432)	Monoclonal anti-mouse 1/5000 (Boster, ba-1050-1)
Mouse monoclonal anti Cyclin B1 1/200 (Santa Cruz, 245)	Monoclonal anti-mouse 1/5000 (Boster, ba-1050-1)
Mouse monoclonal anti BubR1 1/1000 (BD biosciences, 612503)	Monoclonal anti-mouse 1/5000 (Boster, ba-1050-1)
Mouse monoclonal anti Mad2 1/500 (Santa Cruz, 47747)	Monoclonal anti-mouse 1/5000 (Boster, ba-1050-1)

Πειραματική διαδικασία ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

Αρχικά, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 20 δευτερόλεπτα στην μεθανόλη για να ενεργοποιηθούν, και έπειτα μεταφέρονται, μαζί με τα σφουγγαράκια και τα διηθητικά χαρτιά του transfer, σε Transfer Buffer 1X για 10 λεπτά. Αφού έχει γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, τα πηγαδάκια των gel κόβονται και μεταφέρονται κι αυτά στο transfer buffer 1X.

Η ειδική συσκευή ηλεκτρομεταφοράς Trans-blot WetTransferCell (BioRad) στήνεται και μέσα σε αυτή τοποθετείται η διάταξη πηκτής-μεμβράνης. Για να δημιουργηθεί η τελευταία, γνωστή και ως δομή sandwich, στο ειδικό καλούπι μεταφέρονται με τη σειρά: σφουγγαράκι, διηθητικό χαρτί, gel πολυακρυλαμίδης, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, διηθητικό χαρτί, σφουγγαράκι. Το sandwich δημιουργείται με αυτόν το τρόπο γιατί οι πρωτεΐνες από το gel στην κάθοδο(-) πρέπει να μεταφερθούν -μέσω ηλεκτρικού πεδίου- στην μεμβράνη που βρίσκεται στην άνοδο(+). Προστίθεται διάλυμα transfer buffer 1X στην συσκευή και τοποθετείται παγοκύστης για να μην ανέβει πολύ η θερμοκρασία. Η ένταση του ρεύματος ρυθμίζεται στα 400 A και αφήνεται για 1.5 ώρα.

- Αφαίρεση και αποσυναρμολόγηση των δομών sandwich
- Τοποθέτηση των μεμβρανών σε Ponceau, με σκοπό να παρατηρηθούν οι ταινίες πρωτεϊνών, δηλαδή ότι έγινε σωστά η ανοσοαποτύπωση
- 3 πλύσεις των μεμβρανών (10' η καθεμία) με TBS-T για να φύγει όλη η κόκκινη χρωστική από αυτές (όλες οι πλύσεις γίνονται με ταυτόχρονο «κούνημα» πάνω σε vortex, ώστε να πάει το διάλυμα παντού στην μεμβράνη)
- Προσθήκη blocking buffer για 1 ώρα, με σκοπό να γίνει μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων και να συνδεθεί το πρωτοταγές αντίσωμα
- Προσθήκη του πρωτοταγή αντισώματος, το οποίο και μένει στις μεμβράνες για όλη την νύχτα στους 4°C υπό ανάδευση.

Την επόμενη μέρα, αφαιρείται το πρωτοταγές και μετά από 3 πλύσεις με TBS-T (10' η καθεμία σε vortex) προστίθεται σε κάθε μεμβράνη το δευτεροταγές, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται πάνω στο πρωτοταγές, και συγκεκριμένα στην Fc σταθερή περιοχή του. Η Fc σταθερή περιοχή είναι χαρακτηριστική και ειδική του ζώου στο οποίο παρασκευάστηκε το αντίσωμα. Για παράδειγμα, αν το πρωτοταγές αντίσωμα αναγνώρισε την Gadd45a που είναι αντίσωμα mouse, το δευτεροταγές

που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι anti-mouse. Μετά την επώαση και του δευτεροταγής αντισώματος που διαρκεί μία ώρα, ακολουθούν οι τελευταίες 3 πλύσεις με TBS-T ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του μη-προσδεμένου.

Το σήμα των αντισωμάτων δίνεται λόγω του ενζύμου HRP που είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το δευτεροταγές αντίσωμα. Σε αυτή την περίπτωση η ανίχνευση μπορεί να γίνει με το σύστημα ECL με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας. Το ECL είναι ενισχυτικό, το οποίο επωάζεται με την μεμβράνη για ελάχιστα λεπτά, έπειτα αφαιρείται και αφού μεταφερθεί σε ειδικό μηχάνημα, γίνεται καταγραφή του σήματος των αντισωμάτων (ανοσοεντόπιση) μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Για άμεση σύγκριση των σημάτων από πολλές πρωτεΐνες-στόχους που πιθανόν βρίσκονται στο ίδιο αποτύπωμα, μπορεί -και για εξοικονόμηση χρόνου και υλικών- η μεμβράνη να επαναχρησιμοποιηθεί για διαφορετικό κύκλο αντιδράσεων. Με άλλα λόγια, οι ίδιες μεμβράνες μπορούν να επωαστούν με διαφορετικά πρωτοταγή και αντίστοιχα δευτεροταγή αντισώματα, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία με πριν. Σε άλλη περίπτωση, οι μεμβράνες αποθηκεύονται αφυδατωμένες στους 4°C για μελλοντική χρήση.

II.Δ. Ανοσοφθορισμός

Γίνεται χρήση των μονιμοποιημένων 6-well plate με τις καλυπτρίδες που είχαν αποθηκευτεί στους -20°C (II.Γ.2.). Τα δείγματα είναι τα ακόλουθα: p.11 NT taxol, p.73 NT taxol, p.11 siGadd45a taxol, p.73 siGadd45a taxol. Ακολουθεί ανοσοφθορισμός για γ-τουμπουλίνη, με σκοπό την τελική παρατήρηση των κεντροσωμάτων.

Υλικά

- PBS
- 1% Triton-X-100 διαλυμένο σε PBS: κάνει διαπερατή τη μεμβράνη με σκοπό την είσοδο των αντισωμάτων
- PBS Tween: Tween 0,02% διαλυμένο σε PBS
- Blocking Buffer: 1% BSA διαλυμένο σε 100 mL PBS Tween: χρησιμοποιείται για μείωση των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων
- Αντισώματα αραιωμένα σε blocking mix:

Πρωτοταγή Αντισώματα	Δευτεροταγή αντισώματα
Mouse monoclonal anti γ -tubulin 1/500 (Sigma, 6557)	Goat anti-mouse Alexa fluor 488 1/500 (Invitrogen, A11001)

- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- DAPI (4,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη) (Vector, CA 94010): χρωστική που συνδέεται ισχυρά με τις περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε αδενίνη και θυμίνη και, συνεπώς, σημαίνει τους πυρήνες, οι οποίοι και φθορίζουν μπλε στο μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροσκόπιο φθορισμού

Πειραματική διαδικασία για ανοσοφθορισμό

- 3 διαδοχικές πλύσεις των μονιμοποιημένων κυττάρων με κρύο PBS, 5' η καθεμία
- Προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι 50 μ L 1 % Triton-X για 10'
- Μία πλύση PBS Tween για 5'
- Προσθήκη Blocking Buffer για 10'
- 3 πλύσεις με PBS Tween για 5'/η καθεμία
- Προσθήκη 80 μ L διαλύματος αντισωμάτων για την πρωτεΐνη-στόχο, την γ -τουμπουλίνη (anti-mouse) αραιωμένα σε blocking buffer και επώαση για 1 ώρα σε σκοτεινό σημείο, αφού πρόκειται για φωτοευαίσθητο διάλυμα
- Μία πλύση με PBS Tween για 5'
- Μία πλύση με κρύο PBS για 5'

