



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος της Gadd45a στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες κατά τη γήρανση των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων»

ΑΡΡΕΘΑ ΤΕΛΛΗΓΙΑΝΝΙΔΟΥ

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα), Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Παν/μίου Θεσσαλίας

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Μέλος), Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μίου Θεσσαλίας

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος), Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Παν/μίου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«The role of Gadd45a protein in response to oxidative stress during
the cellular senescence of mesenchymal stem cells »**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσε μέρος του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου» του τμήματος της Ιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε στο εργαστήριο κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής του ίδιου Πανεπιστημιακού Ιδρύματος.

Στη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης εργασίας ως επιβλέπουσα μου ήταν η κ. Τραχανά Βαρβάρα, την οποία πρώτη από όλους και μέσα από την καρδιά μου θέλω να ευχαριστήσω για όλα όσα από την αρχή μου έμαθε, για την αμέριστη υπομονή της και για την καλή της διάθεση πάντα. Επίσης, θερμά ευχαριστώ την κ. Ασπασία Τσέζου και τον Δήμα Κωνσταντίνο για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν σε ένα πολύ ενδιαφέρον μεταπτυχιακό πρόγραμμα, καθώς και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Ο υποψήφιος διδάκτωρ Ανδρέας Γούτας ήταν ο άνθρωπος που καθημερινά συνεργαζόμασταν και με το χαρακτήρα του, το ήθος του και τις επιστημονικές του ικανότητες μετέτρεψε την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής σε μία ευχάριστη και εξαιρετικά ενδιαφέρουσα διαδικασία. Οι συμβουλές του υπερπολύτιμες και ο ίδιος πάντα παρών. Ανδρέα σε ευχαριστώ για όλα όσα ξέρεις και για όλα όσα αδυνατώ με λόγια να εξηγήσω.

Τέλος, θερμά ευχαριστώ στον υπέροχο αδερφό μου Βαγγέλη, όχι μόνο για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη σε όλη αυτή την πορεία αλλά και για τη συμβολή του σε πιο πρακτικό επίπεδο, όπως επίσης και τους γονείς μου, οι οποίοι με στηρίζουν σε κάθε βήμα και απόφαση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες παρά τον αναγκαίο του ρόλο σε κάποιες βασικές κυτταρικές λειτουργίες, πολλές φορές δρουν καταστροφικά σε κύρια συστατικά του κυττάρου όπως το DNA προκαλώντας βλάβες που απειλούν τη γενωμική σταθερότητα. Η παρατεταμένη παραμονή του κυττάρου σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες επιφέρει την κυτταρική γήρανση. Η Gadd45a αποτελεί μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια μηχανισμών απόκρισης σε διάφορες μορφές στρες προάγοντας τη στάση του κυτταρικού κύκλου προς επιδιόρθωση των βλαβών του DNA και όταν αυτό δεν καταστεί εφικτό την απόπτωση ή την επιβίωση με συνέπεια την κυτταρική γήρανση.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια διερεύνησης της σχέσης οξειδωτικού στρες και έκφρασης του γονιδίου Gadd45a κάτι όχι επαρκώς μελετημένο, καθώς επίσης και το πώς αυτή επηρεάζεται κατά τη γήρανση των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Αρχικά καλλιεργήθηκαν τα βλαστοκύτταρα και προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά και μεταφραστικά επίπεδα του Gadd45a γονιδίου σε διάφορα ηλικιακά στάδια (passages) υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε εκ νέου αυτή τη φορά σε νεαρά και μέσης ηλικίας βλαστοκύτταρα που υπέστησαν εξωγενές οξειδωτικό στρες με τη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και αφέθηκαν να ανακάμψουν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τέλος μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Gadd45a μετά από επίδραση με UVB 250 j m^2 .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η Gadd45a πρωτεΐνη αυξάνεται αρκετά κατά τη γήρανση των βλαστοκυττάρων, ενώ η αύξηση της φαίνεται να είναι ραγδαία έπειτα από επίδραση με UVB, επιβεβαιώνοντας τις μέχρι τώρα μελέτες για τον ρόλο της στην απόκριση στο UB στρες. Σε ότι αφορά την επίδραση του οξειδωτικού στρες σε νεαρά και μεγαλύτερης ηλικίας βλαστοκύτταρα, η μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Gadd45a παρατηρείται σε μικρότερο χρόνο ανάκαμψης στα νεαρά από ότι στα γηρασμένα βλαστοκύτταρα, κάτι που υποδηλώνει πως τα πρώτα αποκρίνονται γρηγορότερα στο στρες. Σε επίπεδο mRNA μετά από επίδραση οξειδωτικού στρες παρατηρούμε μικρότερη απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών χρόνων ανάκαμψης στα γηρασμένα βλαστοκύτταρα σε αντίθεση με τα νεότερα, τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αύξηση του mRNA της Gadd45a στη 1h

ανάκαμψης από το στρες. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων διαφαίνεται ένας νέος ρόλος της Gadd45a που τη συσχετίζει με την απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες αλλά και ίσως στην επαγόμενη από το στρες κυτταρική γήρανση.

ABSTRACT

It is known that free radicals, despite their significance to some vital cell functions, have many disruptive effects on major constituents of the cell –such as the DNA– causing further damage to genomic stability. The extensive presence of the cell to oxidative stress causes cellular senescence. Gadd45a protein is involved in signaling pathways in response to various forms of stress, promoting the cell cycle attitude to repair DNA damage and, when this is not possible, the apoptosis or survival resulting, in its turn, in cellular aging.

The present thesis aims to study the relationship between oxidative stress and Gadd45a expression –a currently less studied field– as well as, the way this relationship is affected during human mesenchymal stem cell ageing. At first I cultivated the stem cells and I defined the transcriptional and translational levels of Gadd45a gene on different age stages (passages) under normal conditions. Then, the same gene was redefined in young and middle-aged stem-cells, after they had first been subjected to exogenous oxidative stress –with the use of hydrogen peroxide (H_2O_2)– and left to recover within various time periods. Finally, I studied the protein levels of Gadd45a, after it had been exposed to UVB 250 j m^2 .

According to the results of my research, Gadd45a protein significantly rises along with stem-cells ageing. At the same time, this rise seems to be more obvious after exposure to UVB, confirming current researches of the role of this protein in UB stress on young and older stem cells, the highest increase in Gadd45a levels is observed in a lower recovery time in the younger, rather than the older stem cells, indicating that the former respond faster to stress. Regarding mRNA, in the presence of oxidative stress, we observe a smaller deviation between the different recovery times in the older stem cells compared to the younger ones, with the latter showing a greatest increase of Gadd45a mRNA in an hour of stress relief.

As it derives from the aforementioned results, Gadd45a seems to be related to the response of cells to oxidative stress and, possibly, to stress-induced cellular senescence.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

EYXARISTIES	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	4
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. Τα Βλαστοκύτταρα.....	7
1.1. Ορισμός Βλαστικών Κυττάρων.....	7
1.2. Ιδιότητες Βλαστικών Κυττάρων.....	8
1.3. Είδη Βλαστικών Κυττάρων	9
1.4. Μεσεγχυματικά Ενήλικα Βλαστοκύτταρα (MSCs) - Wharton's jelly MSCs.	11
2. Η Γήρανση.....	12
2.1. Η Αναδιπλασιαστική Γήρανση (SR)	14
2.2. Η Γήρανση Επαγόμενη από το Οξειδωτικό Στρες.....	15
3. Το Οξειδωτικό Στρες.....	16
3.1. Οι Ελεύθερες Ρίζες	16
3.2. Η Δημιουργία των Ελευθέρων Ριζών	18
3.3. Βιολογικές Επιδράσεις των Ελευθέρων Ριζών	20
3.4. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	23
3.5. Το Οξειδωτικό Στρες.....	25
4. Η Οικογένεια των Πρωτεϊνών Gadd45	26
4.1. Η Δομή της Πρωτεΐνης Gadd	29
4.2. Ο Βιολογικός Ρόλος της Gadd45a.....	32
5. Σκοπός.....	34
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
1. Καλλιέργειες Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων.....	35
1.1. Υλικά Καλλιέργειας	35
1.2 Συνθήκες καλλιέργειας.....	35
1.3 Πρωτόκολλο Καλλιέργειας	36
2. Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες σε 6-well plates	37
3. Απομόνωση Πρωτεϊνών	39
3.1 Υλικά Απομόνωσης Πρωτεϊνών.....	39
3.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης Πρωτεϊνών.....	39
3.3 Υπολογισμός Ποσότητας Πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford.....	40
4. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμίδιου-SDS	41
4.1 Υλικά Ηλεκτροφόρησης Πρωτεϊνών.....	42
4.2 Αποδιάταξη Πρωτεϊνών	42

4.3 Διαχωρισμός Πρωτεϊνών	43
5. Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών – Western Blot	43
5.1 Υλικά Ανοσοαποτύπωσης	44
5.2 Πρωτόκολλο Ανοσοαποτύπωσης Πρωτεϊνών	44
6. Απομόνωση RNA	45
6.1 Υλικά Απομόνωσης RNA	45
6.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης RNA	46
7. Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA)	47
7.1 Υλικά για την Σύνθεση cDNA	47
7.2 Πρωτόκολλο Σύνδεσης cDNA	47
8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real time PCR)	49
8.1 Υλικά για την Real Time PCR	50
8.2 Πρωτόκολλο και Διάλυμα της Αντίδρασης για την Real Time PCR	50
9. Ανοσοϊστοχημεία	51
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
1. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνικών Επιπέδων της Gadd45a σε Ανθρώπινα Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα Ύστερα από Επίδραση με UVB Ακτινοβολία.	53
2. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνικών και Μεταγραφικών Επιπέδων της Gadd45a σε Διάφορα Ηλικιακά Στάδια Καλλιεργημένων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων	54
3. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνικών Επιπέδων της Gadd45a σε Διάφορα Ηλικιακά Στάδια Καλλιεργημένων Ανθρώπινων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων έπειτα από Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες	55
4. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μεταγραφικών Επιπέδων του Γονιδίου Gadd45a σε Διάφορα Ηλικιακά Στάδια Καλλιεργημένων Ανθρώπινων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων έπειτα από Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες.	57
5. Ποσοστιαία Μέτρηση των Κυττάρων με Βλάβες στο Γενετικό Υλικό σε κάθε Στάδιο Ανάκαμψης έπειτα από Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες Νεαρών και Μεσαίας Ηλικίας Καλλιεργημένων Ανθρώπινων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων	58
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Τα Βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα αποτελούν μία ομάδα κυττάρων εξαιρετικής σπουδαιότητας και βρίσκονται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς προσδίδοντάς τους τη δυνατότητα της φυσικής αναγέννησης. Στα κύτταρα αυτά οφείλεται η αναγέννηση των ιστών και ανακαλύφθηκαν το 1963 από τους James Till και Ernest McCulloch (BECKER, McCULLOCH and TILL, 1963).

Από τη μέρα ανακάλυψης τους βρίσκονται στο επίκεντρο ολόκληρης της επιστημονικής κοινότητας και πλέον η κυτταρική θεραπεία βασιζόμενη σε βλαστικά κύτταρα ερευνάται διαρκώς. Η εν λόγω θεραπεία μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο χειρουργικά όσο και μη επεμβατικά, όπως με ενέσιμη χορήγηση των βλαστοκυττάρων απευθείας στο σημείο στόχο της θεραπείας, τα οποία προέρχονται ή από τον ίδιο τον ασθενή ή από έναν δότη με υψηλή ιστοσυμβατότητα.

Η αναγεννητική ικανότητα των βλαστοκυττάρων δίνει νέες προοπτικές σε πολλές θεραπευτικές προσεγγίσεις ενώ παράλληλα γίνεται προσπάθεια αποσαφήνισης ερωτημάτων σχετικά με την ογκογένεση και τη γήρανση.

1.1.Ορισμός Βλαστικών Κυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα είναι μία ομάδα αρχέγονων κυττάρων από τα οποία προέρχονται όλα τα υπόλοιπα είδη κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού.

Οι ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν είναι οι εξής (Reubinoff *et al.*, 2000):

- (1) είναι κύτταρα αδιαφοροποίητα, δηλαδή έχουν απουσία δομών και πρωτεϊνών που είναι χαρακτηριστικές σε εξειδικευμένα είδη κυττάρων. Εν ολίγοις έχουν αδιαφοροποίητο φαινότυπο.
- (2) έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης μέσω των κυτταρικών διαιρέσεων.

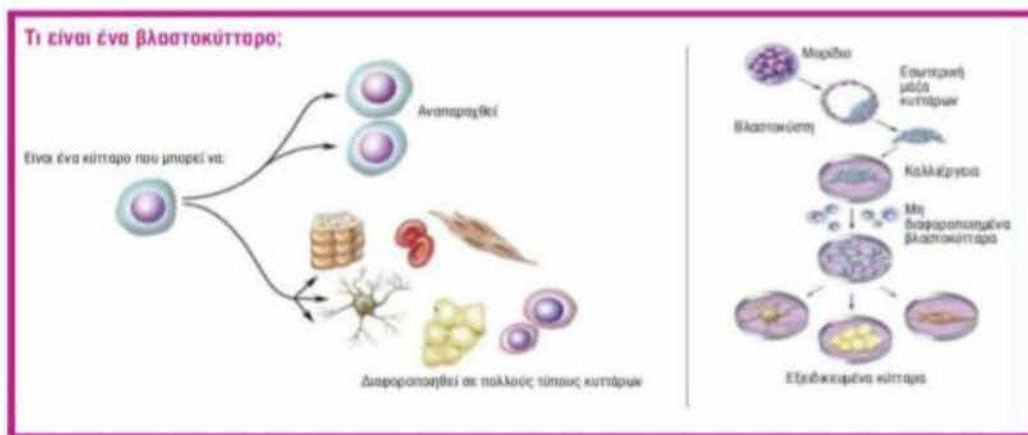
Αυτοανανέωση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα βλαστοκύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται χωρίς τα παραγόμενα κύτταρα να χάνουν το

δυναμικό διαφοροποίησης τους και χωρίς να επηρεάζονται από τη βιολογική γήρανση (Friedenstein, Gorskaja and Kulagina, 1976).

Η αυτοανανέωση τους γίνεται με συμμετρικό αλλά και ασύμμετρο τρόπο και επηρεάζεται από μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι παρεμποδίζουν τη διαφοροποίησή τους.

- (3) υπό συγκεκριμένες συνθήκες υπόκεινται σε διαφοροποίηση δημιουργώντας μία πληθώρα εξειδικευμένων διαφορετικών κυτταρικών τύπων ενός οργανισμού. Είναι δηλαδή πολυδύναμα.

Διαφοροποίηση είναι η σταδιακή εξειδίκευση τους σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (Gardner, 2002), η οποία ρυθμίζεται με σύνθετο τρόπο τόσο μέσω γονιδίων του ίδιου του βλαστικού κυττάρου όσο και από εξωκυττάρια σηματοδότηση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα (Carey *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της δυνατότητας των βλαστοκυττάρων τόσο για αυτοανανέωση όσο και για διαφοροποίηση (πηγή: ιστοσελίδα EKETA <https://www.certh.gr>)

1.2. Ιδιότητες Βλαστικών Κυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται από κάποιες ιδιότητές (Schöler, 2004) όπως είναι η διαφοροποίηση, η πλαστικότητα και η αυτοανανέωση, οι οποίες συνδυαζόμενες με άλλους παράγοντες καθορίζουν τη μοίρα τους.

Η ρύθμιση αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης τους παίζει πολύ σημαντικό ρόλο να βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας. Αυτό γιατί μία παρατεταμένη κατάσταση ανανέωσης ενδεχομένως καταλήξει σε ογκογένεση ενώ μία συνεχής διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων μπορεί να εξαντλήσει τα αποθέματά τους.

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των βλαστοκυττάρων που συμβάλλει στη διατήρηση αυτής της ισορροπίας είναι η ασύμμετρη διαίρεση (Morrison and Kimble, 2006).

Κατά αυτόν τον τρόπο διαίρεσης προκύπτουν δύο ισότιμα κύτταρα, ένα αδιαφοροποίητο που θα εξακολουθεί να έχει το ρόλο του βλαστικού κυττάρου όπως αυτό από το οποίο προήλθε και ένα που θα οδηγηθεί προς διαφοροποίηση.

Όταν όμως υπάρχει ανάγκη προς διεύρυνση της δεξαμενής των βλαστοκυττάρων είτε λόγω ανάπτυξης του οργανισμού είτε λόγω ιστικής αναγέννησης μετά από τραύμα, τότε τα βλαστοκύτταρα υπόκεινται σε διαδικασίες συμμετρικής διαίρεσης όπου είτε και τα δύο κύτταρα που προκύπτουν διατηρούν τις ιδιότητες των βλαστικών ή οδηγούνται σε διαφοροποίηση. Η ισορροπία ανάμεσα σε αυτούς τους δύο τρόπους διαίρεσης προέρχεται από διάφορα ενδογενή αναπτυξιακά σήματα και περιβαλλοντικά ερεθίσματα έτσι ώστε να διατηρείται ο απαραίτητος αριθμός τόσο βλαστικών αλλά και διαφοροποιημένων κυττάρων (Morrison and Kimble, 2006).