Ετοιμάζονται οι αντικειμενοφόρες πλάκες όπου προστίθεται αρχικά μία σταγόνα DAPI και στην συνέχεια, πάνω σε αυτή τη σταγόνα, οι καλυπτρίδες γυρισμένες ανάποδα. Αφού επιβεβαιωθεί ότι τα άκρα έχουν σφραγίσει καλά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αποθηκεύονται σε σκοτεινό σημείο στους 4°C, με σκοπό μελλοντικά να παρατηρηθούν και να αναλυθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

III. Αποτελέσματα

III.A. Προσδιορισμός δραστηριότητας SA-β-gal

Η δραστηριότητα του ενζύμου εκτιμήθηκε έπειτα από χρώση με το χρωμογόνο υπόστρωμα x-gal για επιβεβαίωση νεαρής και προχωρημένης ηλικίας των κυττάρων. Οι παρακάτω εικόνες τραβήχτηκαν έπειτα από παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, όπου και εκτιμήθηκε ο αριθμός γηρασμένων κυττάρων σε κάθε περίπτωση, δηλαδή κυττάρων που βάφτηκαν μπλε. Επιπλέον, μέσα από τις εικόνες αυτές παρατηρούνται και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που αλλάζουν από το ένα στάδιο στο άλλο.

Σημείωση: Οι παρακάτω εικόνες είναι ενδεικτικές ενός συνόλου κυττάρων.

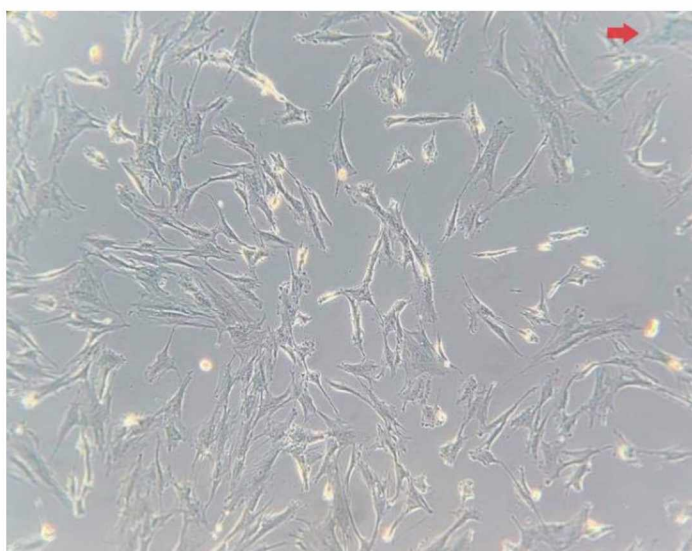


Figure 1: Νεαρά κύτταρα p.11

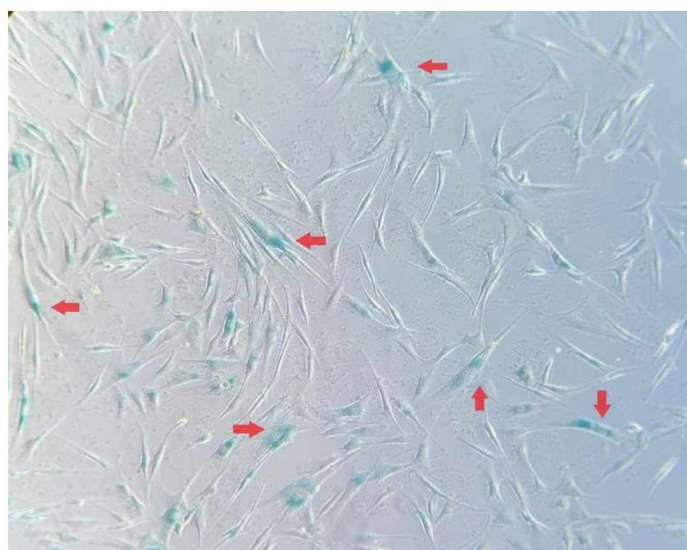
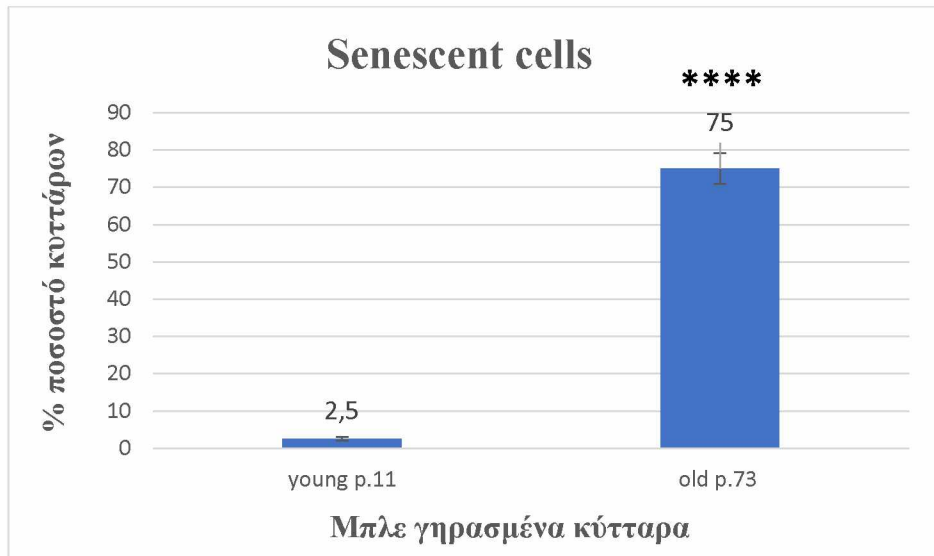


Figure 2: Γηρασμένα κύτταρα p.73

- ❖ Στα p.11 δεν παρατηρούνται σχεδόν καθόλου μπλε κύτταρα (Figure 1), σε αντίθεση με τα p.73 όπου εμφανίζονται αρκετά μπλε (Figure 2), μορφολογικά μεγαλύτερα και πεπλατυσμένα.
- ❖ Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1, τα μεγαλύτερα κύτταρα έχουν υψηλότερο ποσοστό κυττάρων (75%) που βρίσκονται στην γήρανση, σε αντίθεση με τα μικρότερα, που χαρακτηρίζονται από 2,5% γηρασμένα κύτταρα, με τιμή σημαντικότητας ίση με 0,000063784 ($\ll 0,0001=****$) (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Ποσοστό % μπλε κυττάρων που καταμετρήθηκαν στο μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με x-gal. Η χρώση αυτή δείχνει την έκφραση της SA-β-gal, χαρακτηριστικό βιοδείκτη της γήρανσης. Τα p.73 κύτταρα έχουν ποσοστό 75% γηρασμένων κυττάρων, ενώ τα p.11 2.5% (p.value= 0,000063784).

III.B. Αποσιώπηση γονιδίου *gadd45a*

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι έγινε σωστά η αποσιώπηση του γονιδίου *gadd45a*, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών μέσω western blot, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο αντίσωμα για την πρωτεΐνη Gadd45a. Loading control αποτελεί η έκφραση της ακτίνης. Στις παρακάτω φωτογραφίες συγκρίνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Gadd45a στα p.73 siControl και τα p.73 siGadd45a κύτταρα.