Παρόλο που τα ενήλικα σωματικά κύτταρα δεν είναι πολυδύναμα όσο τα εμβρυικά μπορούν να δώσουν διαφοροποιημένα κύτταρα και άλλων ιστών και όχι μόνο αυτού στον οποίο βρίσκονται. Βάσει λοιπόν της θεωρίας της πλαστικότητας (Eisenberg and Eisenberg, 2003) των βλαστικών κυττάρων, η δέσμευση των βλαστοκυττάρων σε μία κυτταρική σειρά δεν είναι μία αυστηρά καθορισμένη και μη αντιστρεπτή διαδικασία αλλά χαρακτηρίζεται από ελαστικότητα δίνοντας τη δυνατότητα στα βλαστοκύτταρα να ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα προερχόμενα από το μικροπεριβάλλον και έχουν να κάνουν με την αναγέννηση των ιστών.

1.3. Είδη Βλαστικών Κυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες:

- (1) Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells–ESCs), τα οποία προέρχονται από το έμβρυο και με τη σειρά τους διακρίνονται σε παντοδύναμα (totipotent) και ολοδύναμα (pluripotent).

 - Τα παντοδύναμα είναι τα κύτταρα που δημιουργούνται κατά τη γονιμοποίηση του ωαρίου έως και το στάδιο των 8 κυττάρων περίπου 4 μέρες μετά και μπορούν να δώσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους

για τη δημιουργία του εκάστοτε οργανισμού όπως και του ίδιου του εμβρύου (Bongso *et al.*, 1994).

- Τα ολοδύναμα είναι οι απόγονοι των παντοδύναμων και είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται δίνοντας κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών στιβάδων, του εξωδέρματος, του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος από όπου προκύπτουν όλοι οι κυτταρικοί τύποι που συναντώνται στον ενήλικα άνθρωπο χωρίς όμως να μπορούν να δημιουργήσουν το ίδιο το έμβρυο.

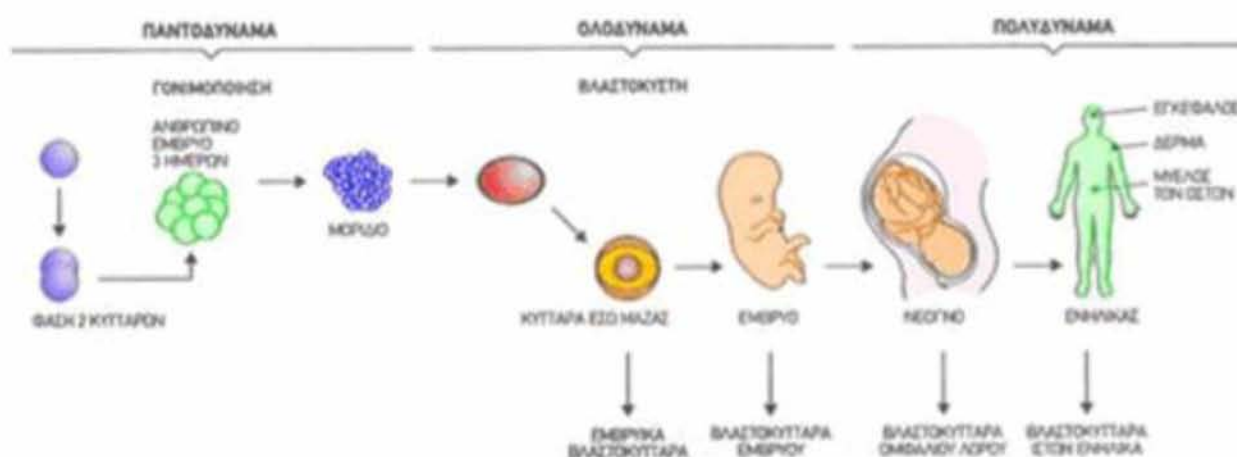
Η χρήση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων στην αναγεννητική Ιατρική διχάζει διότι παρά τα πλεονεκτήματά τους υπάρχει μεγάλη πιθανότητα τερατογένεσης και ανοσοδιέγερσης, όπως και ηθικά ζητήματα σε ότι αφορά τη δημιουργία και θανάτωση εμβρύων με αποκλειστικό σκοπό τη λήψη εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (Ong *et al.*, 2015).

(2) Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (Adult Stem Cells – ASC), τα οποία είναι κύτταρα μη διαφοροποιημένα που βρίσκονται ανάμεσα στα διαφοροποιημένα κύτταρα των ιστών και οργάνων του οργανισμού (Monette and Stockel, 1980), όπως για παράδειγμα ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός, ο εγκέφαλος, το δέρμα, οι σκελετικοί μύες, τα δόντια η καρδιά και άλλα όργανα. Διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποιούνται σε μυοκύτταρα, λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, μονοκύτταρα ώστε να παράξουν ακόμα πιο εξειδικευμένα κύτταρα ανάλογα με τον ιστό τον οποίο βρίσκονται.

Διακρίνονται σε πολυδύναμα (multipotent), ολιγοδύναμα (oligopotent) και μονοδύναμα (unipotent).

- Πολυδύναμα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι αυτά που βρίσκονται στο λιπώδη ιστό ή στο μυελό των οστών από τα οποία προκύπτουν οστεοκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, μονοκύτταρα ή λιποκύτταρα.
- Τα ολιγοδύναμα βλαστοκύτταρα έχουν μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης και είναι για παράδειγμα νευρικά βλαστικά κύτταρα που παράγουν κύτταρα μόνο του νευρικού συστήματος.
- τα μονοδύναμα δίνουν γένεση μόνο σε ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρου.

Σε σύγκριση με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα έχουν μικρότερη ικανότητα αυτοανανέωσης ενώ όσο αυξάνεται η ηλικία του ανθρώπου από τον οποίον προέρχονται μειώνεται τόσο το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό όσο και το δυναμικό διαφοροποίησής τους (Beane and Darling, 2012).



Εικόνα 1.2: Τα βλαστοκύτταρα ανάλογα με τη δυναμικότητά τους (πηγή: ιστοσελίδα ΕΚΕΤΑ, <https://www.certh.gr>)

1.4. Μεσεγχυματικά Ενήλικα Βλαστοκύτταρα (MSCs) - Wharton's jelly MSCs

Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα διαχωρίζονται σε αιμοποιητικά και σε μεσεγχυματικά (MSCs). Τα αιμοποιητικά προορίζονται για κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος ενώ στα μεσεγχυματικά εκλείπουν οι αιμοποιητικοί δείκτες.

Τα MSCs απομονώνονται από διάφορα σημεία του ανθρώπινου σώματος, έχοντας διαφορετικά χαρακτηριστικά αντίστοιχα, είναι πολυδύναμα και μπορούν να αυτοπολλαπλασιάζονται αλλά και να παράγουν πρόδρομους εξειδικευμένων κυττάρων (Bharathiraja *et al.*, 2014). Για παράδειγμα στα MSCs ανήκουν αυτά που βρίσκονται στο μυελό των οστών (BMSCs), στον λιπώδη ιστό (ASCs), στους μύες (MDSCs) και στο αρθρικό υγρό (SDSCs).

Στα ενήλικα βλαστοκύτταρα συγκαταλέγονται βλαστοκύτταρα που απομονώνονται από το αίμα του ομφάλιου λώρου (Wharton jelly), τις χοριακές

λάχνες (PMSCs) και το αμνιακό υγρό (AFSC) (Bobis, Jarocha and Majka, 2006).

Παλαιότερα η απομόνωσή τους γινόταν κυρίως από τον μυελό των οστών αντιμετωπίζοντας διάφορους κινδύνους και δυσκολίες. Σήμερα όμως η γέλη του Wharton, ένας βλενώδης συνδετικός ιστός που βρίσκεται στον ανθρώπινο ομφαλο και προστατεύει τα αιμοφόρα αγγεία του, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη πηγή μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (Wang *et al.*, 2004). Σε σύγκριση με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού, τα wj-MSCs έχουν λιγότερες γενετικές ανωμαλίες ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν αυξημένη δυνατότητα πολλαπλασιασμού και περισσότερες κυτταρικές διαιρέσεις μέχρι να επέλθει κυτταρική γήρανση (Troyer and Weiss, 2008). Τα wj-MSCs παρουσιάζουν κάποιους κοινούς δείκτες με τα εμβρυονικά όπως για παράδειγμα NANOG, SSEA3, SSEA4 και c-MYC (Gao *et al.*, 2013). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτόλογη μεταμόσχευση με το πιο σημαντικό τους πλεονέκτημα να είναι η εύκολη διαθεσιμότητα τους χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για τη μητέρα και το έμβρυο.

Τα wj-MSCs αποτέλεσε το κύριο υλικό πάνω στο οποίο διεξήχθησαν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και παραχωρήθηκαν από την εταιρεία biohellenika, αποκλειστικό εταίρο του Εθνικού Ιδρύματος ερευνών στον τομέα της φύλαξης βλαστικών κυττάρων.

2. Η Γήρανση

Το 1961, πρώτοι οι Hayflick και Moorhed καλλιεργώντας κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών παρατήρησαν πως μετά από ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων τα κύτταρα χάνουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα (Hayflick and Moorhead, 1961) παρόλο που παραμένουν ζωντανά και διατηρούν τη μεταβολική του δραστηριότητα (Matsumura, Zerrudo and Hayflick, 1979). Η παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί μια μόνιμη και μη αντιστρεπτή κατάσταση γνωστή ως φαινόμενο κυτταρικής γήρανσης (Hayflick, 1965). Παράλληλα με τη σταδιακή μείωση του πολλαπλασιαστικού τους δυναμικού, τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν δραματικές αλλαγές αλλά και διαφορετική γονιδιακή έκφραση (Baker *et al.*, 2011). Η ενεργοποίηση του p53 και μία σειρά από αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin dependent Kinase Inhibitors), p16 p21 που υπέρ εκφράζονται έχουν ως αποτέλεσμα

τα κύτταρα να μην μπορούν να υπερβούν το σημείο ελέγχου G1/S προς ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης παραβλέποντας τα μιτογόνα ερεθίσματα που δέχονται .

Το 1997 παρατηρήθηκε από ερευνητές πως ύστερα από υπερέκφραση κάποιων ογκογονιδίων όπως το HRAS, τα κύτταρα αντί να εισέλθουν σε φάση πολλαπλασιασμού οδηγήθηκαν σε διαδικασία γήρανσης (Serrano *et al.*, 1997). Επίσης βρέθηκαν γηρασμένα κύτταρα σε καλοήθεις όγκους αλλά και προκαρκινικές αλλοιώσεις. Έτσι διατυπώθηκε η υπόθεση πως η κυτταρική γήρανση αποτελεί έναν μηχανισμό των κυττάρων ο οποίος σταματά τον πολλαπλασιασμό αυτών, που το γενετικό τους υλικό έχει υποστεί ανεπανόρθωτες βλάβες με αρχικό σκοπό τη διακοπή διάδοσης μεταλλάξεων από το ένα κύτταρο στο άλλο και απώτερο την προστασία ολόκληρου του οργανισμού από μεταλλάξεις και καρκινογένεση (Bartkova *et al.*, 2006). Ωστόσο μετά την ανακάλυψη της κυτταρικής γήρανσης έγινε προσπάθεια συσχέτισης της με την γήρανση ολόκληρου του οργανισμού, ενώ γηρασμένα κύτταρα βρέθηκαν σε γερασμένο δέρμα (Dimri *et al.*, 1995) και σε παθολογικές καταστάσεις που είχαν σχέση με την αύξηση της ηλικίας (Gorgoulis *et al.*, 2005). Γι αυτούς τους λόγους θεωρείται πως η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στον οργανισμό μπορεί να συμβάλει στην εμφάνιση διαφόρων ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών όπως η οστεοαρθρίτιδα και η αρτηριοσκλήρυνση (Baker *et al.*, 2011). Μορφολογικά τα γηρασμένα κύτταρα είναι σχετικά μεγαλύτερα σε όγκο από τα νεαρά, διαθέτουν ένα πεπλατυσμένο σχήμα (Cristofalo and Kritchevsky, 1969), μεγαλύτερο αριθμό λυσοσωμάτων και αρκετά εξ αυτών πολλούς πυρήνες, ενώ υπερέκκρινουν μόρια όπως πρωτεάσες, κυτοκίνες, κολλαγενάσες και μεταλλοπρωτεϊνάσες και υπολείπονται σε αναστολεις των μεταλλοπρωτεϊνών και συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας όπως κολλαγόνο και ελαστίνη, με χαρακτηριστικότερη την ιδιότητά την αυξημένη δραστηριότητά του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση (b-gal) (Dutton *et al.*, 2004). Στα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζονται συγκεκριμένες δομές ετεροχρωματίνης γνωστές ως SAHFs (Senescence Associated Heterochromatin Foci). Τα SAHFs το σημαντικό ρόλο στην γήρανση καθώς εδράζονται στους υποκινητές γονιδίων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και ευθύνονται για την αποσιώπηση τους.

Η κυτταρική γήρανση διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες (Sikora *et al.*, 2011): την αναδιπλασιαστική (Replicative Senescence, RS) που προκύπτει όταν εξαντλείται το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του κυττάρου εξαιτίας της φθοράς των τελομερών (Dimri *et al.*, 1995) και την επαγόμενη από το στρες κυτταρική γήρανση

(Στρες_Induced Premature Senescence , SISS) που είναι ανεξάρτητη από το μήκος των τελομερών και προκύπτει από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες με κύριο το οξειδωτικό στρες που πλήττουν το κύτταρο (Sikora *et al.*, 2011).

2.1. Η Αναδιπλασιαστική Γήρανση (SR)

Η διαδικασία κατά την οποία το πολλαπλασιαστικό δυναμικό του κυττάρου μειώνεται σταδιακά μετά από έναν πραγματοποιούμενο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων ονομάζεται αναδιπλασιαστική γήρανση και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη μείωση του μήκους των τελομερών που συμβαίνει μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Όταν τα τελομερή φτάσουν να έχουν ένα συγκεκριμένο «κρίσιμο» μήκος τότε προκύπτει η ενεργοποίηση του φαινομένου της γήρανσης (Campisi, 2001). Τα τελομερή αποτελούνται από νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και προάγουν τη γενωμική σταθερότητα και μέσω αυτών προστατεύεται το γενετικό υλικό από διάφορες εξωνουκλεάσες, ενώ δίνεται η δυνατότητα στο κύτταρο να διαχωρίσει τα άκρα των χρωμοσωμάτων από τις δίκλωνες θραύσεις του DNA, οι οποίες κινητοποιούν μηχανισμούς επιδιόρθωσης και όχι της γήρανσης (D'Adda Di Fagagna *et al.*, 2003).

Η ακεραιότητα των τελομερών αναφέρεται ως βασικός ρυθμιστής της διάρκειας ζωής του κυττάρου (Vaziri and Benchimol, 1996; Flores *et al.*, 2008). Μια σταδιακή μείωση του τελομερούς σε συνάρτηση με την ηλικία έχει παρατηρηθεί σε ποντίκια (Flores *et al.*, 2008) και σε ανθρώπινους ιστούς (Harley, Futcher and Greider, 1990). Περαιτέρω αποδεικτικά στοιχεία υποστηρίζουν την ιδέα ότι η ηλικιακή συσχέτιση στο μήκος των τελομερών θα μπορούσε να συμβεί μέσω της απώλειας τελομεράσης, η οποία διατηρεί το μήκος των τελομερών. Οι μεταλλάξεις της τελομεράσης, οι οποίες απαντώνται σε ασθενείς με συγγενή δυσκινησία, που φέρουν βραχύτερα τελομερή, παρουσιάζουν πρόωρο φαινότυπο γήρανσης (Mitchell, Wood and Collins, 1999). Σε ένα μοντέλο ποντικού, η απώλεια της τελομεράσης προάγει την παραμόρφωση της γραμμής, η οποία είναι ένας από τους φαινοτύπους γήρανσης των HSCs (αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα) (Ju *et al.*, 2007). Η υπερέκφραση της τελομεράσης καθυστερεί την εμφάνιση φαινοτύπων που εξαρτώνται από την ηλικία και παρουσιάζει αντοχή στον καρκίνο (Tomás-Loba *et al.*, 2008). Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η μείωση των τελομερών ή η έλλειψη της λειτουργίας της τελομεράσης

μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία των ιστών .

Η τελομεράση, αποτελούμενη από μία καταλυτική υπομονάδα (Tert) και ένα τμήμα RNA (Terc), έχει ως βασική της λειτουργία την επιμήκυνση αλλά και τη διατήρηση του μήκους των τελομερών. Σε αντίθεση με κύτταρα αυξημένου πολλαπλασιαστικού δυναμικού όπως για παράδειγμα τα γεννητικά, στα ενήλικα βλαστοκύτταρα και σε κάποια αθάνατοποιημένα καρκινικά, η τελομεράση βρίσκεται υπό καταστολή στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα και δεν εκφράζεται. Ωστόσο βάσει διαφόρων μελετών, έχειδειχθεί πως μετά από ενεργοποίηση της έκφρασης της τελομεράσης και διατήρηση του μήκους των τελομερών, τα κύτταρά δεν φτάνουν απαραίτητα σε αθάνατοποίηση κάτι που αποδεικνύει πως η κυτταρική γήρανση αποτελεί ένα πολύ πιο σύνθετο φαινόμενο.

2.2. Η Γήρανση Επαγόμενη από το Οξειδωτικό Στρες

Το DNA είναι σχετικά ασταθές μόριο και επιρρεπές σε μεταλλάξεις μέσω των παραπροϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού όπως τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και περιβαλλοντικών προκαλούμενων αλλοιώσεων όπως η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία ή ακτινοβολία (IR). Η συσσώρευση της μη αναστρέψιμης βλάβης του γενωμικού DNA έχει εμπλακεί ως εξέχουσα αιτία της γήρανσης (Kenyon, 2010; Sperka, Wang and Rudolph, 2012; Eijkelenboom and Burgering, 2013) . Η εξαρτώμενη από WRN (σύνδρομο Werner- εξαρτώμενη από το ATP) ελικάση και ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) κινάση είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση του DNA, καθώς η απαλοιφή τους είτε οδηγεί σε πρόωρο φαινότυπο γήρανσης τα ποντίκια (Lombard *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2003).

Η διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας και της πιστότητας εξαρτάται από τους προστατευτικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA. Οι βλάβες που προκαλούνται από τα ROS επισκευάζονται με το μηχανισμό επισκευής εκτομής βάσης, ενώ η αποκατάσταση των διπλών κλώνων μετά από IR επιτυγχάνεται με επισκευή μέσω της εκτομής νουκλεοτιδίων (Blanpain *et al.*, 2011).

Η συσσώρευση της βλάβης του DNA έχει ως αποτέλεσμα την απόκριση κυττάρου στο σημείο ελέγχου, που ρυθμίζεται από τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, όπως τα p16^{Ink4a}, p19^{Arf} και p53 που οδηγούν σε διακοπή κυτταρικού κύκλου, γήρανση, απόπτωση ή διαφοροποίηση (Sperka, Wang and Rudolph, 2012; Signer and

Morrison, 2013). Οι p16^{Ink4a}, p19^{Arf} και p53 αυξάνονται με την ηλικία (Sperka, Wang and Rudolph, 2012) και η απώλεια τους συνδέεται με την εμφάνιση όγκων (Kemp *et al.*, 1993). Η απώλεια p16^{Ink4a} εξασθενεί την εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση του πολλαπλασιασμού και της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων (Janzen *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006). Σε αντίθεση με τους διαφοροποιημένους ιστούς, υπάρχει έλλειψη δεδομένων που δείχνουν ότι η γήρανση συμβαίνει σε βλαστικά κύτταρα *in vivo*. Είναι ενδιαφέρον ότι η επίδραση των γηρασμένων κυττάρων στην ομοιόσταση των ιστών μπορεί να είναι μέσω της επίδρασής τους στα γειτονικά κύτταρα μέσω έκκρισης παρακρινικών παραγόντων (Burtner and Kennedy, 2010).

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μιτοχονδρίων παράγει ROS, τα οποία είναι πολύ δραστικά και τοξικά για το μιτοχονδριακό (mt) DNA, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Kujoth *et al.*, 2005). Με την αύξηση της ηλικίας, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα ROS μαζί με δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια και θεωρούνται ως αιτία γήρανσης (Trifunovic *et al.*, 2004). Σε ομόζυγοι ποντικούς που κατασκευάστηκαν με σκοπό να εκφράσουν την πολυμεράση mtDNA με ελαττωματική ικανότητα ανάγνωσης της γενετικής πληροφορίας, βρέθηκαν αυξημένες σημειακές μεταλλάξεις στο mtDNA και απαλοιφές που σχετίζονται με μειωμένη διάρκεια ζωής και με φαινότυπο πρόωρης γήρανσης (Trifunovic *et al.*, 2004).

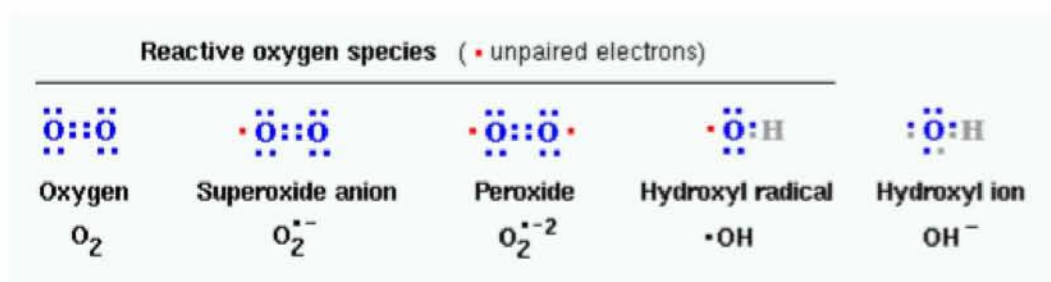
3. Το Οξειδωτικό Στρες

3.1. Οι Ελεύθερες Ρίζες

Στην εξωτερική στιβάδα των ατόμων και των μορίων κινούνται ηλεκτρόνια τα οποία συνήθως βρίσκονται σε ζεύγη. Κάθε άτομο, μόριο ή ιόν που με απώλεια ή προσθήκη ενός ηλεκτρονίου καταλήξει να έχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική ηλεκτρονιακή του στιβάδα θεωρείται ελεύθερη ρίζα (Halliwell and Gutteridge, 1991). Η ύπαρξη του μη συζευγμένου ηλεκτρονίου καθιστά το άτομο ή μόριο ασταθές και παράλληλα αυξάνει τη δραστηριότητά του, έχοντας την τάση να αντιδρά με γειτονικά μόρια στην προσπάθειά του να αποσπάσει το χαμένο του ηλεκτρόνιο από αυτά και να αποκαταστήσει τη σταθερότητα του

(Valavanidis *et al.*, 2006). Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους προκύπτουν μόρια που δεν είναι ρίζες και είναι συνήθως λιγότερο δραστικά από αυτά που προκάλεσαν την παραγωγή τους (Cheeseman and Slater, 1993), ενώ όταν αντιδρούν με μία μη ρίζα όπως για παράδειγμα τα βιολογικά συστατικά του κυττάρου τότε προκύπτουν νέες ρίζες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μία αλυσιδωτή αντίδραση με πολύ αρνητικές επιπτώσεις για τον οργανισμό (Aikens and Dix, 1991). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και παράγονται από μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την οποία απαιτείται υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman and Slater, 1993).

Η πιο σημαντική κατηγορία ελεύθερων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι αυτές που έχουν ως κέντρο τους το οξυγόνο και ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ) ή Reactive Oxygen Species (ROS) (Miller, Buettner and Aust, 1990). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται στις ενώσεις οι οποίες δημιουργούνται από το μοριακό οξυγόνο (O_2) με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων όπως και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία που δημιουργούνται από ενώσεις που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman and Slater, 1993). Οι ΔΜΟ συγκαταλέγουν τη ρίζα του υδροξυλίου (OH^\bullet), του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του υδρουπεροξειδίου (HO_2^\bullet), του υπεροξειδίου (RO_2^\bullet) και του αλκοξειδίου (RO^\bullet) όπως επίσης και μη ριζικά παράγωγα προερχόμενα από το οξυγόνο όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το μονήρες οξυγόνο (1O_2), το όζον (O_3) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) (Evans and Halliwell, 2001).



Εικόνα 3.1: Τα δραστικά είδη ριζών του O_2

Μία άλλη ομάδα ελεύθερων ριζών είναι οι Δραστικές Μορφές Αζώτου (ΔΜΑ) ή Reactive Nitrogen Species (RNS) όπου το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε άτομο αζώτου, με συνηθέστερη τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet), καθώς

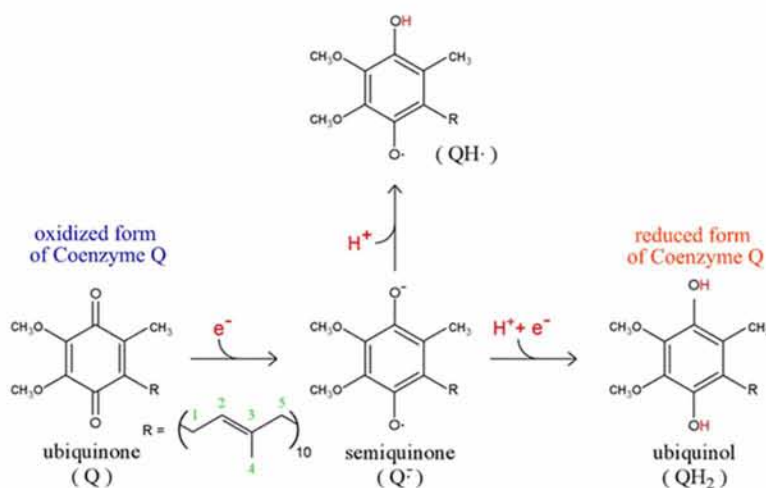
και δραστικές μορφές θείου (RSS) προερχόμενες από το θείο και τις δραστικές μορφές χλωρίου προερχόμενες από το χλώριο (RCS).

3.2. Η Δημιουργία των Ελευθέρων Ριζών

Τα ROS μπορεί να παράγονται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς ουσίες. Πιθανές ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν τα μιτοχόνδρια, τον μεταβολισμό του κυτοχρώματος P450, τα υπεροξυσώματα και την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης του κυττάρου.

Η κυριότερη πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου ενδογενώς στα κύτταρα είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση η οποία λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη τους (Cadenas and Sies, 1998). Κατά τη διάρκεια της μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH₂, το μοριακό οξυγόνο ανάγεται πλήρως σε νερό. Όμως, κατά την ατελή αναγωγή του οξυγόνου σε νερό στις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων που λαμβάνουν χώρα στην αναπνευστική αλυσίδα το μιτοχόνδριο παράγει σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το μόριο αυτό μπορεί να μην περιέχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια και αυτό δεν ανήκει στα δραστικά είδη ριζών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου εκτιμάται για να αντιπροσωπεύει περίπου το ~ 2% της συνολικής πρόσληψης οξυγόνου από τον οργανισμό. Ωστόσο, είναι δύσκολο να εντοπιστεί η ρίζα του υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια, πιθανότατα λόγω της υψηλής δράσης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) σε αυτό (Loschen, Flohé and Chance, 1971).

Η ημι-ουβικινόνη (Q⁻) έχει προταθεί ως το κύριο αναγωγικό παράγωγο του οξυγόνου στις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Τα μιτοχόνδρια παράγουν περίπου 2-3 nmol υπεροξείδιο / λεπτό ανά mg πρωτεΐνης, και η πανταχού παρουσία της υποδηλώνει ότι το μιτοχόνδριο είναι η πιο σημαντική φυσιολογική πηγή αυτής της ρίζας σε ζωντανούς οργανισμούς (Cadenas and Davies, 2000).



Εικόνα 3.2: Περιγραφή των αντιδράσεων οξείδωσης και αναγωγής του συνενζύμου Q.

Μία επιπρόσθετη ενδογενής πηγή παραγωγής ενεργών ειδών του οξυγόνου είναι τα ουδετερόφιλα, τα ιοσινόφιλα και τα μακροφάγα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα αποτελούν την αφετηρία υψηλής πρόσληψης οξυγόνου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης του ανιόντος του υπεροξειδίου, της νιτρικής ρίζας (NO) και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επίσης το κυτόχρωμα P450 έχει προταθεί ως πηγή ενεργών ειδών του οξυγόνου, μέσω της επαγωγής της δράσης των ενζύμων του με τελικό αποτέλεσμα την κατάρρευση ή την αποσύζευξη του P450 καταλυτικού κύκλου (Conner and Grisham, 1996).

Επιπλέον, τα μικροσώματα και τα υπεροξυσώματα είναι πηγές ROS και πιο συγκεκριμένα τα μικροσώματα είναι υπεύθυνα για το 80% της συγκέντρωσης του H_2O_2 που παράγεται συγκέντρωση που παράγεται *in vivo* σε υπεροξία. Τα υπεροξυσώματα είναι γνωστό ότι παράγουν H_2O_2 , αλλά όχι $\text{O}_2^{\bullet -}$, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης η οξείδωση των λιπαρών οξέων που λαμβάνει χώρα στα υπεροξυσώματα αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως δυνητικά σημαντική πηγή παραγωγής H_2O_2 ως αποτέλεσμα παρατεταμένης πείνας (Gupta *et al.*, 1997). Επιπλέον, μόρια όπως οιθειόλες, οι κατεχολαμίνες και η αιμοσφαιρίνη έχουν τη δυνατότητα να αυτοοξειδώνονται δίνοντας το ανιόν του σουπεροξειδίου (Bindoli, Rigobello and Deebble, 1992). Τέλος, οι εξωγενείς παράγοντες που ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αποτελούν το άγχος, η ηλιακή ακτινοβολία όπως και κάποιοι τύποι ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, το όζον, ο καπνός του τσιγάρου και η ατμοσφαιρική ρύπανση. Εκτός αυτών υπεύθυνη μπορεί να είναι η δράση ορισμένων

φαρμάκων (Ray *et al.*, 2001) κάποια ξενοβιοτικά, το αλκοόλ (Jones *et al.*, 2000), εντομοκτόνα ή άλλες τοξικές ουσίες.

3.3. Βιολογικές Επιδράσεις των Ελευθέρων Ριζών

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες δρουν ευεργετικά προωθώντας την ομαλή διεξαγωγή ορισμένων βασικών βιολογικών λειτουργιών. Συγκεκριμένα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μεταγωγή σήματος (Reid, 2001) μέσω της δυνατότητάς τους να τροποποιούν τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών με τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Κάποιες κατηγορίες αυτών των πρωτεϊνών είναι η MAP κινάσες, οι φωσφατάσες και αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες (Mulder, 2000). Όπως προαναφέρθηκε βοηθούν στην άμυνα του οργανισμού καθότι ενισχύουν τη δράση των μακροφάγων κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης ενάντια σε βακτήρια και υικούς εισβολείς. Ρυθμίζουν μηχανισμούς που αφορούν την ανοσία, την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μυική κόπωση (Fehrenbach and Northoff, 2001). Τέλος, συμβάλλουν στην επούλωση των πληγών και στη διαδικασία της αγγειογένεσης.

Υπό ορισμένες συνθήκες όταν οι ελεύθερες ρίζες υπερβούν κάποια φυσιολογικά επίπεδα δεν αναιρείται απλά ο ευεργετικός τους ρόλος αλλά μπορούν να καταλήξουν και καταστροφικές για τον οργανισμό. Λόγω της υψηλής δραστηριότητας τους έχουν την τάση να αλληλεπιδρούν και να προκαλούν βλάβες στα περισσότερα βασικά δομικά συστατικά του οργανισμού συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων των πρωτεϊνών και του DNA (Halliwell, 2007).

3.3.1. Η Λιπιδική Υπεροξείδωση

Η διαδικασία οξείδωσης των λιπιδίων είναι η πιο εκτενώς μελετημένη έναντι των άλλων βιολογικών μακρομορίων μιας και αυτά επιδεικνύουν αρκετά μεγάλη ευαισθησία στην οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που συνδέονται στα φωσfolιπίδια, τα βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών υποκύπτουν εύκολα σε λιπιδιακή υπεροξείδωση (Siems, Grune and Esterbauer, 1995). Το φαινόμενο αυτό αποτελεί μία αλυσιδωτή αντίδραση κυκλικά ανατροφοδοτούμενη που αν ξεκινήσει και δεν ανασταλεί εγκαίρως προκαλεί την παραγωγή υπεροξειδίου ROO[·], μηνολικής διαλδεύδης (MDA) και συζυγών

διενίων (Wang *et al.*, 1996). Οι λιποϋπεροξειδικές ρίζες (ROO^\cdot) μπορούν να διαδώσουν τη λιπιδική υπεροξείδωση και σε άλλα λιπαρά οξέα (Clarkson and Thompson, 2000). Η εκτεταμένη λιπιδιακή υπεροξείδωση των βιολογικών μεμβρανών διαταράσσει τη ρευστότητά τους, μειώνει το μεμβρανικό δυναμικό, αυξάνει τη διαπερατότητα τους σε Ca^{2+} και H^+ και πιθανά να οδηγήσει σε λύση των μεμβρανών με συνέπεια την απελευθέρωση των συστατικών του κυττάρου (Clarkson and Thompson, 2000).