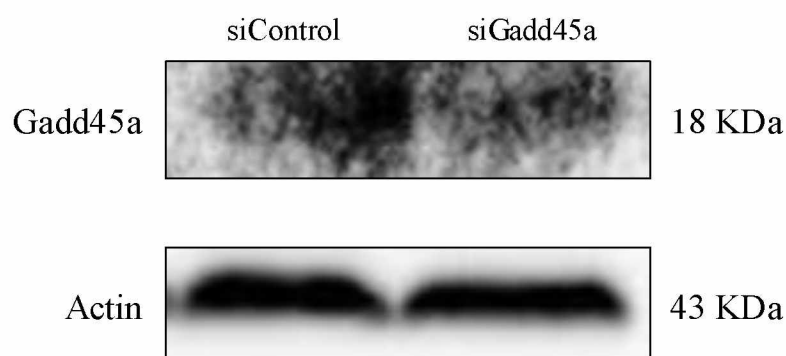
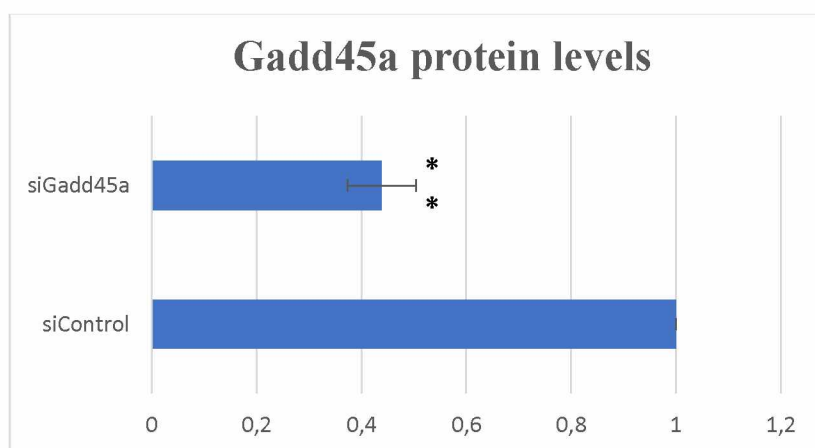


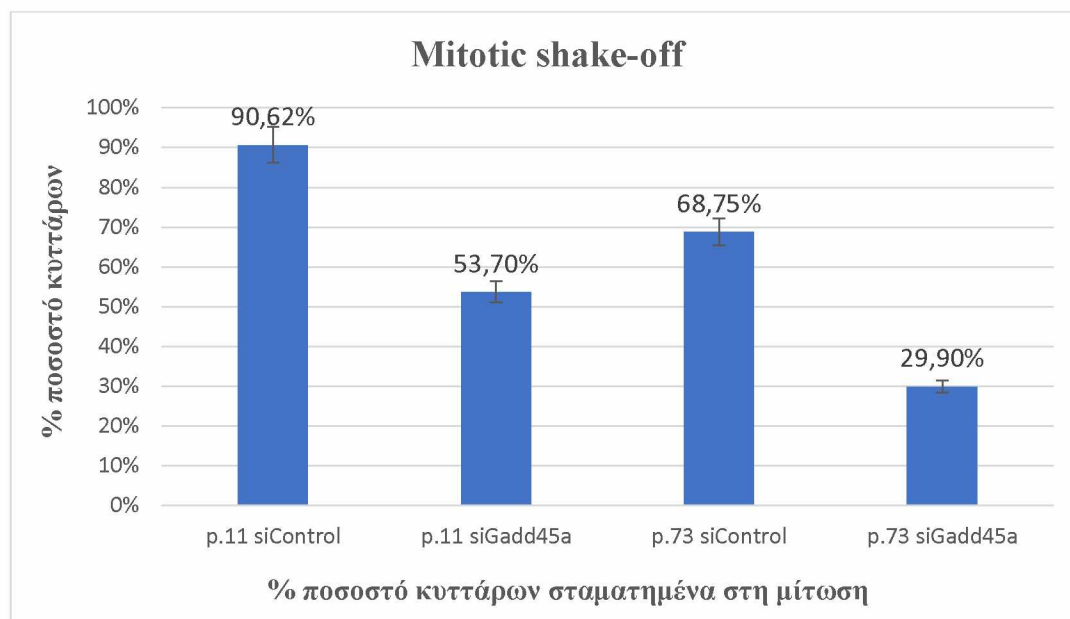
Figure 3: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη Gadd45a



Διάγραμμα 2: Πρωτεϊνικά επίπεδα πρωτεΐνης Gadd45a σε p.73 siControl και p.73 siGadd45a. Η έκφραση της πρωτεΐνης φαίνεται να μειώνεται κατά 56,1%, με τιμή σημαντικότητας $p.value = 0,0068002$ ($<0,01 = **$).

III.Γ. Αποτελέσματα έπειτα από τις επιδράσεις με ταξόλη και mitotic shake off

Όπως είναι γνωστό, η ταξόλη σταματάει τα κύτταρα στην μίτωση. Αφού απομονώθηκε ίδια ποσότητα κυττάρων από τα 6 well plate, έγινε μέτρηση με το κυτταρόμετρο (16 ώρες μετά από τις επιδράσεις) των σηκωμένων κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που βρίσκονται στην μίτωση (mitotic shake off). Στο διάγραμμα φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων:



Διάγραμμα 3: Ποσοστό % κυττάρων που βρίσκονται στη μίτωση σε κάθε πληθυσμό κυττάρων. 90,62% των p.11 siControl βρέθηκαν στην μίτωση, ενώ στα αντίστοιχα p.73 βρέθηκε το 68,75% των συνολικών κυττάρων. Με την αποσιώπηση του *gadd45a* τα επίπεδα των μιωτικών κυττάρων ελαττώθηκαν κατά 36,92% στα νεαρά και κατά 38,85% στα μεγαλύτερα κύτταρα.

- ❖ Στο *Διάγραμμα 3* παρατηρείται ότι όταν υπάρχει ελάττωση της συγκέντρωσης της *Gadd45a*, τα κύτταρα που βρίσκονται στην μίτωση μειώνονται κατά 36,92% στα p.11 και κατά 38,85% στα p.73 κύτταρα.

III.Δ. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών επιπέδων κυκλίνης B1, BubR1 και Mad2 σε siControl και siGadd45a κύτταρα