3.3.2. Η Οξειδωτική Βλάβη Πάνω στα Μόρια των Πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια αποτελούν στόχο των ελεύθερων ριζών (Dunlop, Brunk and Rodgers, 2011). Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοτελικών άκρων και κυρίως αυτών που περιέχουν μεθειονίνη και κυστεΐνη είναι ευάλωτες στην οξείδωση των ελεύθερων ριζών (Stadtman, 2004). Η οξειδωτική μετατροπή των πρωτεϊνών αποδείχτηκε πρόσφατα πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος εκτός αλλά και ανάμεσα στα κύτταρα (redox signaling) (Brewer *et al.*, 2015).

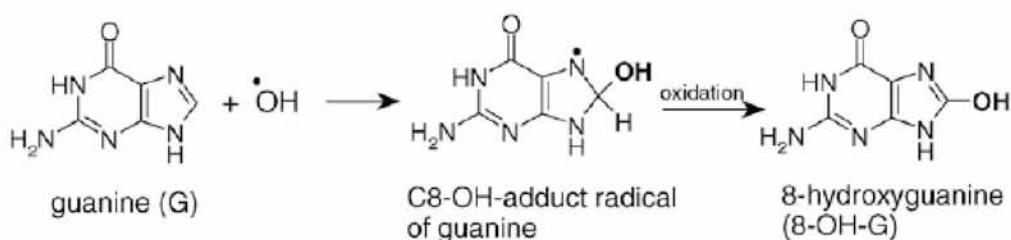
Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην οξείδωση των πρωτεϊνών από τα ROS διασαφηνίστηκαν με μελέτες στις οποίες τα αμινοξέα, απλά πεπτίδια και πρωτεΐνες εκτέθηκαν σε ιονίζουσες ακτινοβολίες, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ή μίγματος από ρίζες υδροξυλίου / υπεροξειδίου που οδηγούν σε αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από τον σκελετό πολυπεπτιδίου πρωτεΐνης για να σχηματίσουν μια ρίζα με βάση τον άνθρακα, η οποία υπό αερόβιες συνθήκες αντιδρά εύκολα με διοξυγόνο για να σχηματίσει υπεροξυλικές ρίζες (Stadtman, 2004). Το αποτέλεσμα της οξείδωσης τους από τις ROS μπορεί να τροποποιήσει την τριτοταγή τους δομή, να προκαλέσει εκφυλισμό και θρυμματισμό καθώς και απώλεια της λειτουργικότητάς τους (Levine, 2002).

3.3.3. Οι Βλάβες στο Μόριο του Γενωμικού και του Μιτοχονδριακού DNA

Παρόλο που το DNA είναι ένα σταθερό και αρκετά προστατευμένο μόριο μπορεί και αυτό να υποστεί βλάβες προερχόμενες από τις ελεύθερες ρίζες και κυρίως από τη ρίζα υδροξυλίου (Halliwell and Cross, 1994). Η ρίζα υδροξυλίου είναι γνωστό ότι αντιδρά με όλα τα συστατικά του μορίου DNA από την προσβολή των πουρινών

και των πυριμιδινών του μέχρι και αυτή πάνω στη δεοξυριβοζική ραχοκοκαλιά του μορίου. Εκτιμάται ότι ένα ανθρώπινο κύτταρο εκτίθεται σε οξειδωτικό περίπου $1,5 \cdot 10^5$ προσβολές την ημέρα από ρίζες υδροξυλίου και άλλα αντιδρώντα είδη (Beckman and Ames, 1997).

Η γνωστότερη βλάβη στο DNA είναι η δημιουργία 8-υδροξυγουανίνης (8-OH-G) και πραγματοποιείται με προσθήκη του υδροξυλίου στις θέσεις C8 οκτώ τις βάσης γουανίνης. Η 8-OH-G θεωρείται και δείκτης βλαβών του DNA από τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell and Whiteman, 2004). Ενώ οι οξειδωμένες πρωτεΐνες συνήθως κατακερματίζονται και τα αμινοξέα τους χρησιμοποιούνται εκ νέου, το οξειδωμένο DNA είναι δυνατόν να διορθωθεί επιτόπου αλλά η ανεπαρκής επιδιόρθωση του οδηγεί σε ενσωμάτωση των μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό κάτι που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση (Dizdaroglu, 1991).



Εικόνα 3.3: Η προσβολή της αζωτούχου βάσεως γουανίνης από την ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (Valco *et al.*, 2006).

Επίσης είναι γνωστό ότι το μιτοχondριακό DNA είναι πιο επιδεκτικό σε οξειδωτικές βλάβες σε σχέση με το πυρηνικό. Σε φυσιολογικές συνθήκες τα μιτοχόνδρια μετατρέπουν το 5% του οξυγόνου που καταναλώνουν σε ανιόν του υπεροξειδίου και άρα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Επίσης η ικανότητα επιδιόρθωσης του μιτοχondριακού DNA είναι περιορισμένη, δεδομένου ότι στερούνται εξ ολοκλήρου τους μηχανισμούς της επισκευής και αποκοπής των νουκλεοτιδίων. Τέλος το μιτοχondριακό DNA δεν προστατεύεται από ιστόνες (Valko *et al.*, 2006).

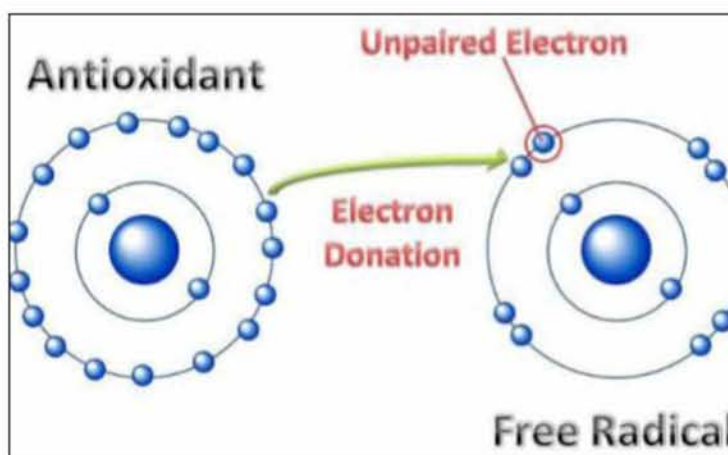
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλα δραστικά είδη οξυγόνου έχουν ενοχοποιηθεί για την ενεργοποίηση των πυρηνικών γονιδίων που εμπλέκονται στη μιτοχondριακή βιογένεση, τη μεταγραφή και την αντιγραφή του μιτοχondριακού

γονιδιώματος. Υπάρχουν θεωρίες και δεδομένα, αν και ακόμη δεν έχει αποδειχθεί ότι τα θραύσματα του μιτοχονδριακού DNA βρέθηκαν να εισάγονται στο πυρηνικό DNA, υποδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό για την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων (Marnett, 2000).

3.4. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Η προσβολή από τις ελεύθερες ρίζες ανάγκασε τους οργανισμούς να αναπτύξουν αμυντικούς μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να προλαμβάνουν να επιδιορθώνουν να αποτελούν άμυνα ή να είναι αντιοξειδωτικές ουσίες, διότι η άνευ ελέγχου παραγωγή ελευθέρων ριζών θα αποδομούσε τη σύσταση του κυττάρου οδηγώντας το στο θάνατο (Cadenas, 1997).

Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται κάθε ουσία που σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα είναι ικανή να αναστείλει ή να επιβραδύνει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky, 2002). Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παρεμποδίζουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, τις μετατρέπουν σε λιγότερο δραστικά μόρια ή συμβάλλουν στην επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν ήδη προκληθεί από τις ρίζες. Διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς διότι κάποιες από αυτές προσλαμβάνονται μέσω της τροφής και ανάλογα με τη χημική τους δράση σε ενζυμικές ή μη ενζυμικές.



Εικόνα 3.4: Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης

Στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου συγκαταλέγονται ενδογενή ένζυμα όπως:

(α) η υπεροξειδική δισμουτάση SOD

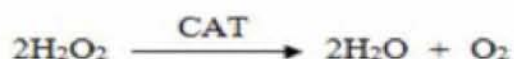
Είναι ένα ένζυμο που η βιολογική του δράση ανακαλύφθηκε το 1969 από τους Fridovich και McCord και αναγνωρίστηκε η σημασία του στην επιβίωση των αερόβιων οργανισμών (McCord and Fridovich, 2014). Είναι ίσως το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο και μετατρέπει το ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) βάσει της ακόλουθης αντίδρασης:



Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται στα μιτοχόνδρια κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωση και εκεί η αναγωγή του πραγματοποιείται από την μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ μετά τη διαρροή του στο κυτταρόπλασμα η αναγωγή γίνεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu-Zn-SOD) (Powers and Lennon, 1999).

(β) η καταλάση CAT

Η καταλάση απαντά στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Δεν ανευρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ύδωρ και οξυγόνο σε δύο στάδια (Mates et al., 1999).



(γ) η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Αποτελεί ενζύμου που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια το κυτταρόπλασμα αλλά και εξωτερικά των κυττάρων. Χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη για να καταλύσει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O βάσει της αντίδρασης:

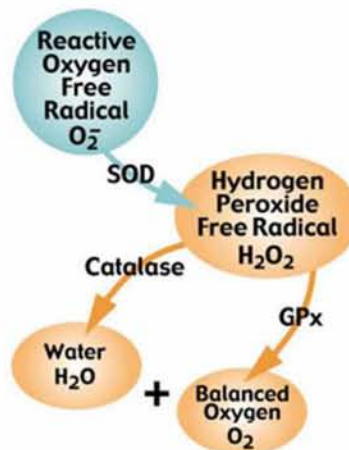


όπου: $\text{GSH} \rightarrow$ ανηγμένη γλουταθειόνη

$\text{GSSG} \rightarrow$ οξειδωμένη γλουταθειόνη

(δ) η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Είναι ένα ένζυμο που ανάγει την GSSG σε GSH ώστε να διατηρείται η φυσιολογική αναλογία τους μέσα στο κύτταρο (Antunes, Han and Cadenas, 2002).



Εικόνα 3.5: Περιγραφή της δράσης των χημειοπροστατευτικών ενζύμων

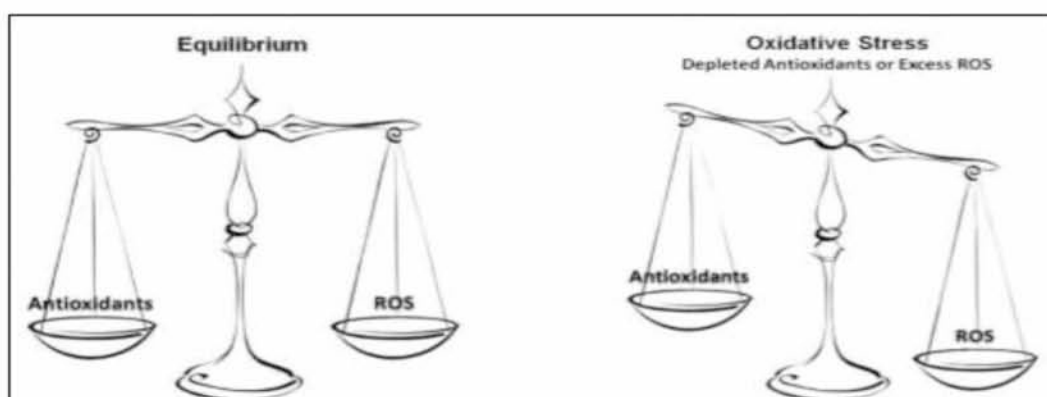
Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται η βιταμίνη Α (ρετινόλη), η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τα φλαβονοειδή, οι θειόλες (συνένζυμο Q10, ουρικό οξύ, γλουταθειόνη, φεριτίνη, χολερυθρίνη) όπως και διάφορα ιχνοστοιχεία (μαγνήσιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, σελήνιο) που δρουν σαν ενζυμικοί συμπαραγόντες (Khallouki *et al.*, 2003).

3.5. Το Οξειδωτικό Στρες

Σε όλα τα βιολογικά συστήματα είναι υψίστης σημασίας η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή και στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών από αυτά. Η κατάσταση στην οποία διαταράσσεται αυτή η ισορροπία και οι συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (Pisoschi and Pop, 2015). Το οξειδωτικό στρες προκαλείται υπό τις εξής συνθήκες:

(α) όταν η δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπολειτουργεί. Αυτό προκαλείται είτε από μεταλλάξεις και τοξικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μειωμένη λήψη αντιοξειδωτικών ουσιών μέσω διατροφής.

(β) όταν η παραγωγή ελευθέρων ριζών αυξάνεται εξαιτίας της ύπαρξης διαφόρων προαναφερθέντων παραγόντων που ευνοούν την παραγωγή ROS.



Εικόνα 3.6: η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσής των ελευθέρων ριζών από τον οργανισμό οδηγεί σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες.

Έχει αποδειχθεί ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια πληθώρας παθολογικών καταστάσεων. Κάποιες από τις σημαντικότερες ασθένειες που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες είναι η παχυσαρκία, ο καρκίνος, διάφορες καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, το AIDS, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοαρθρίτιδα αλλά και η γήρανση (Valko *et al.*, 2007).

4. Η Οικογένεια των Πρωτεϊνών Gadd45

Η διαδικασία της απόκρισης στο κυτταρικό στρες είναι ένας σύνθετος μηχανισμός, που περιλαμβάνει πολλά μοριακά μονοπατιών και πληθώρα ρυθμιστών και τελεστών. Σύμφωνα με προκύπτοντα στοιχεία αποδεικνύεται ότι η οικογένεια πρωτεϊνών Gadd45 διαδραματίζει έναν μοναδικό και κρίσιμο ρόλο ως αισθητήρες του στρες, συμπεριλαμβανομένου του γονιδιοτοξικού, του φυσιολογικού και του ογκογόνου στρες. Η αποκρινόμενη στο στρες οικογένεια γονιδίων Gadd45 (Gadd45a, Gadd45b, και Gadd45g), είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση μικρών (18 kDa)

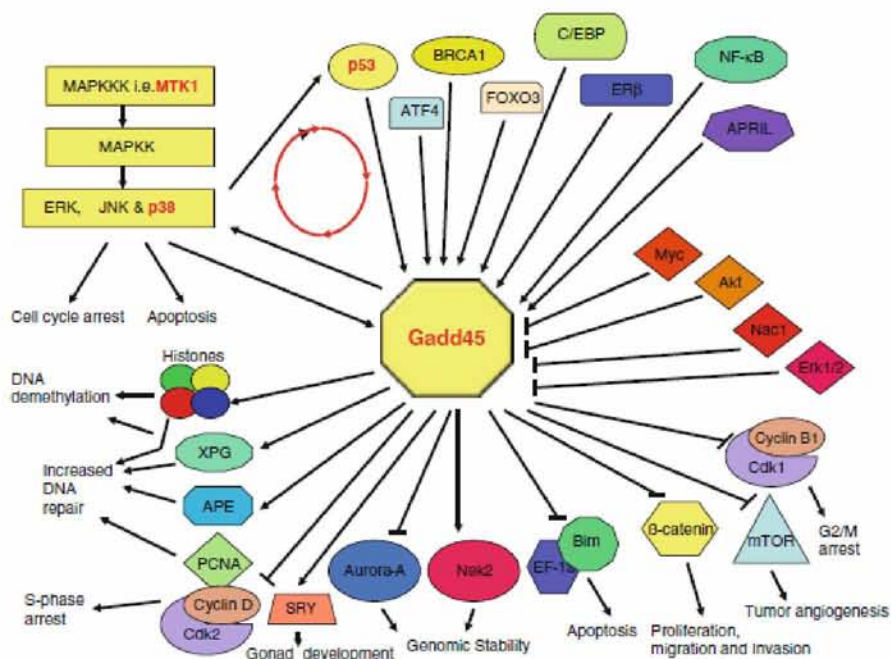
πυρηνικών/ κυτοπλασματικών πρωτεϊνών, τα οποία εκφράζονται ταχέως κατόπιν έκθεσης σε μία ενδογενή και εξωγενή ποικιλία ερεθισμάτων. Οι Gadd45 πρωτεΐνες εμπλέκονται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στην απομεθυλίωση και στην επιδιόρθωση του DNA, στην απόπτωση, στην επιβίωση των κυττάρων, στη γονιδιωματική σταθερότητα, στη φθορά και στην απόκριση στο φυσιολογικό και το ογκογόνο στρες. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών Gadd45 προκαλούνται από αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που είναι ικανή να τροποποιήσει τη δομή και τη λειτουργία άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόκριση των κυττάρων στο στρες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ποικίλουν ανάλογα με τη βιολογική ρύθμιση του συμπεριλαμβανομένου κυτταρικού τύπου, του σταδίου εξέλιξης και του στρες / ερεθίσματος (Liebermann and Hoffman, 2013). Στην παραπάνω διαδικασία εμπλέκονται και άλλα πρωτεϊνικά μόρια: Η cdc2 / κυκλίνη B1, η p21, η κινάση της οποίας η δράση επάγεται από το στρες p38 / JNK και οι PCNA / ιστόνες.