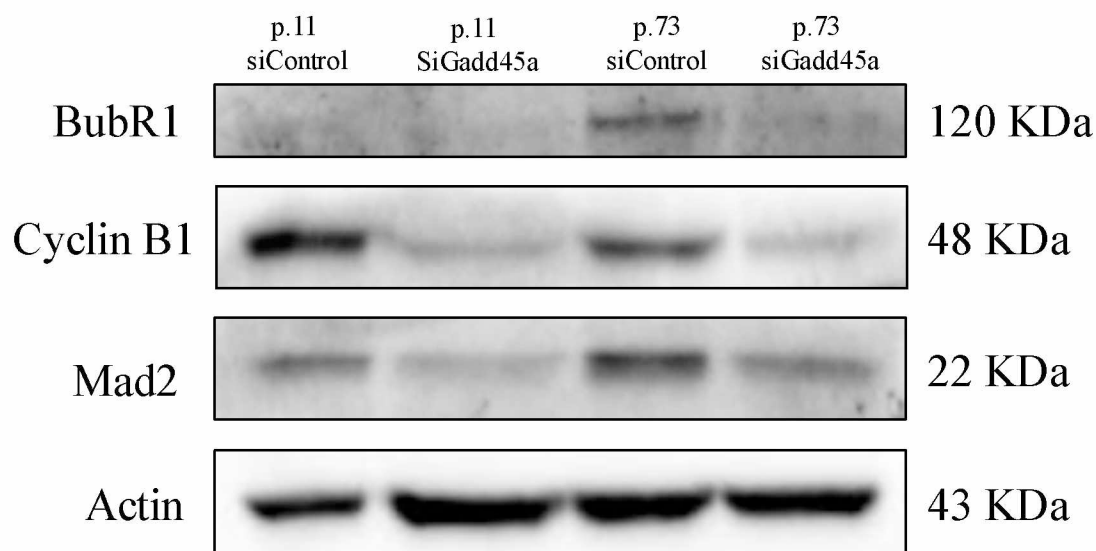
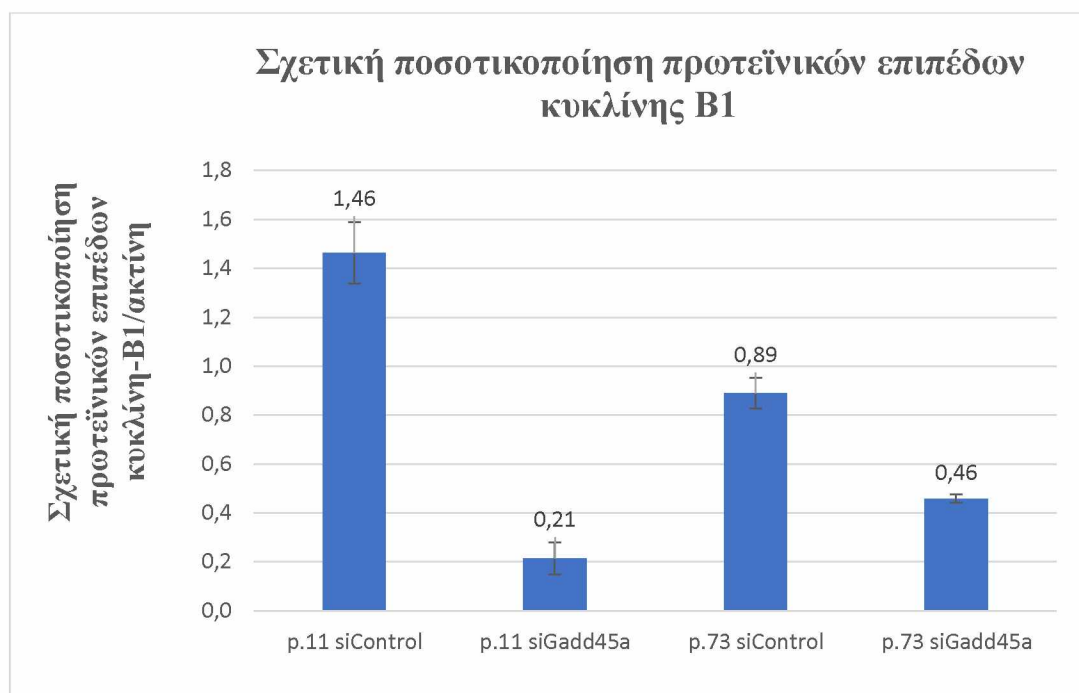


Figure 4: Ανοσοαποτύπωση Western για τις πρωτεΐνες κυκλίνη B1, BubR1 και Mad2 σε siControl και siGadd45a κύτταρα, παίρνοντας ως loading control την έκφραση της ακτίνης.

Παρακάτω αναλύονται οι σχετικές ποσοτικοποιήσεις των επιπέδων όλων των πρωτεϊνών που απεικονίζονται στο *Figure 4*, οι οποίες έγιναν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος ImageJ. Loading control σε όλες τις περιπτώσεις αποτελεί η έκφραση της ακτίνης.

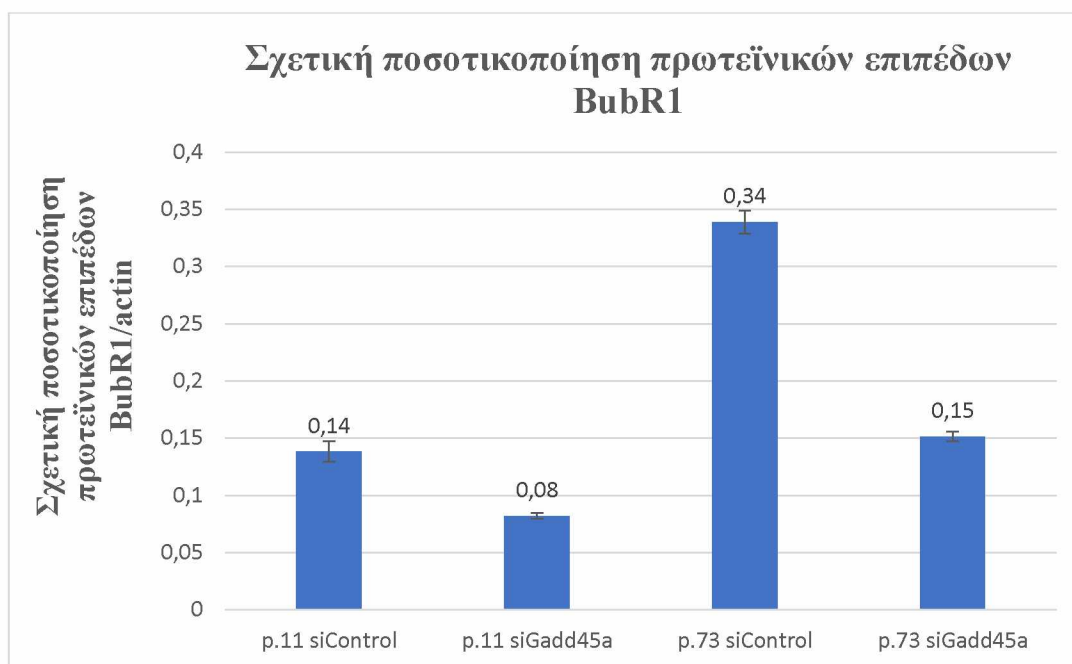
III.Δ.1. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης κυκλίνη B1



Διάγραμμα 4: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης κυκλίνη B1 σε siControl και siGadd45a κύτταρα. Η πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων από τα siControl στα siGadd45a είναι της τάξης του 85% στα νεαρά και 48% στα γηρασμένα.

- ❖ Στο *Διάγραμμα 4* παρατηρείται ελάττωση της κυκλίνης B1 από τα siControl στα siGadd45a κύτταρα. Συγκεκριμένα, στα p.11 μειώνεται κατά 85% και στα p.73 κατά 48%.

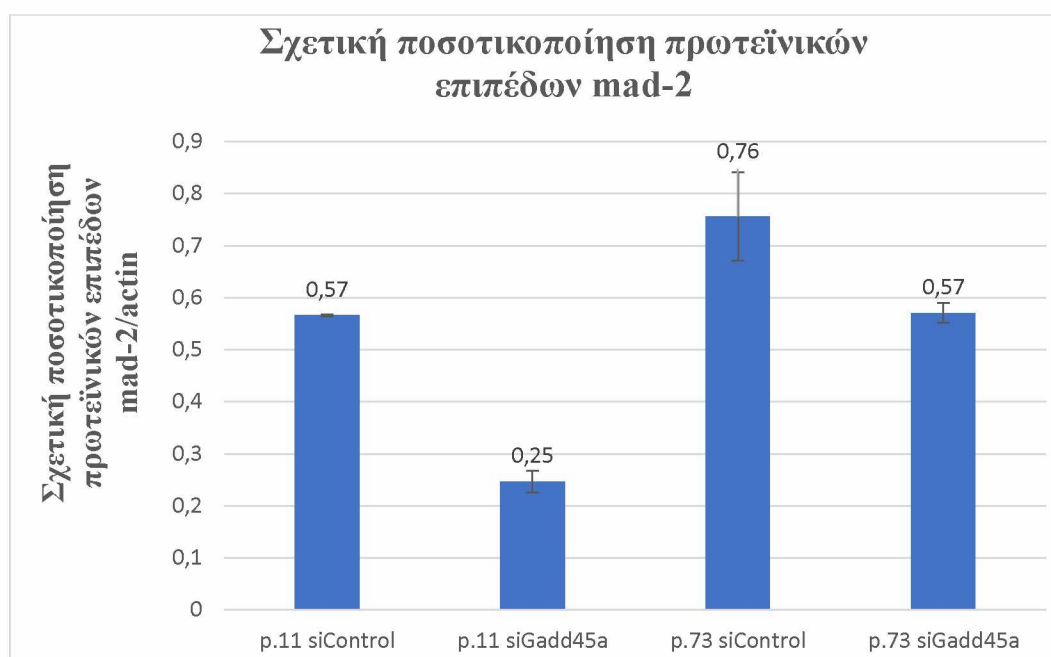
III.Δ.2. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης BubR1



Διάγραμμα 5: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης BubR1 σε siControl και siGadd45a κύτταρα. Σημειώνεται πτώση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της BubR1 από τα siControl στα siGadd45a κύτταρα. Στα p.11 μειώνονται κατά 40,6%, ενώ στα p.73 κατά 55,3%.

- ❖ Στο *Διάγραμμα 5* παρατηρείται ότι τα εκφραστικά επίπεδα της BubR1, σημαντικού μορίου του SAC μηχανισμού ελέγχου, ελαττώνονται στα κύτταρα όπου έχει γίνει αποσιώπηση της Gadd45a. Αναλυτικότερα, στα νεαρά κύτταρα η έκφρασή της BubR1 ελαττώνεται κατά 40,6%, ενώ στα γηρασμένα κατά 55,3%.

III.Δ.3. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Mad-2



Διάγραμμα 6: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης mad-2 σε siControl και siGadd45a κύτταρα. Η έκφραση της mad2 μειώνεται κατά 56,4% στα p.11 και 24,5% στα p.73, όπου αμφότερα έχει κατασταλεί η έκφραση της Gadd45a.

- ❖ Στο Διάγραμμα 6 διακρίνεται μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης mad2, επίσης μόριο του μηχανισμού SAC, από τα κύτταρα που έχουν φυσιολογική έκφραση της πρωτεΐνης Gadd45a προς τα κύτταρα όπου αποσιωπάται η κωδικοποίησή της. Η μείωση αυτή είναι της τάξης του 56,4% στα νεαρά, ενώ στα γηρασμένα 24,5%.

III.E. Εκτίμηση υπεράριθμων κεντροσωμάτων μετά από ανοσοφθορισμό

Χρησιμοποιώντας αντίσωμα για γ -τουμπουλίνη που ανιχνεύει τα κεντροσώματα, ελέγχεται στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού ο αριθμός των κεντροσωμάτων στα κύτταρα όπου εκφράζεται η πρωτεΐνη Gadd45a (si control) και σε αυτά που αποσιωπάται η έκφρασή της μέσω του siGadd45a.

Σημείωση: Τα πεδία που μετρήθηκαν ήταν 5 σε κάθε μία από τις επαναλήψεις και οι παρακάτω εικόνες είναι ενδεικτικές ενός συνόλου κυττάρων.

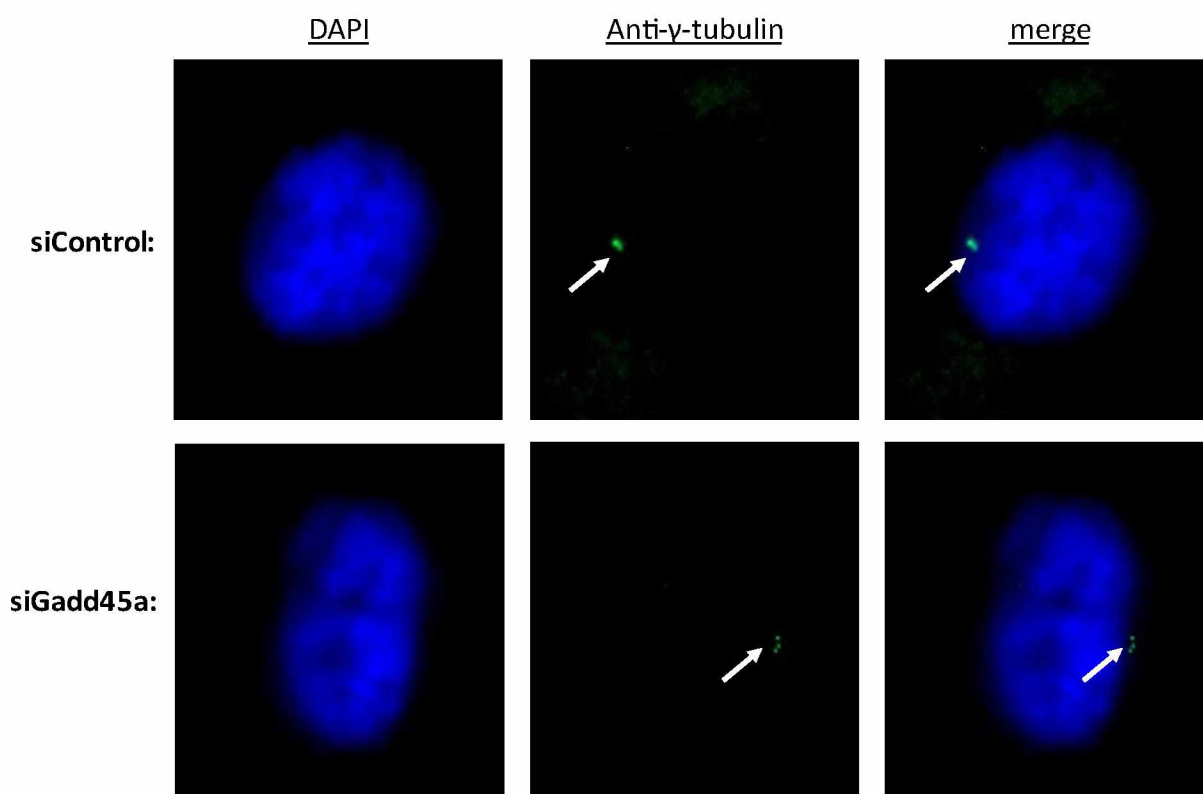
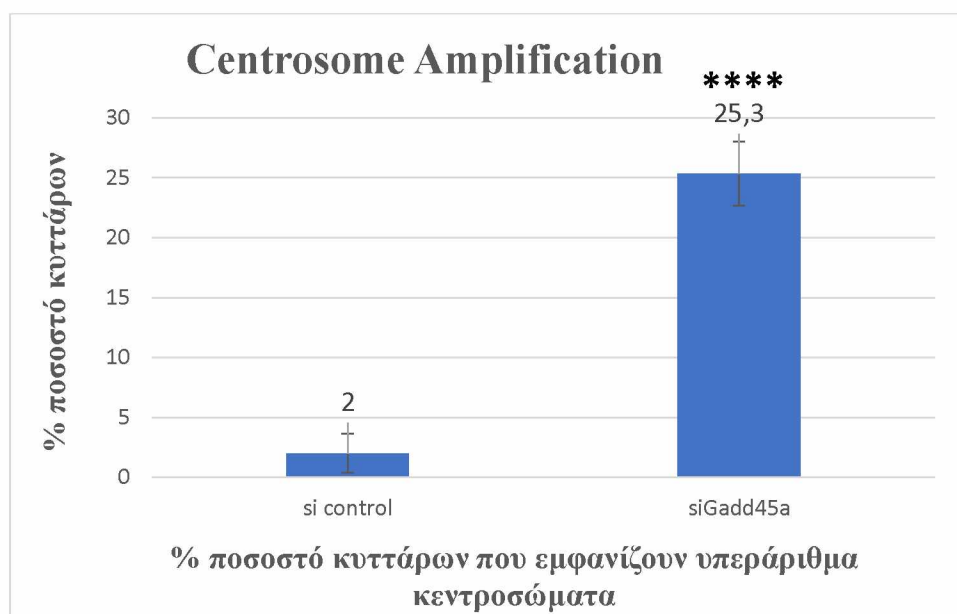


Figure 5: Αριθμός κεντροσωμάτων σε siControl και σε siGadd45a κύτταρα. Τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου *gadd45a* παρουσιάζουν υπεράριθμα κεντροσώματα, σε αντίθεση με τα siControl τους.