Το πρώτο γονίδιο Gadd45 ταυτοποιήθηκε κατόπιν επαγωγής, δηλαδή αυξημένα επίπεδα μορίων mRNA ύστερα από έκθεση των κυττάρων σε μια σειρά στρεσογόνων παραγόντων που σχετίζονται με την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης εξού και ο όρος Gadd (**g rowth a rrest and D NA- d amage**) (Fornace *et al.*, 1989). Η πρωτεΐνη Gadd45, που πλέον καλείται Gadd45a, βρέθηκε ότι είναι μέλος μίας εξαιρετικά συντηρημένης οικογένειας τριών γονιδίων που αποτελείται από τις Gadd45a (Gadd45a, DDIT1), Gadd45b (Gadd45β, Myd118) και Gadd45g (Gadd45γ, πρωτεΐνη που αποκρίνεται στην κυτοκίνη 6, CR6). Τα γονίδια Gadd είχαν πρώτα κλωνοποιηθεί από ωκύτταρα κινέζικου χάμστερ (CHO) ως υποσύνολο μεταγραφών, των οποίων η έκφραση τους ρυθμίζονταν σταθερά κατόπιν έκθεσης τους σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), και σε άλλους παράγοντες που βλάπτουν το DNA, συμπεριλαμβανομένου του μεθανοσουλφονικού μεθυλεστέρα (MMS), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) καθώς και σε άλλα σήματα αναστολής της ανάπτυξης, όπως το τροφικό στρες ή έκθεση σε υδροξυουρία (Fornace, Alamo and Hollander, 1988).

Η Gadd45a ήταν το 45ο μέλος αυτής της ομάδας που συλλέχθηκε ανάμεσα σε πάνω από εκατό αντίγραφα cDNA κλώνων και πρόκειται για μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αποκατάσταση των βλαβών του DNA, στην απόπτωση, σε σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, στη σηματοδότηση του κυτταρικού στρες στην κυτταρική βλάβη και σε άλλες διαδικασίες της κυτταρικής ανάπτυξης. Όπως αναφέρθηκε αρχικά, η Gadd45a ήταν το μοναδικό μεταξύ άλλων γονιδίων, το οποίο

εκφραζόταν σε απόκριση της έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία ανθρώπινων κυττάρων, με έναν τρόπο εξαρτώμενο της ATM (protein *kinase* ataxia-telangiectasia mutated) αλλά ανεξάρτητο της πρωτεϊνικής κινάσης C(PKC) (Papathanasiou *et al.*, 1991). Η διέγερση αυτής της δράσης ρυθμίζεται από την p53 (Kastan *et al.*, 1992) καθώς το Gadd45a ήταν το πρώτο γονίδιο του στρες που ανακαλύφθηκε ότι ήταν μεταγραφικά ρυθμιζόμενο από την p53. Οι πρωτεΐνες Gadd45 αποτελούν τυπικά μόρια σηματοδότησης, όντας μικρές και ευκίνητες, των οποίων η δράση ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μετα- μεταγραφικό επίπεδο, με ποικίλους ρόλους στο διαμεσολαβούμενο στρες, στη σηματοδότηση και ρύθμιση της ανάπτυξης, ενώ είναι γνωστό ότι προκαλεί την αναστολή της ανάπτυξης σε προκαρυωτικά και σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Friedberg *et al.*, 2006).

Η p38 και οι ενεργοποιούμενες από το στρες με μιτογόνο δράση JNK πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK) παίζουν πολύπλοκους ρόλους στη ρύθμιση της δράσης της Gadd45, ενώ άλλοι ρυθμιστικοί παράγοντες συσχετιζόμενοι με την ανάπτυξη, όπως οι p53, BRCA1, FOXO3, C/EBP και ATF4 συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση των Gadd45a, και σε μικρότερο βαθμό σε αυτή των λιγότερο μελετημένων γονιδίων Gadd45b και Gadd45g. Οι πρωτεΐνες Gadd45 εμπλέκονται άμεσα ή ως μέρος των ρυθμιστικών οδών στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και στη διέγερση της επισκευής του DNA. Οι πρωτεΐνες Gadd45 αλληλεπιδρούν με μία ευρεία ποικιλία κυτταρικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλοκών συμπεριλαμβανομένης της εξαρτώμενης από την κυκλίνη κινάσης- 1 (Cdk1), για την οποία αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της δραστηριότητας Cdk1-κυκλίνης B1 τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, όπως και συστατικό των σημείων ελέγχου της φάσης G2 (Wang *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 1999). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες Gadd45 συνδέονται άμεσα με τις ιστόνες νουκλεοσωμάτων και τροποποιούν την προσπελασιμότητα του DNA, ιδιαίτερα σε σημεία κατεστραμμένης χρωματίνης (Carrier *et al.*, 1999), ένας ρόλος που αποδόθηκε στην Gadd45 στην όσο αφορά την επισκευή του DNA (Smith *et al.*, 2000). Οι πρωτεΐνες Gadd45 αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν μια ποικιλία πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επισκευή DNA όπως η APE (Jung *et al.*, 2007), η XPG (Barreto *et al.*, 2007), το πυρηνικό αντιγόνο κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA) (Smith *et al.*, 1994) καθώς και η ίδια η p53.



Εικόνα 4.1: Πρωτεΐνες με γνωστούς ρόλους στη ρύθμιση των γονιδίων και πρωτεϊνών *Gadd45* και πρωτεΐνες τελεστές. Τα βέλη δείχνουν θετική ρύθμιση, ενώ οι υπόλοιπες γραμμές την αρνητική ρύθμιση. Η ρύθμιση είναι σύνθετη για το προκαλούμενο στρες από τη δράση των *p38* και *JNK/MAPK*, τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην επαγωγή του *Gadd45* και είναι σημαντικοί τελεστές της σηματοδότησης της *Gadd45* (Liebermann and Hoffman, 2013).

4.1. Η Δομή της Πρωτεΐνης *Gadd*

Η οικογένεια των γονιδίων *Gadd* αποτελείται από τρία μέλη, όπου το *Gadd45a* είναι το μεγαλύτερο και πολύ γνωστό ενώ συχνά αναφέρεται ως μετάγραφο που επάγεται από την προκαλούμενη βλάβη στο DNA. Η οικογένεια γονιδίων *Gadd45* κωδικοποιεί τρία δομικά όμοιες πρωτεΐνες, που σχετίζονται με την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και επαγόμενες βλάβες του DNA και χαρακτηρίζονται ως *Gadd45a*, *Gadd45β*, *Gadd45γ* ενώ περιέχουν μόνο μία διακριτή περιοχή ομολογίας σε άλλες πρωτεΐνες (δηλ., σε ριβοσωμικές πρωτεΐνες, (Zerbini *et al.*, 2004). Η κρυσταλλική δομή της *Gadd4γ* είναι η μοναδική της οικογένειας που έχει διασαφηνιστεί (εικόνα 4.2 (A)) (Schrag *et al.*, 2008). Οι δομικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο διμερισμός της πρωτεΐνης είναι κρίσιμος για την εκδήλωση της αντι-πολλαπλασιαστικής λειτουργίας των πρωτεϊνών *Gadd*, ενώ η *Gadd45a* αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών από την άποψη της λειτουργίας της. Το γονίδιο *Gadd45a* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1p31.2-p31.1) και κωδικοποιεί μία μικρή όξινη πρωτεΐνη που αποτελείται από 165 αμινοξέα (18,4kDa). Η πρωτεΐνη έχει μικρό χρόνο ημιζωής περίπου και φέρει αρνητικό φορτίο

σε ουδέτερο pH (Papathanasiou *et al.*, 1991).

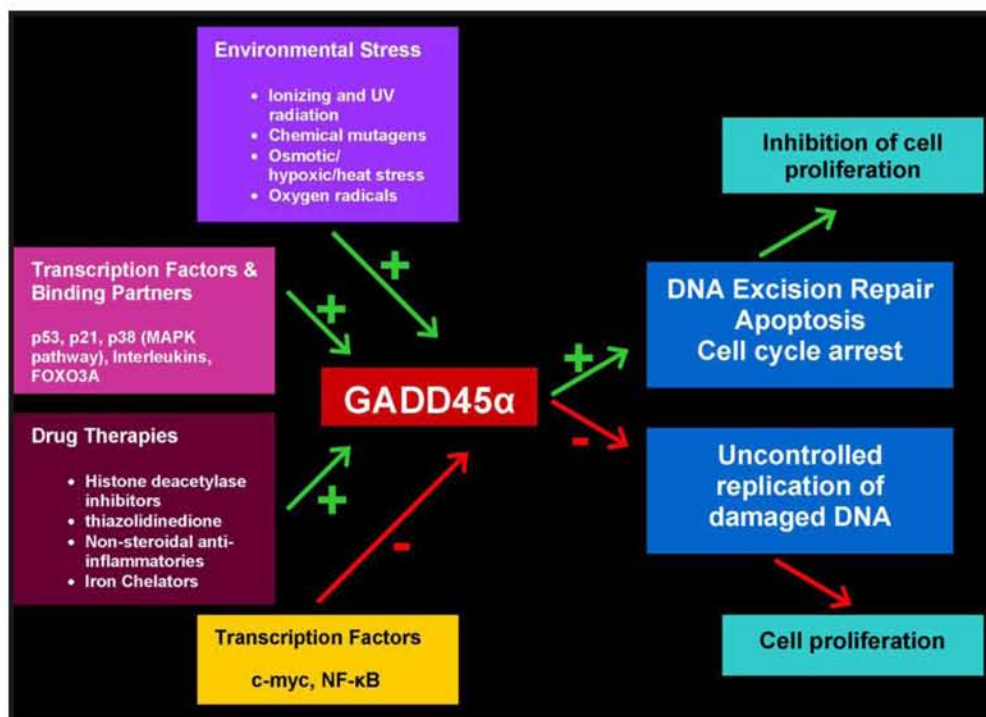
Το γονίδιο είναι εξαιρετικά συντηρημένο μεταξύ ειδών, ενώ η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης παρουσιάζει πάνω από 90% ταυτόσημα αμινοξέα μεταξύ του *Homo sapiens* και ομόλογων των πιθήκων *rhesus*, της οικιακής γάτας, του χάμστερ, του ποντικού και του αρουραίου. Η πρωτεΐνη Gadd45 έχει περίπου 50% ταυτόσημη πρωτεϊνική αλληλουχίας προς τις άλλες ισομορφές Gadd45, εκ των οποίων όλες εμφανίζουν συντηρημένες δομικές μονάδες (Εικόνα 4.2 (B)) (Schrag *et al.*, 2008), οι οποίες πιστεύεται ότι συμβάλλουν στον ομο- και ετεροδιμερισμό όλων των ισομορφών της Gadd45. Περαιτέρω, πιστεύεται ότι απαιτείται αυτός ο διμερισμός για την ενεργοποίηση και τη ρύθμιση αυτών των πρωτεϊνών προκειμένου να λειτουργήσουν οι μηχανισμοί της πυρηνικής προστασίας και της αναστολής της ανάπτυξης. Ωστόσο, αυτό παραμένει ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα (Schrag *et al.*, 2008).



Εικόνα 4.2: Η δομή της Gadd45γ και η ανάλυση της αλληλουχίας των ισομορφών της Gadd45, (Schrag *et al.*, 2008).

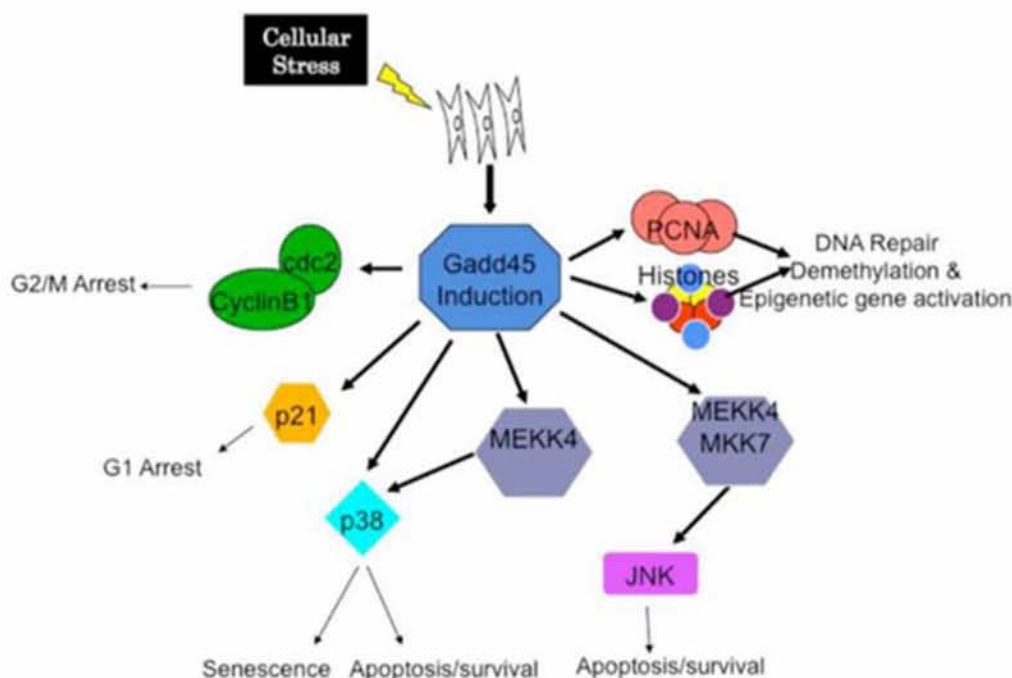
Το γονίδιο Gadd45a ήταν το πρώτο γονίδιο επαγόμενο από το κυτταρικό στρες που βρέθηκε να ενεργοποιείται από τον καταστολέα όγκου p53 (Zerbini *et al.*, 2004). Η έκφραση του Gadd45a είναι γνωστό ότι πρέπει να ρυθμίζεται τόσο από τα εξαρτώμενα από την p53 (όπως μετά έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία) και από τα ανεξάρτητα (όπως μετά από υπερϊώδη ακτινοβολία) από αυτή μεταβολικά μονοπάτια ανάλογα με τον τύπο γενοτοξικού στρες (Zhan *et al.*, 1998) (Εικόνα 4.3). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η υπέρ-έκφραση του Gadd45a οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης (Hollander and Fornace, 2002). Τα επίπεδα της Gadd45a έχουν προσδιοριστεί να εκφράζονται στο υψηλότερο επίπεδο τους στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και

είναι χαμηλότερα στη φάση S . Η Gadd45a είναι απαραίτητη στο σημείο ελέγχου G2/M και αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της αναστολής της αλληλεπίδρασης της cdc2 με την κυκλίνη B1 που απαιτείται για την είσοδο στη φάση M (Hollander and Fornace, 2002). Εξάλλου, η καταστολή του Gadd45a έχει βρεθεί ότι επιβραδύνει την αναστολή της φάσης G2/M.



Εικόνα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση της επαγωγής της Gadd45a και των επακόλουθων αποτελεσμάτων της δράσης της.

Η καταστολή της έκφρασης του Gadd45 μπορεί να θεωρηθεί μηχανισμός επιβίωσης, καθώς τα καρκινικά κύτταρα χωρίς αυτόν τον έλεγχο μπορούν να αποφύγουν το αποπτωτικό μονοπάτι. Αυτό αποδεικνύεται σε μελέτες που χρησιμοποιούν μόρια siRNA έναντι της Gadd45a και των μεταλλαγμάτων της σε κυτταρικές σειρές ζώων, στις οποίες η απόπτωση διακόπτεται ενώ ενισχύεται η ογκογένεση και η επισκευή του DNA (Hollander and Fornace, 2002). Αντίθετα, σε κύτταρα των οποίων το DNA έχει καταστραφεί, με φυσιολογική έκφραση και ρύθμιση της Gadd45a μπορεί να αποτραπεί η είσοδος στην φάση M του κυτταρικού κύκλου. Ως εκ τούτου, η Gadd45a δρα ως προστατευτικός μηχανισμός σε φυσιολογικά κύτταρα.



Εικόνα 4.4: Η λειτουργία της Gadd45 στη σηματοδότηση του κυτταρικού στρες (Cretu *et al.*, 2009).

4.2.Ο Βιολογικός Ρόλος της Gadd45a

4.2.1. Οι Πρωτεϊνικές Αλληλεπιδράσεις

Η Gadd45a είναι γνωστό ότι δεσμεύεται με μια ποικιλία ρυθμιστικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA) (Smith *et al.*, 1994) που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου που ευθύνεται για την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA. Είναι ενδιαφέρον ότι η Gadd45a ανταγωνίζεται την κινάση του αναστολέα της κυκλίνης, τον παράγοντα p21 για σύνδεση με PCNA και αντιστρόφως, το p21 μπλοκάρει την Gadd45a να δεσμεύει το PCNA. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η Gadd45a αλληλεπιδρά με τον MEKK4 που είναι ένας ενεργοποιητής της οδού p38 / JNK που σχετίζεται με την απόπτωση (Takekawa and Saito, 1998). Το γενοτοξικό στρες ή η γονιδιακή έκφραση στο καρκίνο του μαστού, του γονιδίου 1 (Brcal) με αποτέλεσμα την επαγόμενη απόπτωση εμπλέκει την Gadd45a (Zerbini *et al.*, 2004). Επίσης, το Gadd45 ενεργοποιεί την ευαίσθητη στο στρες c-jun NH₂-τερματική κινάση και / ή την ενεργοποιημένη από μιτογόνο δράση κινάση της p38 πρωτεΐνης (Zerbini *et al.*, 2004).