- ❖ Στο *Figure 5* διακρίνεται ότι σε συνθήκες αποσιώπησης της πρωτεΐνης Gadd45a, υπάρχει σχηματισμός ενός ακόμη κεντροσώματος κατά την πρόφαση της μίτωσης, σύνολο δηλαδή 3, το οποίο παραπέμπει στο φαινόμενο centrosome amplification. Αντίθετα, στις εικόνες του siControl παρατηρείται 1 κεντροσωμάτιο που διαιρείται σε 2 επιμέρους κατά το στάδιο της μεσόφασης προς την πρόφαση.

Επιπλέον, σε κάθε περίπτωση, έγινε μέτρηση των κυττάρων που παρουσιάζουν αυξήσεις σε αριθμό κεντροσωμάτων.

- ❖ Στα κύτταρα όπου αναστέλλεται η έκφραση της Gadd45a, τα κεντροσώματα είναι περισσότερα, σε αντίθεση με τα siControl. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό ως centrosome amplification, ανιχνεύεται στα τελευταία σε ποσοστό 2%, ενώ στα siGadd45a σε ποσοστό 25,3% με τιμή σημαντικότητας ίση με 0,000000126 (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Ποσοστό % κυττάρων που παρουσιάζουν υπεράριθμα κεντροσώματα σε κύτταρα με εκφρασμένη την πρωτεΐνη Gadd45a (siControl) και κύτταρα στα οποία αποσιωπάται η έκφρασή της (siGadd45a). Στα πρώτα παρατηρείται ένα ποσοστό 2% υπεράριθμων κεντροσωμάτων, ενώ στα siGadd45a το ποσοστό ανέρχεται στα 25,3% (p.value= 0,000000126 <<0,0001 =****).

IV. Συζήτηση

Η πρωτεΐνη Gadd45a είναι σημαντική για την γενωμική και κεντροσωμική ακεραιότητα του κυττάρου κατά τον κυτταρικό του κύκλο. Συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση του, στην επιδιόρθωση του DNA, στην αντιγραφή και την κυτταρική γήρανση. Στην παρούσα εργασία επιχειρήσαμε να βρούμε αν η απουσία της σε hMSCs επηρεάζει την ομαλή ολοκλήρωση της διαίρεσης του κυττάρου.

Τα πειράματα ξεκίνησαν με τη δημιουργία μεσεγχυματικών κυττάρων της γέλης του Wharton που δεν εκφράζουν Gadd45a, εισάγοντας siRNA σε νεαρά p.11 και γηρασμένα p.73 κύτταρα. Αρχικά, το siGadd45a εισήχθη στα κύτταρα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με western blot και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Gadd45a. Τελικά παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης κατά 56,1%.

Στην συνέχεια, επιδρώντας με ταξόλη στα κύτταρα siControl και siGadd45a, αμφότερα νεαρά και γερασμένα, είδαμε πόσα βρίσκονται στη μίτωση, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό διακοπής του κύκλου, SAC. Τα αποτελέσματα του mitotic shake off επιβεβαιώθηκαν κι από τα ποσοστά κυκλίνης B1 στα κύτταρα, η οποία αποικοδομείται όταν τα κύτταρα εξέλθουν από τη μετάφαση (το σημείο διακοπής του κυτταρικού κύκλου λόγω ενεργοποίησης του SAC). Όπως αναμέναμε, τα νεαρά p.11 siControl βρέθηκαν ως επί το πλείστον στη μίτωση σε ποσοστό 90,62%, ενώ στα αντίστοιχα γηρασμένα, το ποσοστό ήταν 68,75%. Η μείωση αυτή παρατηρείται πιθανά γιατί καθώς γερνάνε τα κύτταρα, η διαδικασία της διαίρεσης τους είναι πιο αργή, δηλαδή ο κυτταρικός τους κύκλος καθυστερεί να ολοκληρωθεί σε σύγκριση με τα νεότερα κύτταρα, τα οποία είναι ακόμα ικανά να διατηρούν την ομοιόστασή τους (Tomasetti et al., 2019). Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα που τελικά βρίσκονται στη μίτωση στο σύνολο των ζώντων κυττάρων, είναι όλο και λιγότερα όσο γερνάνε.

Τα siGadd45a κύτταρα που βρέθηκαν στη μίτωση ήταν μειωμένα κατά 36,9% στα νεαρά και κατά 38,8% στα γηρασμένα, σε σχέση με τα αντίστοιχα ποσοστά των siControl. Όπως γνωρίζουμε, τα κύτταρα παραμένουν στη μίτωση -διακόπτουν δηλαδή τον κυτταρικό κύκλο στη φάση της μετάφασης λόγω της παρουσίας ταξόλης μέσω της λειτουργίας του μηχανισμού SAC, επομένως η πτώση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα η αποσιώπηση της Gadd45a εμποδίζει τη λειτουργία του SAC και τα κύτταρα ξεφεύγουν από τη διακοπή του κύκλου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται mitotic slippage και έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο των κυττάρων από τη

φάση της μίτωσης, χωρίς να έχουν γίνει οι απαραίτητοι έλεγχοι. Εκτός του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στη μίτωση, το αποτέλεσμα μας ενισχύεται κι από την μείωση των επιπέδων της κυκλίνης B1, η αποικοδόμηση της οποίας σηματοδοτεί την μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση (Lok et al., 2020). Συνεπώς, τα μειωμένα επίπεδα κυκλίνης B1 στα siGadd45a κύτταρα που παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 85% και 48% σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα αντίστοιχα, συγκριτικά με τα siControl, έρχονται να υποστηρίξουν το προηγούμενο συμπέρασμα.

Τα πειράματα συνέχισαν με την εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων κάποιων κύριων μορίων του SAC, όπως οι πρωτεΐνες Mad2 και BubR1. Κατά τη γήρανση των κυττάρων τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυξήθηκαν στα siControl. Συγκεκριμένα, η έκφραση της BubR1 αυξήθηκε κατά 30%, ενώ της Mad2 κατά 33%. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες όπου τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα μειώνονται κατά τη γήρανση. Ωστόσο, στις περιπτώσεις αυτές είχαν χρησιμοποιηθεί knockout ποντίκια (D. J. Baker et al., 2004) και οωκύτταρα γουρουνιών (Ma et al., 2005), οπότε η συσχέτιση δεν είναι ακριβής και θα χρειαστούν περαιτέρω έρευνες για τη διελεύκανση της σχέσης μεταξύ κυτταρικής γήρανσης και πρωτεϊνικών επιπέδων του SAC.

Η επίδραση του siGadd45a στα βλαστοκύτταρα οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων των πρωτεϊνών BubR1 και Mad2 σε όλες τις περιπτώσεις. Αναλυτικότερα, στα p.11 η μείωση της BubR1 ήταν 40,6% ενώ της Mad2 56,4%, και η πτώση στα p.73 ήταν 55,3% και 24,5% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Hollander and Fornace (Hollander & Fornace, 2002), οι οποίοι υποστήριζαν ότι κύτταρα στα οποία υποεκφράζεται η πρωτεΐνη Gadd45a έχουν δυσλειτουργική κυτοκίνηση και ανωμαλίες κατά τη μίτωση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται και στα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων του SAC κι άρα πιθανή δυσλειτουργία ή/και απώλεια της λειτουργίας του.