Οι υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις της Gadd45a περιλαμβάνουν εκείνες με τον

πυρήνα των ιστονών (Carrier *et al.*, 1999) και τη FOXO3a. Η αυξημένη η έκφραση του τελευταίου μορίου σηματοδοτεί την επισκευή του κατεστραμμένου DNA μορίου και εμποδίζει την είσοδο στη φάση M. Η Gadd45a μπορεί επίσης να διαδραματίσει ρόλο στην απομεθυλίωση του DNA προκειμένου να προάγει τη σταθερότητα του γονιδιώματος (Jin, Guo and Pfeifer, 2008). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις σε συνδυασμό με τα πρότυπα έκφρασης παρέχουν ισχυρά στοιχεία για τον ενεργό ρόλο της Gadd45a στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας.

4.2.2. Η Επιδιόρθωση του DNA

Η Gadd45 εμπλέκεται συγκεκριμένα στην επισκευή του DNA μέσω της εκτομής των νουκλεοτιδίων (Hollander and Fornace, 2002) με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της προόδου του κυτταρικού κύκλου όταν ανιχνευθεί βλάβη. Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι το Gadd45a προάγει την επιγενετική γονιδιακή ενεργοποίηση της αποκατάστασης της απομεθυλίωσης του DNA (Barreto *et al.*, 2007). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το πρωτεϊνικό μόριο TAF12 προσλαμβάνει τη Gadd45a και το σύμπλεγμα αποκατάστασης αποκοπής των νουκλεοτιδίων στον υποκινητή των γονιδίων rRNA, οδηγώντας σε δραστική απομεθυλίωση του DNA (Schmitz *et al.*, 2009).

Επειδή οι πρωτεΐνες Gadd45 παρουσιάζουν έλλειψη ενζυμικής δραστηριότητας, η λειτουργία τους ασκείται μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Έτσι διαμορφώνουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία πολλών μορίων στα οποία δεσμεύεται και εμπλέκονται σε απαραίτητες βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της μεσολάβησης της και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης ή της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, της γονιδιωματικής σταθερότητας και της επιδιόρθωσης του DNA (Zhu *et al.*, 2009). Η δράση της Gadd45a περιγράφεται αρκετά στο πλαίσιο της κυτταρικής απόκρισης στο στρες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το Gadd45a αποτελεί στόχο του παράγοντα p53, αν και έχει αναφερθεί επίσης ενεργοποίηση ανεξάρτητη από το p53, ενδεχομένως με τη συμμετοχή του στον καρκίνο του μαστού (BRCA1) ή ενεργοποιημένη από τη μιτογόνο κινάση (MAPK). Με την εμφάνιση της βλάβης στο μόριο του DNA, η Gadd45a επηρεάζει άμεσα τους μοριακούς μηχανισμούς επισκευής του, αλληλεπιδρώντας με το πολλαπλασιαστικό πυρηνικό αντιγόνο κυττάρων (PCNA) ή

την ενδονουκλεάση επιδιόρθωσης XPG (Jung *et al.*, 2007). Επιπλέον η Gadd45a προκαλεί διακοπή κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M μέσω της αλληλεπίδρασης της με τα συστήματα CDC2/ κυκλίνη B1 ή το p38 /JNK, προκειμένου να δοθεί χρόνος για την επισκευή του DNA. Η Gadd45a εμπλέκεται λοιπόν στην ισορροπία του κυτταρικού θανάτου και την επιβίωση των κυττάρων ανάλογα με την διέγερση των επιπέδων της στο στρες και τον κυτταρικό τύπο (Takekawa and Saito, 1998).

5. Σκοπός

Δεδομένου ότι η οικογένεια πρωτεϊνών Gadd45 φαίνεται από προηγούμενες μελέτες να εμπλέκεται σε πολλά και διαφορετικά είδη κυτταρικού στρες, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του πιο συχνά σχετιζόμενου με στρες μέλους της πρωτεΐνης Gadd45a στην απόκριση στο εξωγενές επαγώνενο οξειδωτικό στρες τόσο νεαρών όσο και γηρασμένων ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Για να επιτευχθεί αυτό προκλήθηκε οξειδωτικό στρες με επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την καλλιέργεια των βλαστοκυττάρων σε διάφορα ηλικιακά στάδια και ποσοτικοποιήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της Gadd45a μετά από διαφορετικά χρονικά διαστήματα ανάκαμψης από το οξειδωτικό στρες. Με αυτό τον τρόπο διερευνήθηκε η ικανότητα των βλαστοκυττάρων να ανταποκρίνονται γρήγορα ή όχι στο στρες μέσω της ρύθμισης του γονιδίου Gadd45a και κατά πόσο η γήρανση επηρεάζει αυτή την απόκριση.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καλλιέργειες Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων

1.1. Υλικά Καλλιέργειας

- **Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας**

Το Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12, Gibco BRL, UK), αποτέλεσε το θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια των βλαστοκυττάρων. Συγκεκριμένα, προτού γίνει χρήση του θρεπτικού υλικού προστίθεται ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), του οποίου οι παράγοντες συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillinstreptomycin, P/S) σε αναλογία 10% και 1% του αρχικού όγκου του θρεπτικού DMEM αντίστοιχα. Δηλαδή σε 500ml θρεπτικού υλικού προστίθεται 50ml FBS και 5ml P/S. Το τελικό θρεπτικό το οποίο παρασκευάστηκε για χρήση φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4 °C.

- **Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS, Gibco)**

Το PBS απουσία CaCl_2 και MgCl_2 αποτέλεσε το ρυθμιστικό διάλυμα για τις εκπλύσεις των κυττάρων, με κύριο ρόλο του στη διατήρηση σταθερού PH της καλλιέργειας. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C.

- **Θρυψίνη**

Η αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα έγινε με τη βοήθεια της θρυψίνης. Με σκοπό να αποτραπεί η απότομη μείωση της θερμοκρασίας των βλαστοκυττάρων κατά τη διάρκεια της χρήσης του ενζύμου, η ιδανική θερμοκρασία είναι 37 °C. Φυλάσσεται στους 4 °C.

1.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των βλαστοκυττάρων έλαβε χώρα σε φλάσκες 25T με τη χρήση του έτοιμου θρεπτικού μέσου που προαναφέρθηκε. Τα βλαστοκύτταρα αναπτύχθηκαν μέσα σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Istrumanets), ο οποίος βρισκόταν συνεχώς σε

σταθερή θερμοκρασία στους 37 °C, σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και σε εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Με σκοπό να αποφευχθούν εξωτερικές μολύνσεις καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό στείρο χώρο και οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα παρατηρούνταν με χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

1.3 Πρωτόκολλο Καλλιέργειας

Κατά τη διαδικασία της καλλιέργειας τους τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια των μέσων που τοποθετούνται. Για την αποκόλληση τους από τα τοιχώματα των φλασκών καλλιέργειας έγινε χρήση θρυψίνης, όπως ήδη αναφέρθηκε. Τα βλαστοκύτταρα μετά την απομόνωσή τους από τη γέλη του Wharton μπορούν είτε να καλλιεργηθούν άμεσα είτε να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -150 °C. Όταν τα κύτταρα καταψύχονται, μεταφέρονται σε κρυοφυαλίδιο σε συγκέντρωση 3-4 x 10⁶ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού, εμπλουτισμένα με 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) και 30% FBS, δίχως την προσθήκη αντιβιοτικών σε αυτή την περίπτωση. Το DMSO προστίθεται έτσι ώστε η κατάψυξη των κυττάρων-θρεπτικού υλικού να συμβεί με αργό ρυθμό και όχι απότομα για να μη δημιουργηθούν κρύσταλλοι, οι οποίοι ενδέχεται να καταστρέψουν την κυτταρική μεμβράνη. Κατά την απόψυξη των βλαστο-κυττάρων και τη μετέπειτα μεταφορά τους στις φλάσκες για να καλλιεργηθούν ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού σε πλαστικό σωληνάριο των 15ml (falcon)
- Μεταφορά του κρυοφυαλιδίου με τα κατεψυγμένα κύτταρα στο υδατόλουτρο (37 °C) για 15 δευτερόλεπτα
- Μεταφορά του περιεχομένου του κρυοφυαλιδίου στο falcon
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C)
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C)

- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 25T και προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂)

Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν τόσο ώστε να καλύψουν το 100% της επιφάνειας της φλάσκας που βρίσκονται προσκολλημένα τότε τα διαιρούμε σε δύο νέες φλάσκες και συνεχίζεται η καλλιέργειά τους βάσει του παρακάτω πρωτόκολλου:

- Απομάκρυνση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού υλικού από την παλιά φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνη και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει πραγματοποιηθεί η αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει πραγματοποιηθεί χρησιμοποιούμε scraper)
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 4ml θρεπτικού υλικού
- Μεταφορά 2ml θρεπτικού υλικού σε κάθε νέα φλάσκα και προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37 °C)

Τα βλαστο-κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τόσο για απομόνωση RNA όσο και για την απομόνωση πρωτεϊνών.

2. Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες σε 6-well plates

Τα δείγματα τα οποία επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για επιδράσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, αφού πρώτα καλύψουν πλήρως τις δύο φλάσκες τους,

διαιρούνται σε δύο 6-well plates από έξι πηγαδάκια στο καθένα με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε η διαιρεσή τους σε δύο νέες φλάσκες. Το ένα 6-well plate χρησιμοποιείται για την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα βλαστο-κύτταρα με τις επιδράσεις ενώ το άλλο για την απομόνωση του RNA. Το θετικό της συγκεκριμένης διαδικασίας έγκειται στο γεγονός ότι έχουμε τη δυνατότητα να επιδράσουμε σε κύτταρα που προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια, στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης με διαφορετικές ουσίες ή κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετική συγκέντρωση ή διαφορετικός χρόνος επώασης). Η διαδικασία των επιδράσεων μπορεί να ξεκινήσει μόνο όταν η επιφάνεια από το κάθε πηγαδάκι καλυφθεί κατά 80-90% από τα κύτταρα. Εμείς το διαφορετικό που κάνουμε σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια που έχουμε τοποθετήσει τα κύτταρα, είναι ο χρόνος ανάκαμψης που τους δίνουμε ύστερα από την επίδραση με H_2O_2 ίδιας συγκέντρωσης (300 μM), για μισή ώρα. Ως χρόνος ανάκαμψης ορίζεται ο χρόνος που παρέμειναν τα κύτταρα μέσα στον επωαστικό κλίβανο έπειτα από την επίδραση με H_2O_2 υπό φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας, μέχρι τη στιγμή που απομονώσαμε από αυτά τις πρωτεΐνες τους και το RNA. Στην παρούσα έρευνα οι χρόνοι ανάκαμψης που επιλέχθηκαν ήταν: 0 ώρες, 1 ώρα, 6 ώρες, 24 ώρες και 48 ώρες.

Για να επιτευχθεί η συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

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

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής:

- Διαχωρισμός μετά από την πλήρη κάλυψη σε δύο φλάσκες από το ίδιο δείγμα σε δύο 6-well plates από έξι πηγαδάκια στο καθένα
- Συνέχεια καλλιέργειας των κυττάρων στα 6-well plates
- Στο 80-90% κάλυψης σε κάθε πηγαδάκι ξεκινάει η διαδικασία επίδρασης
- Δημιουργία διαλύματος θρεπτικού με H_2O_2 (300 μM)
- Απομάκρυνση θρεπτικού από τα 6-well plates
- Ξέπλυμα με 2ml PBS

- Προσθήκη 2ml θρεπτικού H_2O_2 σε κάθε πηγαδάκι εκτός του πρώτου (χωρίς επίδραση-no treat-control)
- Επώαση για μία ώρα στον κλίβανο
- Απομάκρυνση του θρεπτικού με το H_2O_2 μετά από μία ώρα
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού σε κάθε πηγαδάκι
- Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα που ορίστηκαν (1h, 6h, 24h, 48h) απομάκρυνση του θρεπτικού και αντίστοιχο πρωτόκολλο για απομόνωση RNA ή πρωτεϊνών για κάθε πηγαδάκι

3. Απομόνωση Πρωτεϊνών

3.1 Υλικά Απομόνωσης Πρωτεϊνών

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

3.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης Πρωτεϊνών

- Απομάκρυνση θρεπτικού από τη φλάσκα ή τα πηγαδάκια
- Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS δύο φορές (5ml για τις φλάσκες, 2ml για κάθε πηγαδάκι)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ή 2ml στα πηγαδάκια, ούτως ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scraper)
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml

- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 100μl διαλύματος λύσης, στο οποίο είχε προστεθεί 15μl αναστολείς πρωτεασών
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του σε eppendorf
- Διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 40 λεπτά και ανάδευση της σε vortex ανά 10 λεπτά
- Φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο eppendorf
- Αποθήκευση της στους -80 °C

3.3 Υπολογισμός Ποσότητας Πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Μέσω της χρήσης της μεθόδου Bradford πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα κύτταρα. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται μία χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250), η οποία όταν δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Έτσι, βάσει δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών φτιάχτηκε μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης των τιμών απορρόφησης με τις πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις. Έχοντας αυτήν την πρότυπη καμπύλη υπολογίσθηκαν οι άγνωστες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που υπήρχαν στα δείγματά μας υπολογίζοντας την τιμή της απορρόφησης που παράχθηκε από την ανάμειξη 5μl της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε 495μl διαλύματος Bradford (5%). Αξίζει να επισημανθεί ότι για την ολοκλήρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν υλικά της εταιρίας Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ήταν η ακόλουθη:

- Ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl ddH₂O
- Προσθήκη 200μl χρωστικής σε κάθε δείγμα

- Επώαση μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά σε 96wells και φωτομέτρηση στα 595nm
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης βάσει των τιμών απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

4. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πηκτή Πολυακρυλαμιδίου-SDS

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στη μετακίνηση μορίων με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας των μορίων αυτών στο ηλεκτρικό πεδίο, επηρεάζεται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και τον συντελεστή τριβής (f):

$$U = E z / f$$

Η σταθερά τριβής εξαρτάται τόσο από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται όσο και από τη πυκνότητα του μέσου. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός λαμβάνει χώρα, σχεδόν πάντα, σε πηκτή και όχι σε υγρό και αυτό γιατί η πηκτή από τη μία καταστρέφει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές διαβαθμίσεις της θερμοκρασίας και από την άλλη λειτουργεί σαν μοριακό φίλτρο βοηθώντας έτσι τα μόρια να διαχωριστούν καλύτερα. Τα μικρότερα μόρια σε σχέση με τους πόρους της πηκτής κινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγαλύτερα παραμένουν σχεδόν στάσιμα. Τα μεσαίου μεγέθους μόρια μετακινούνται μέσα από τη πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Συνήθως στην ηλεκτροφόρηση συναντάμε πηκτές πολυακρυλαμιδίου διότι αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις, ενώ με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδιακρυλαμιδίου, στον πολυμερισμό για το σχηματισμό της πηκτής ρυθμίζονται εύκολα οι πόροι αυτής.

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών συντελείται κυρίως βάσει του μοριακού βάρους. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα, το οποίο έχει ως επακόλουθο την καταστροφή των μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μίας φυσικής πρωτεΐνης. Εξαιτίας αυτού, το σύμπλοκο του SDS με την αποδιεταγμένη πρωτεΐνη έχει μεγάλο φορτίο ανάλογο της μάζας της. Με τη δέσμευση του SDS, το αρνητικό φορτίο που αποκτά η πρωτεΐνη είναι πολύ μεγαλύτερο από το φορτίο που είχε αρχικά

η φυσική πρωτεΐνη, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο το αρχικό φορτίο της αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και έτσι η μετακίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

4.1 Υλικά Ηλεκτροφόρησης Πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen) 34
- Πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS (NuPage Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
- Αντιοξειδωτικό (NuPage Antioxidant, Invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό (DEMO_{S.A.})

4.2 Αποδιάταξη Πρωτεϊνών

Πριν την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών έχουμε αποδιάταξη και διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 35μg.

Το διάλυμα αποδιάταξης περιείχε:

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

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95 °C για 5 λεπτά.

4.3 Διαχωρισμός Πρωτεϊνών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ήταν η εξής:

- στήσιμο της συσκευής Bio-Rad
- προσθήκη 600ml (50ml Running buffer σε 950ml ddH₂O) στο μπροστινό και οπίσθιο μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο τμήμα της συσκευής προστίθενται 200ml Running buffer και 500ml Antioxidant
- Φόρτωμα δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών
- Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση

5. Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών – Western Blot

Μετά τη διαδικασία του διαχωρισμού τους, το ενδιαφέρον μας στρέφεται τόσο στην οπτικοποίηση όσο και στην ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης που μελετάμε. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση της επιλεγμένης πρωτεΐνης, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η χρήση ενός αντισώματος που θα προσκολληθεί στην υπό μελέτη πρωτεΐνη, καθώς θα την αναγνωρίσει σαν αντιγόνο, και στην συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο θα είναι ειδικό για το πρώτο. Αφού επιτύχουμε το διαχωρισμό της πρωτεΐνης που μελετάμε, επόμενο βήμα είναι να οπτικοποιήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε τα επίπεδα έκφρασης της. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει αρχικά να εντοπίσουμε την πρωτεΐνη μας με τη βοήθεια ενός αντισώματος που ενώνεται μόνο με την πρωτεΐνη που μελετάμε και εν συνεχεία θα χρησιμοποιήσουμε ένα δεύτερο αντίσωμα που θα αναγνωρίζει το πρώτο. Το δεύτερο αντίσωμα έχει την τάση να εμφανίζει μαύρη γραμμή σε φιλμ ακτίνων Χ(αυτοραδιογραφίας) διότι είναι σημασμένο με ένα ένζυμο την υπεροξειδάση της ραπανίδας. Αυτή η μαύρη γραμμή αντικατοπτρίζει την έκφραση της πρωτεΐνης που μελετάμε. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται πάνω σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης ή PVDF καθώς πάνω σε αυτές τις επιφάνειες διευκολύνεται η διάδραση πρωτεΐνης αντισώματος.

5.1 Υλικά Ανοσοαποτύπωσης

- Διάλυμα μεταφοράς
 - a) 5% Transfer buffer (NuPage Transfer buffer, Invitrogen)
 - b) 1% μεθανόλη (Applichem)
- Χαρτί Whitman
- Μembrάνη PVDF
- Χρωστική μεμβράνης
- Διάλυμα πλύσης
 - a) 50mM Tris (Invitrogen)
 - b) 150mM NaCl (Sharlau)
 - c) 1mM EDTA (Sharlau)
 - d) 0.05% Tween (Bio-Rad)
- Σκόνη μπλοκαρίσματος
- Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen)
- Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, Thermo Scientific)
- Rabbit polyclonal anti-Gadd45a
- Mouse monoclonal anti-actin, 1:1000, #SC5737 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- Goat anti-rabbit HRP, 1:10000, #196832 (Thermo Scientific)
- Goat anti-mouse HRP, 1:10000, #G21040 (Invitrogen, Life Technologies)

5.2 Πρωτόκολλο Ανοσοαποτύπωσης Πρωτεϊνών

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη έγινε με τη συσκευή Trans-Blot wet Transfer Cell (Bio-Rad). Πιο αναλυτικά:

- Πριν την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών επωάζονται σε transfer buffer για 20 λεπτά η μεμβράνη PVDF (αφού έχει πρώτα επωαστεί για 15 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη), δύο χαρτάκια Whitman και η πηκτή πολυακριλαμίδιου
- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών κατασκευάζεται το sandwich (με σειρά τοποθέτησης): 2 χαρτάκια Whitman → μεμβράνη PVDF → πηκτή πολυακριλαμίδιου → 2 χαρτάκια Whitman

- Μεταφορά του sant wits στο κουτί στην συσκευή Trans-Blot wet Transfer Cell
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 100V για 60 λεπτά
- Μετά το τέλος της μεταφοράς ακολουθεί βάνιμο της μεμβράνης με Ponsau, μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες των πρωτεϊνών
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (2,5gr σκόνης 50ml TBST)
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα στους 40 °C με ανάδευση ολονύκτια. Το αντίσωμα έχει διαλυθεί πρώτα σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5%
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)
- Επώαση στο δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά (3 επαναλήψεις)

Στη συνέχεια ακολουθεί η αυτοραδιογραφία, με σκοπό την αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε αφορά την αναγνώριση σήματος μέσω ειδικού λογισμικού και ήταν η ακόλουθη:

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

6. Απομόνωση RNA

6.1 Υλικά Απομόνωσης RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amersco)

- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies)

6.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης RNA

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3 λεπτά στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα ή 2ml στα πηγαδάκια, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. (αν δεν έχει επέλθει χρησιμοποιούμε scraper)
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1-3ml Trizol, αναλόγως του μεγέθους του ιζήματος των κυττάρων
- Επώαση για 5 λεπτά στους 15-30 °C στο υδατόλουτρο
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου για κάθε και ανάδευση με vortex για 15 δευτερόλεπτα
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf των 2ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol
- Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του με 1ml 70% αιθανόλης
- Ανάδευση με και φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα στον κλίβανο μέχρι να εξατμιστεί επαρκώς η αιθανόλη

- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl)
- Επώαση για 10 λεπτά στους 57⁰C στο υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του στους -80 ⁰C

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

7. Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*, τα RNA που απομονώθηκαν από τα δείγματα μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers).

7.1 Υλικά για την Σύνθεση cDNA

- Random hexamers (2,97 μg/μl, invitrogen)
- Kit αντίστροφης μεταγραφής SuperScript III (200U/μl, invitrogen)
- Δοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό ddH₂O (DEMO_{S.A.})

7.2 Πρωτόκολλο Σύνδεσης cDNA

Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 3 ml RNA, ούτως ώστε να γίνει η σύνθεση του cDNA. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε δύο στάδια. Πιο αναλυτικά:

- Πρώτο στάδιο: Διάλυση του RNA σε ddH₂O και προσθήκη 1ml Random Primers μέχρι τελικού όγκου 15ml. Στην συνέχεια, ακολουθεί η θέρμανση των δειγμάτων στου 65 ⁰C για 10 λεπτά, με σκοπό την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των μορίων RNA.
- Δεύτερο στάδιο: Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες
 - a) 4μl Ρυθμιστικό διάλυμα 5x

- b) 2μl dNTPs
- c) 2μl χλωριούχο μαγνήσιο
- d) 2μl DTT
- e) 0,5μl SuperScript III

Έπειτα, ακολουθεί το πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

- 37 °C, 10 λεπτά
- 25 °C, 10 λεπτά
- 37 °C, 50 λεπτά
- 70 °C, 15 λεπτά
- 4 °C, τελική θερμοκρασία

Με σκοπό να γίνει η επιβεβαίωση ότι το RNA απομονώθηκε με επιτυχία και ότι η ποσότητά του είναι ικανοποιητική, αλλά και για να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών ενός γονιδίου αναφοράς, του GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), δηλαδή ενός γονιδίου που εκφράζεται πάντα στον υπό μελέτη ιστό. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για το GAPDH, για το cDNA κάθε δείγματος.

Primers GAPDH

Forward: -5 GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3-

Reverse: -5 GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3-

Primers Gadd45a

Forward:-5 GAGCAGAAGACCGAAAGCGAC 3-

Reserve:-5 GAATGTGGATTTCGTCACCAGC 3-

Το διάλυμα της αντίδρασης (AmpliTaq Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

- | | |
|-------------------------|--------|
| • cDNA | 3μl |
| • ρυθμιστικό διάλυμα 2x | 12,5μl |
| • Εκκινητής F (50p/mol) | 1μl |
| • Εκκινητής R (50p/mol) | 1μl |

- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) 7,5μl

Εφαρμόσθηκε πρόγραμμα με τις συνθήκες PCR, το ποίο ήταν το εξής:

- Αποδιάταξη στους 95 °C για 10 λεπτά
- 40 κύκλοι με τα εξής στάδια ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου:
 - a) Αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - b) Υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα
 - c) Επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
- Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 7 λεπτά

Στην συνέχεια, συντελέστηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 3% με μάρτυρα μοριακών βαρών 100bp (Fermentas), ούτως ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί ο έλεγχος της παρουσίας ή μη του τμήματος που ενισχύθηκε.

8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real time PCR)

Η real time PCR αποτελεί μία τεχνική αντίστοιχης εκείνης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Πιο συγκεκριμένα, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, μέσω του ενζύμου Taq πολυμεράσης από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και κατάλληλων εκκινητών, πραγματοποιεί ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA. Κατ' ανάλογο τρόπο, λοιπόν, η real time PCR επιτρέπει αφενός την ανίχνευση και αφετέρου τη μέτρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR για κάθε κύκλο, τα οποία αντιστοιχούν κατά την έναρξή της, άμεσα στο ποσοστό του μητρικού DNA, καθώς στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται. Το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems) αποτελεί ένα από τα πιο κατάλληλα συστήματα ποσοτικοποίησης. Η βασική αρχή του συστήματος έγκειται στην ανίχνευση του φθορισμού των ειδικών φθορίζουσών χημικών ουσιών, που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος που ενισχύεται.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε χρήση της φθορίζουσας ουσίας, η οποία συνδέεται επιλεκτικά σε δίκλιωνα μόρια DNA και ενισχύει το φθορισμό της. Ο υπολογισμός της αρχικής ποσότητας DNA στην real time PCR μπορεί να επιτευχθεί

είτε μέσω του απόλυτου προσδιορισμού είτε μέσω του σχετικού προσδιορισμού. Πρόκειται δηλαδή, για δύο διαφορετικούς τρόπους υπολογισμού της αρχικής ποσότητας DNA. Αναλυτικότερα, στον απόλυτο προσδιορισμό υπολογίζονται με ακρίβεια τα αντίγραφα που υπήρχαν πριν την ενίσχυση στο δείγμα μας για το υπό μελέτη γονίδιο, ενώ στον σχετικό προσδιορισμό υπολογίζεται η ποσότητα των αντιγράφων σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (που εκφράζεται πάντα στο υπό μελέτη ιστό) για το υπό μελέτη δείγμα. Ο σχετικός προσδιορισμός χρησιμοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, ενώ το GAPDH αποτέλεσε το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε.

8.1 Υλικά για την Real Time PCR

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

8.2 Πρωτόκολλο και Διάλυμα της Αντίδρασης για την Real Time PCR

Το διάλυμα της αντίδρασης (PCR mix) περιείχε:

- | | |
|----------------------|-------|
| • cDNA | 3μl |
| • SYBR Green | 7,5μl |
| • Εκκινητής Forward | 0,3μl |
| • Εκκινητής Reverse | 0,3μl |
| • ddH ₂ O | 3,9μl |

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο ήταν οι εξής:

GAPDH Forward: -GAGTCAACGGATTTGGTCGT-

GAPDH Reverse: -GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-

-

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

- αποδιάταξη στους 95 °C

- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε 3 στάδια:
 - a) Αποδιάταξη στους 95 °C για 15 δευτερόλεπτα
 - b) Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60 °C για 60 δευτερόλεπτα
 - c) Επιμήκυνση στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα
- Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά

9. Ανοσοϊστοχημεία

Η παρουσία βλαβών στο DNA είναι εφικτό να προσδιοριστούν με μία ευαίσθητη μέθοδο έμμεσης ανοσοϊστοχημείας η οποία βασίζεται στην ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX στη δομή της χρωματίνης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή ένα αντίσωμα προσκολλάται σε ένα ειδικό αντιγόνο στόχο και μετά ένα δεύτερο σεσημασμένο με χρώμα αντίσωμα καθιστά ορατό το σύμπλεγμα αυτό μέσω μικροσκοπίου. Έτσι η ιστόνη H2AX φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 και αμέσως μετά την επαγωγή των DNA double strand Breaks (DSB) προκύπτει η γH2AX. Με τη χρήση ειδικών φθορίζοντων αντισωμάτων για την γH2AX μπορούμε να ανιχνεύσουμε DSBs στον πυρήνα του κυττάρου μέσω των εστιών φθορισμού της.

Υλικά ανοσοϊστοχημείας :

- Formaldehyde 3,7%
- 1% Triton X-100
- PBS/0,02%Tween20
- PBS/0,02%Tween20/ 1% BSA
- Διάλυμα πλυσής PBS
- BSA (Sigma)
- Πρώτο αντίσωμα: mouse anti-γH2AX (1:500)
- Δεύτερο αντίσωμα: A21203 Alexa Fluor 594 (green) donkey anti-mouse (1:500)

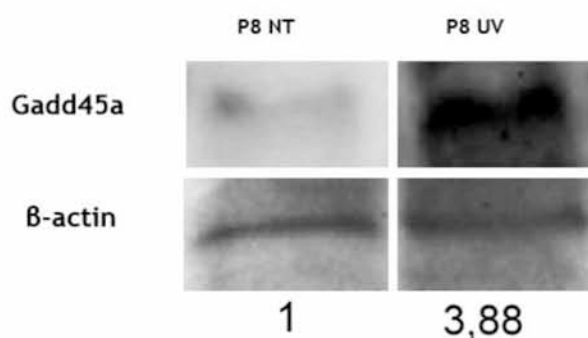
Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας:

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS
- Προσθήκη 250μl formaldehyde 3,7% για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS για 1 λεπτό (τρεις φορές)
- Προσθήκη 150μl 1% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά
- Ξέπλυμα με 1ml PBS/0,02%Tween20 για 5 λεπτά
- Επώαση των κυττάρων με 1ml PBS/0,02%Tween20/ 1% BSA για 10 λεπτά
- Επώαση των κυττάρων με 100μl από το πρωτογενές αντίσωμα (αραίωση 1:500) σε 500μl PBS/0,02%Tween20/ 1% BSA για 45 λεπτά
- Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS για 1 λεπτό (τρεις φορές)
- Επώαση των κυττάρων με 100μl από το δευτερογενές αντίσωμα (αραίωση 1:500) σε 500μl PBS/0,02%Tween20/ 1% BSA για 45 λεπτά στο σκοτάδι
- Ξέπλυμα με 1ml PBS/0,02%Tween20 για 5 λεπτά
- Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS για 5 λεπτά
- Αφυδάτωση των κυττάρων και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε πλακάκια με τη βοήθεια κόλλας
- Τέλος ακολουθεί παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο και εξαγωγή συμπερασμάτων
- Φύλαξη των δειγμάτων στους 4 °C στο σκοτάδι

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνικών Επιπέδων της Gadd45a σε Ανθρώπινα Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα Ύστερα από Επίδραση με UVB Ακτινοβολία.

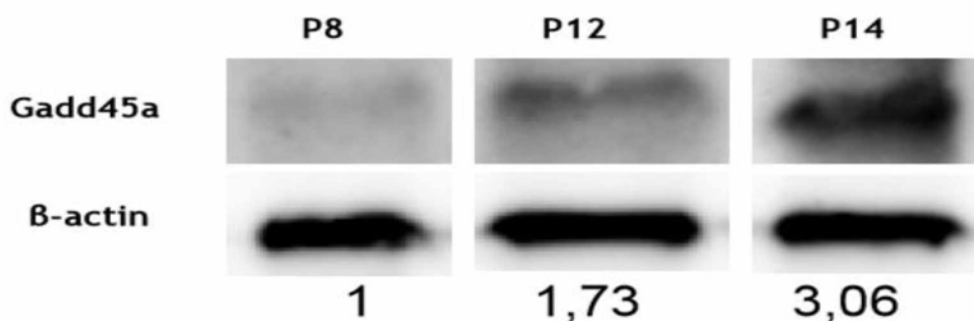
Θέλοντας να ελέγξουμε τον ήδη γνωστό ρόλο της Gadd45a ως μόριο που αποκρίνεται σε ακτινοβολία πρωταρχικός στόχος ήταν να προσδιοριστούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του γονιδίου σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που βρίσκονται στο ίδιο ηλικιακό στάδιο με και χωρίς την επίδραση UVB ακτινοβολίας. Στο εν λόγω πείραμα απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες των υπό καλλιέργεια βλαστοκυττάρων μας από δύο διαφορετικές ολόκληρες φλάσκες που βρίσκονταν στο ίδιο στάδιο κυτταρικής διαίρεσης συγκεκριμένα στο passage 8. Η μία φλάσκα περιείχε βλαστοκύτταρα χωρίς καμία επίδραση ενώ η άλλη φλάσκα τα βλαστοκύτταρα υποβλήθηκαν σε επίδραση UVB 250 J m^{-2} . Μετά τη λύση των κυττάρων και την απομόνωση των πρωτεϊνών ακολούθησε προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης Gadd45a με τη μέθοδο Western blot ανάλυση. Η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν σχετική και όχι απόλυτη με γονίδιο αναφοράς τη β -actin. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν τα οποία απεικονίζονται στην εικόνα τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Gadd45a αυξάνονται ραγδαία έπειτα από έκθεση του κυττάρου σε UVB ακτινοβολία επιβεβαιώνοντας όλες τις μέχρι σήμερα μελέτες για το ρόλο της Gadd45a στην απόκριση στο UV στρες.