Οι μέχρι τώρα έρευνες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Gadd45 είναι σημαντικές για τη ρύθμιση του G2/M checkpoint (Maeda et al., 2002), και ότι η Gadd45a παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του S checkpoint όπου συμβαίνει η αντιγραφή του γενετικού υλικού και των κεντροσωμάτων (Fornace, 2005).

Μέχρι στιγμής, έχει δείχθει ότι οι δυσλειτουργίες που εντοπίζονται λόγω έλλειψης της Gadd45a είναι κυρίως στην αντιγραφή του DNA και στην μίτωση. Σε ποντίκια όπου

έχει γίνει knockout το γονίδιο της πρωτεΐνης (*gadd45a*), έχει χαθεί η σωστή επαγωγή κυτταρικής γήρανσης και έχουν παρατηρηθεί υπεράριθμα κεντροσώματα κατά την μίτωση, που καταλήγουν σε πολυάριθμους πόλους της μιτωτικής ατράκτου και συνεπώς, σε μη λειτουργική κυτταροκίνηση (Hollander et al., 1999).

Στο παράρτημα III.E. παρατηρήθηκε το ίδιο ακριβώς και σε γηρασμένα WJ-MSCs. Σε p.73 siControl κύτταρα είδαμε φυσιολογικά 2 κεντροσώματα όπως περιμέναμε να συμβεί, καθώς όσο αυξάνονται οι διπλασιασμοί του πληθυσμού των κυττάρων και επάγεται γήρανση, τόσο συσσωρεύονται βλάβες του DNA και επάγεται η έκφραση της *Gadd45a*. Αντίθετα, σε αυτά που έγινε αποσιώπηση στην έκφρασή της, παρατηρήσαμε υπεράριθμα κεντροσώματα σε ποσοστό 25%. Προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου επίσης είχαν δείξει το φαινόμενο αυτό (γνωστό ως centrosome amplification) έπειτα από επιδράσεις με οξειδωτικό στρες (υπεροξείδιο του υδρογόνου) στις οποίες η πρωτεΐνη *Gadd45a* αργεί να ανταποκριθεί σε κύτταρα μεγαλύτερων σταδίων (p.33).

Για τη συσχέτιση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με το σημείο ελέγχου διαμόρφωσης της μιτωτικής ατράκτου (SAC) δεν έχουν υπάρξει σχετικές έρευνες. Τα πρωτότυπα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έρευνά μας εδώ, επιδεικνύουν μία σχέση της πρωτεΐνης αυτής με τη διακοπή του κύκλου μέσω λειτουργικού SAC και, συνεπώς, υπάρχει άμεση ανάγκη για επιπρόσθετες μελέτες για την εξακρίβωση του ρόλου της *Gadd45a* στο SAC, αλλά και τον κυτταρικό κύκλο. Αυτή η ανίχνευση του μοριακού μονοπατιού στο οποίο πιθανά συμμετέχει η *Gadd45a*, πιθανά να οδηγήσει και σε ερμηνεία των αλλαγών στη λειτουργία του SAC που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κυτταρικής γήρανσης.

V. Βιβλιογραφία

- Arnandis, T., Monteiro, P., Adams, S. D., Bridgeman, V. L., Rajeeve, V., Gadaleta, E., Marzec, J., Chelala, C., Malanchi, I., Cutillas, P. R., & Godinho, S. A. (2018). Oxidative Stress in Cells with Extra Centrosomes Drives Non-Cell-Autonomous Invasion. *Developmental Cell*, *47*(4), 409-424.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.10.026>
- Baker, C. L., & Pera, M. F. (2018). Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *22*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.011>
- Baker, D. J., Chen, J., & Van Deursen, J. M. A. (2005). The mitotic checkpoint in cancer and aging: What have mice taught us? *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(6), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.011>
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., De Groen, P. C., Roche, P., & Van Deursen, J. M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature Genetics*, *36*(7), 744–749. <https://doi.org/10.1038/ng1382>
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *37*(5 SPEC. ISS.), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>
- Bernadotte, A., Mikhelson, V. M., & Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*, *8*(1), 3–11. <https://doi.org/10.18632/aging.100871>
- Bernardes de Jesus, B., & Blasco, M. A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends in Genetics*, *29*(9), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.007>
- Blasiak, J. (2020). Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *77*(5), 789–805. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03420-x>
- Bokros, M., & Wang, Y. (2016). Spindle assembly checkpoint silencing and beyond. *Cell Cycle*, *15*(13), 1661–1662. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1176396>

- Bose, A., & Dalal, S. N. (2019). Centrosome amplification and tumorigenesis: cause or effect? *Results and Problems in Cell Differentiation*, *67*, 413–440. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23173-6_18
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, *99*(2), 1047–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>
- Chae, S., Yun, C., Um, H., Lee, J. H., & Cho, H. (2005). Centrosome amplification and multinuclear phenotypes are induced by hydrogen peroxide. *Experimental and Molecular Medicine*, *37*(5), 482–487. <https://doi.org/10.1038/emm.2005.59>
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, *1*(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Corbett, K. D. (2017). Molecular Mechanisms of Spindle Assembly Checkpoint Activation and Silencing. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, *56*, 429–455. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58592-5_18
- Cosenza, M. R., & Krämer, A. (2016). Centrosome amplification, chromosomal instability and cancer: mechanistic, clinical and therapeutic issues. *Chromosome Research*, *24*(1), 105–126. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9505-5>
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, *4*(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- Denham, M., Conley, B., Olsson, F., Cole, T. J., & Mollard, R. (2005). Stem cells: an overview. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.], Chapter 23*, 1–18. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2301s28>
- Diao, D., Wang, H., Li, T., Shi, Z., Jin, X., Sperka, T., Zhu, X., Zhang, M., Yang, F., Cong, Y., Shen, L., Zhan, Q., Yan, J., Song, Z., & Ju, Z. (2018). Telomeric epigenetic response mediated by Gadd45a regulates stem cell aging and lifespan. *EMBO Reports*, *19*(10), 1–15. <https://doi.org/10.15252/embr.201745494>

- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., Abramson, D. H., Shields, C. L., Chantada, G. L., Njuguna, F., & Gallie, B. L. (2015). Retinoblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(August). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>
- Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
- Dodig, S., Čepelak, I., & Pavić, I. (2019). Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia Medica*, 29(3), 1–15. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, Oxidative Stress and Biology of Ageing. *Insight Review Articles*, 408(November), 239–247. www.nature.com
- Fornace, A. J. (2005). *ND ES ABBREVIATIONS*. June.
- Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Letters*, 230(1), 6–19. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.028>
- Giardini, M. A., Segatto, M., Da Silva, M. S., Nunes, V. S., & Cano, M. I. N. (2014). Telomere and telomerase biology. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 125). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3>
- Goutas, A., Papathanasiou, I., Mourmoura, E., Tsesmelis, K., Tsezou, A., & Trachana, V. (2020). Oxidative stress response is mediated by overexpression and spatiotemporal regulation of caveolin-1. *Antioxidants*, 9(8), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox9080766>
- Harbour, J. W., Dean, D. C., Harbour, J. W., & Dean, D. C. (2000). *The Rb / E2F pathway : expanding roles and emerging paradigms*. 2393–2409. <https://doi.org/10.1101/gad.813200>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Hildesheim, J., Bulavin, D. V., Anver, M. R., Alvord, W. G., Hollander, M. C., Vardanian, L., & Fornace, A. J. (2002). Gadd45a protects against UV irradiation-

- induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Research*, 62(24), 7305–7315.
- Hohegger, H., Takeda, S., & Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11), 910–916. <https://doi.org/10.1038/nrm2510>
- Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., & Castro, J. P. (2017). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, 11(November 2016), 482–501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>
- Hollander, M. C., & Fornace, A. J. (2002). Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene*, 21(40 REV. ISS. 4), 6228–6233. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205774>
- Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T. A., Kim, K. E., Tolosa, E., Ashwell, J. D., Rosenberg, M. P., Zhan, Q., Fernández-Salguero, P. M., Morgan, W. F., Deng, C. X., & Fornace, A. J. (1999). Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nature Genetics*, 23(2), 176–184. <https://doi.org/10.1038/13802>
- Janikiewicz, J., Szymański, J., Malinska, D., Patalas-Krawczyk, P., Michalska, B., Duszyński, J., Giorgi, C., Bonora, M., Dobrzyn, A., & Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: Structure, function, and dynamics. *Cell Death and Disease*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0105-5>
- Ji, J., Liu, R., Tong, T., Song, Y., Jin, S., Wu, M., & Zhan, Q. (2007). Gadd45a regulates β -catenin distribution and maintains cell-cell adhesion/contact. *Oncogene*, 26(44), 6396–6405. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210469>
- Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 31, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative

- medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 22(22), R966–R980.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Liau, L. L., Ruszymah, B. H. I., Ng, M. H., & Law, J. X. (2020). Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Current Research in Translational Medicine*, 68(1), 5–16.
<https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.09.001>
- Liebermann, D. a, & Hoffman, B. (2013). Gadd45 Stress Sensor Genes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1–130. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8289-5>
- Lischetti, T., & Nilsson, J. (2015). Regulation of mitotic progression by the spindle assembly checkpoint. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(1), 1–11.
<https://doi.org/10.4161/23723548.2014.970484>
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 3–32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>
- Lok, T. M., Wang, Y., Xu, W. K., Xie, S., Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2020). Mitotic slippage is determined by p31^{comet} and the weakening of the spindle-assembly checkpoint. *Oncogene*, 39(13), 2819–2834.
<https://doi.org/10.1038/s41388-020-1187-6>
- Ma, W., Zhang, D., Hou, Y., Li, Y. H., Sun, Q. Y., Sun, X. F., & Wang, W. H. (2005). Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biology*

- of Reproduction*, 72(2), 373–383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030999>
- Maeda, T., Hanna, A. N., Sim, A. B., Chua, P. P., Chong, M. T., & Tron, V. A. (2002). GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(1), 22–26. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01781.x>
- Malumbres, M. (2014). *Characterization of in vitro and in vivo metabolism of AG-024322, a novel cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor*. 1–10.
- Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. (2019). Mesenchymal stem cells from the Wharton’s jelly of the human umbilical cord: Biological properties and therapeutic potential. *International Journal of Stem Cells*, 12(2), 218–226. <https://doi.org/10.15283/ijsc18034>
- Marston, A. L., & Wassmann, K. (2017). Multiple duties for spindle assembly checkpoint kinases in meiosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(DEC). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00109>
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>
- Mcintosh, J. R. (n.d.). *Mitosis*.
- Mirzaei, H., Sahebkar, A., Sichani, L. S., Moridikia, A., Nazari, S., Nahand, J. S., Salehi, H., Stenvang, J., Masoudifar, A., Mirzaei, H. R., & Jaafari, M. R. (2018). Therapeutic application of multipotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 2815–2823. <https://doi.org/10.1002/jcp.25990>
- Mohamad Kamal, N. S., Safuan, S., Shamsuddin, S., & Foroozandeh, P. (2020). Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *European Journal of Cell Biology*, 99(6), 151108. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151108>
- Monda, J. K., & Cheeseman, I. M. (2018). The kinetochore-microtubule interface at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(16). <https://doi.org/10.1242/jcs.214577>
- Monti, M. (2021). Perinatal Stem Cells - Biology, Manufacturing and Translational

- Medicine. In *European journal of histochemistry : EJH* (Vol. 65, Issue 3).
<https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3291>
- Moskalev, A. A., Smit-Mcbride, Z., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Tacutu, R., & Fraifeld, V. E. (2011). *Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies*.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.09.003>
- Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: The third decade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3595–3604. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0072>
- Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current Biology*, 25(20), R1002–R1018.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.051>
- Ohshima, S. (2012). Centrosome aberrations associated with cellular senescence and p53 localization at supernumerary centrosomes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/217594>
- Olivieri, F., Albertini, M. C., Orciani, M., Ceka, A., Cricca, M., Procopio, A. D., & Bonafè, M. (2015). DNA damage response (DDR) and senescence: Shuttled inflamma-miRNAs on the stage of inflamm-aging. *Oncotarget*, 6(34), 35509–35521. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5899>
- Paladino, F. V., De Rodrigues, J. M., Da Silva, A., & Goldberg, A. C. (2019). The immunomodulatory potential of wharton’s jelly mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3548917>
- Petr, M. A., Tulika, T., Carmona-Marin, L. M., & Scheibye-Knudsen, M. (2020). Protecting the Aging Genome. *Trends in Cell Biology*, 30(2), 117–132.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.12.001>
- Pospelova, T. V., Chitikova, Z. V., & Pospelov, V. A. (2013). An integrated approach for monitoring cell senescence. *Methods in Molecular Biology*, 965, 383–408.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_26
- Ranjbaran, H., Abediankenari, S., Mohammadi, M., Jafari, N., Khalilian, A., Rahmani, Z., Amiri, M. M., & Ebrahimi, P. (2018). Wharton’s jelly derived-

- mesenchymal stem cells: Isolation and characterization. *Acta Medica Iranica*, 56(1), 28–33.
- Rattan, S. I. S. (2016). *Healthy Ageing and Longevity Cellular Ageing and Replicative Senescence*. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-26239-0.pdf>
- Shao, S., Wang, Y., Jin, S., Song, Y., Wang, X., Fan, W., Zhao, Z., Fu, M., Tong, T., Dong, L., Fan, F., Xu, N., & Zhan, Q. (2006). Gadd45a interacts with aurora-A and inhibits its kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 28943–28950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600235200>
- Tomasetti, C., Poling, J., Roberts, N. J., London, N. R., Pittman, M. E., Haffner, M. C., Rizzo, A., Baras, A., Karim, B., Kim, A., Heaphy, C. M., Meeker, A. K., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C. A., & Vogelstein, B. (2019). Cell division rates decrease with age, providing a potential explanation for the age-dependent deceleration in cancer incidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(41), 20482–20488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905722116>
- Trachana, V., Petrakis, S., Fotiadis, Z., Siska, E. K., Balis, V., Gonos, E. S., Kaloyianni, M., & Koliakos, G. (2017). Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage. *Cytotherapy*, 19(7), 808–820. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.078>
- Virchov, R. (2016). *CNS Regenerative Medicine and Stem Cells*. November. <https://doi.org/10.20388/omp2016.001.0023>
- von Kobbe, C. (2018). Cellular senescence: a view throughout organismal life. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3553–3567. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2879-8>
- Wang, A. S., & Dreesen, O. (2018). Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Frontiers in Genetics*, 9(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00247>
- Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H. E., & Duerksen-Hughes, P. J. (2003). ATM, ATR and

DNA-PK: Initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis*, 24(10), 1571–1580. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg137>

Zhang, D., Zhang, W., Li, D., Fu, M., Chen, R., & Zhan, Q. (2015). GADD45A inhibits autophagy by regulating the interaction between BECN1 and PIK3C3. *Autophagy*, 11(12), 2247–2258. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1112484>