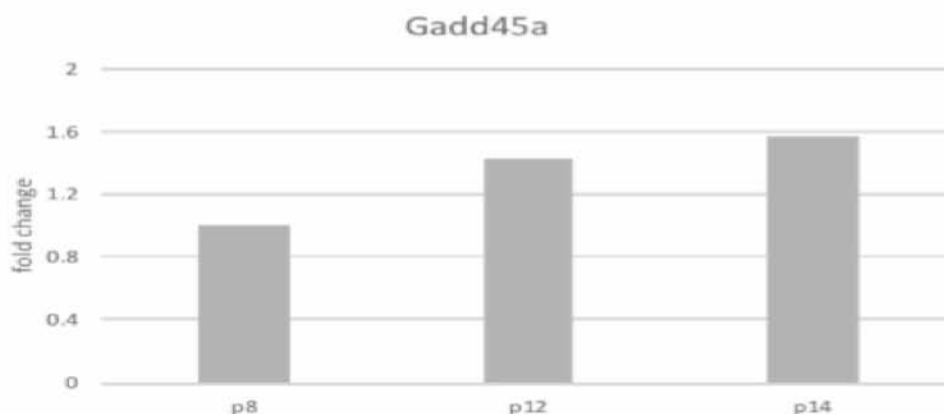
Εικόνα 1: Έκφραση της Gadd45a σε σχέση με τη β -actin μετά από επίδραση με UVB ακτινοβολία (εικόνα από το λογισμικό UVITEC alliance)

2. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνικών και Μεταγραφικών Επιπέδων της Gadd45a σε Διάφορα Ηλικιακά Στάδια Καλλιεργημένων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων.

Μετρήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του γονιδίου Gadd45a σε βλαστοκύτταρα που βρίσκονταν σε διαφορετικά ηλικιακά στάδια και συγκεκριμένα σε passage 8, 12 και 14 σε μία προσπάθεια να διαλευκάνουμε αν η έκφραση της πρωτεΐνης μας εκτός από το στρες επηρεάζεται και από τη γήρανση του κυττάρου. Όπως και πριν προχωρήσαμε σε λύση των κυττάρων της κάθε φλάσκας των αντίστοιχων ηλικιακών σταδίων, απομονώθηκαν όλες οι πρωτεΐνες της κάθε φλάσκας, προσδιορίστηκε η συνολική ποσότητα και μετρήθηκε η έκφραση της Gadd45a με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης με Western blot analysis. Σύμφωνα με τα προκύπτοντα αποτελέσματα διαφαίνεται μία αναλογική σχέση της πρωτεΐνης Gadd45a με την ηλικία. Όπως φαίνεται και την εικόνα όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία των καλλιεργημένων βλαστοκυττάρων τόσο περισσότερο εκφράζεται η πρωτεΐνη μας στα κύτταρα αυτά.



Εικόνα 2.1: Έκφραση της Gadd45a σε σχέση με τη β-actin σε διαφορετικά ηλικιακά στάδια (εικόνα από το λογισμικό UVITEC alliance)

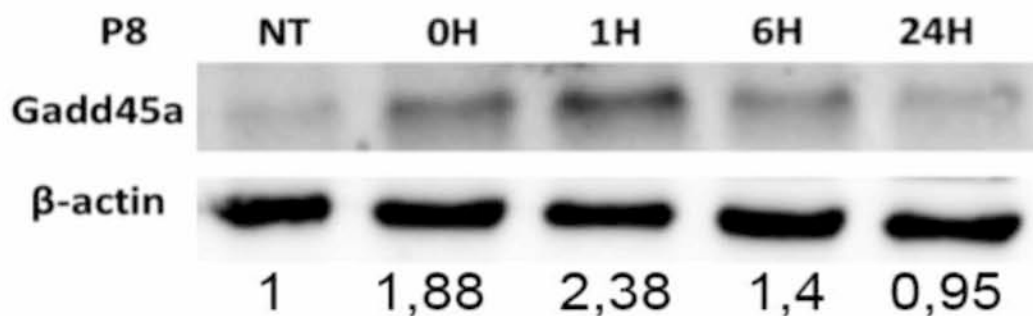


Εικόνα 2.2: Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων της Gadd45a σε διαφορετικά ηλικιακά στάδια.

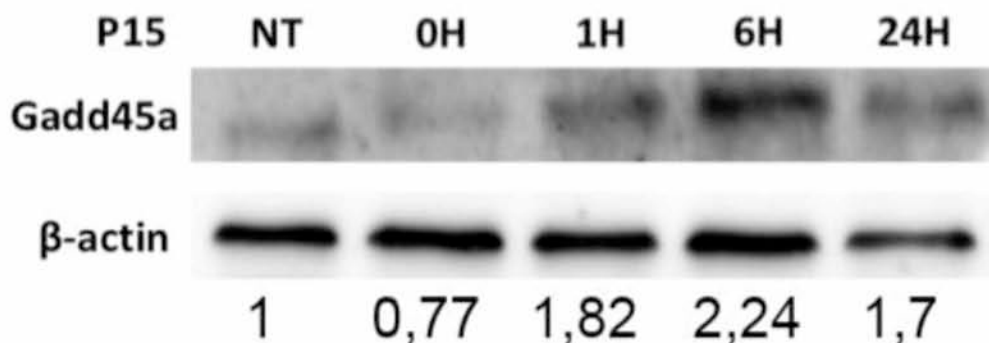
3. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Πρωτεϊνικών Επιπέδων της Gadd45a σε Διάφορα Ηλικιακά Στάδια Καλλιερημένων Ανθρώπινων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων έπειτα από Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες.

Ελέγξαμε την πρωτεϊνική έκφραση της Gadd45a σε νεαρά και μεσαίας ηλικίας ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα ύστερα από επίδραση με εξωγενές οξειδωτικό στρες σε μία θέλοντας να διαλευκάνουμε πώς αποκρίνεται η Gadd45a στο οξειδωτικό στρες και αν αυτή η απόκριση επηρεάζεται από τη γήρανση των βλαστοκυττάρων μας. Σε αυτό το πείραμα καλλιεργήσαμε τα βλαστοκύτταρα μας σε 6-well plates και προσθέσαμε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) για μισή ώρα αφήνοντας ένα δείγμα χωρίς επίδραση. Έπειτα Αφού αφαιρέσαμε το H_2O_2 τα αφήσαμε να ανακάμψουν σε φυσιολογικό θρεπτικό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1h, 6h, 24h και 48h). Ακολούθησε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και με western blot προσδιορίστηκε εκ νέου η έκφραση της Gadd45a πρωτεΐνης μετά τις επιδράσεις μας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στα νεαρής ηλικίας βλαστοκύτταρα (passage 8) παρατηρείται μεγάλη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων στη μία ώρα ανάκαμψης από το εξωγενές οξειδωτικό στρες. Αυτή την αύξηση υποδέχεται μία έντονη μείωση στις 6 και 24 ώρες ανάκαμψης που σχεδόν τα επίπεδα της πρωτεΐνης μας επιστρέφουν στα φυσιολογικά. Σε αντίθεση με τα νεαρής ηλικίας βλαστοκύτταρα τα βλαστοκύτταρα μεσαίας ηλικίας εμφανίζουν τη μεγαλύτερη

πρωτεϊνική αύξηση της Gadd45a στις έξι ώρες ανάκαμψης από το οξειδωτικό και όχι στη μία ώρα. Μία αύξηση η οποία φαίνεται να διατηρείται ακόμη και 24 ώρες μετά την επίδραση του στρες. Έτσι λοιπόν οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πώς το πρότυπο απόκριση της Gadd45a στο οξειδωτικό στρες έχει άμεση συσχέτιση με την ηλικία του βλαστοκυττάρων καθώς τα νεαρότερα αποκρίνονται πολύ πιο άμεσα από τα γηρασμένα.



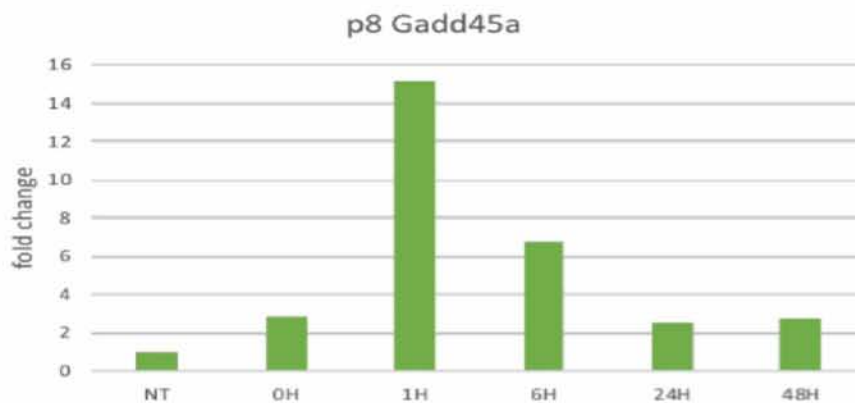
Εικόνα 3.1: Έκφραση της Gadd45a σε σχέση με τη β-actin σε νεαρής ηλικίας (passage 8) μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έπειτα από επίδραση με εξωγενές οξειδωτικό στρες σε διαφορετικά χρονικά σημεία ανάκαμψης από αυτό (εικόνα από το λογισμικό UVITEC alliance)



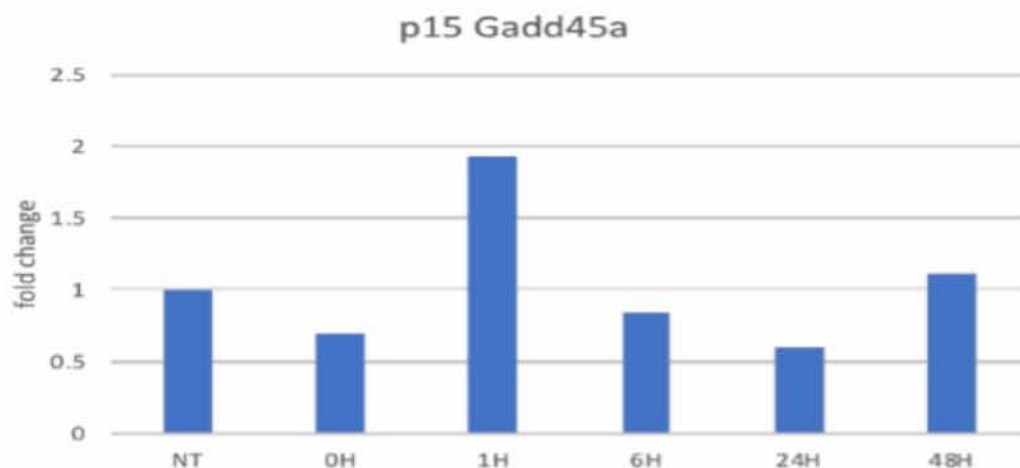
Εικόνα 3.2: Έκφραση της Gadd45a σε σχέση με τη β-actin σε μεσαίας ηλικίας (passage 15) μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έπειτα από επίδραση με εξωγενές οξειδωτικό στρες σε διαφορετικά χρονικά σημεία ανάκαμψης από αυτό (εικόνα από το λογισμικό UVITEC alliance)

4. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μεταγραφικών Επιπέδων του Γονιδίου Gadd45a σε Διάφορα Ηλικιακά Στάδια Καλλιεργημένων Ανθρώπινων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων έπειτα από Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες.

Ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου Gadd45a ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε διαφορετικά ηλικιακά στάδια (passage 8 και 15). Στο συγκεκριμένο πείραμα το RNA που απομονώθηκε από ολόκληρες φλάσκες των αντίστοιχων ηλικιακών σταδίων χρησίμευσε για την παραγωγή cDNA το οποίο εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε ώστε να υπολογιστούν τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου της Gadd45a με τη βοήθεια της μεθόδου real-time PCR. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR ήταν σχετική και όχι απόλυτη με γονίδια αναφοράς το GAPDH βάσει της μεθόδου ΔΔCT. Στα αποτελέσματα που αφορούν τα νεαρής ηλικίας βλαστοκύτταρα παρατηρείται αύξηση σχεδόν αμέσως μετά από την αφαίρεση του οξειδωτικού. Ακόμα μεγαλύτερη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων παρουσιάζεται στη μία ώρα ανάκαμψης όπου έχουμε 15 φορές παραπάνω ποσότητα mRNA από το φυσιολογικό. Στη συνέχεια στις 6 ώρες ανάκαμψης φαίνεται να μειώνονται αρκετά παρόλα αυτά όμως πάλι είναι έξι φορές παραπάνω από το φυσιολογικό. Τέλος στις 24 και 48 ώρες τα επίπεδα mRNA εξακολουθούν να παραμένουν παραπάνω του φυσιολογικού αλλά μόνο δύο φορές. Πηγαίνοντας στα μέσης ηλικίας κύτταρα η μεγαλύτερη αύξηση είναι πάλι στη μία ώρα ανάκαμψης παρόλα αυτά έχουμε μόνο δύο φορές αύξηση σε σχέση με το φυσιολογικό και στις 6 ώρες τα μεταγραφικά επίπεδα φαίνεται να επιστρέψουν στη φυσιολογικά ποσότητα.



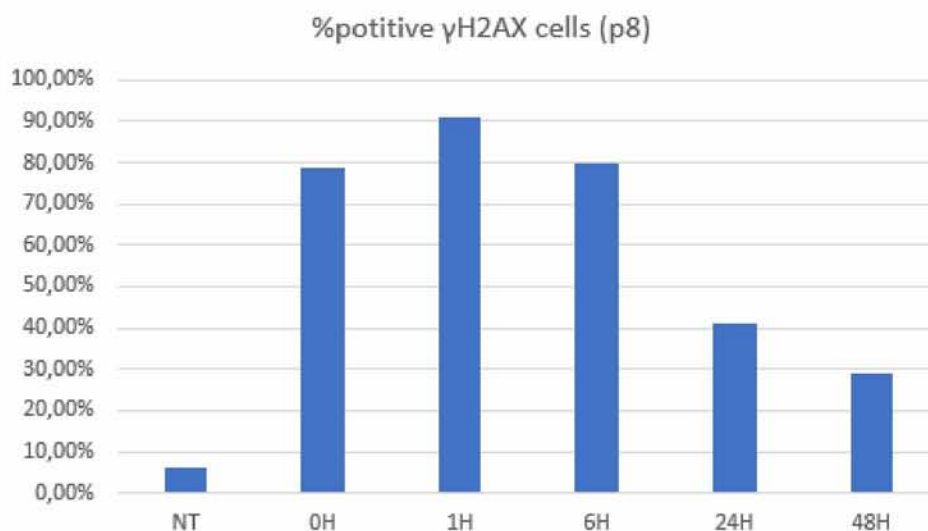
Εικόνα 4.1: Μέσοι όροι των επιπέδων mRNA του γονιδίου Gadd45a ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στο passage 8 έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Gadd45a/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.



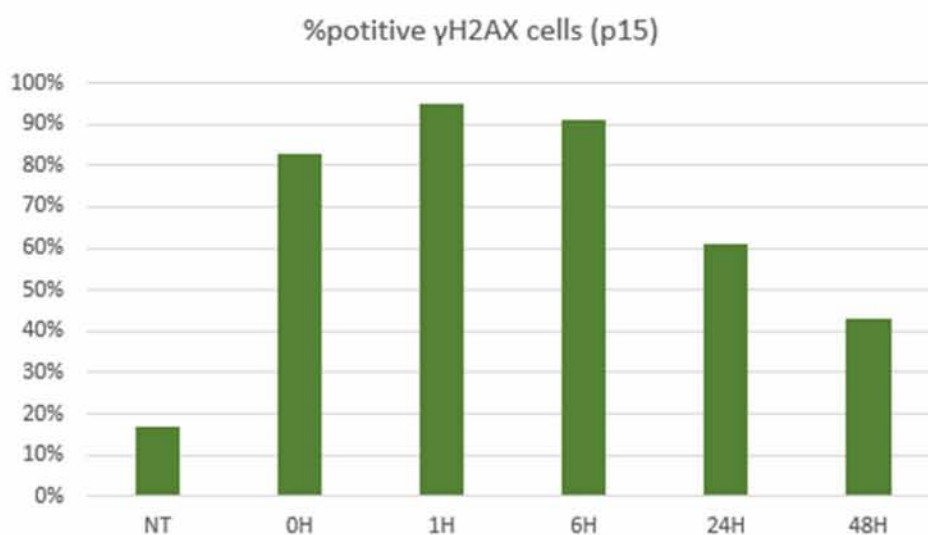
Εικόνα 4.2 : Μέσοι όροι των επιπέδων mRNA του γονιδίου Gadd45a ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στο passage 15 έπειτα από σχετική ποσοτικοποίηση με mRNA αναφοράς την GAPDH (Gadd45a/GAPDH), επίδραση με οξειδωτικό στρες και ανάκαμψη στις αντίστοιχες ώρες.

5. Ποσοστιαία Μέτρηση των Κυττάρων με Βλάβες στο Γενετικό Υλικό σε κάθε Στάδιο Ανάκαμψης έπειτα από Επίδραση με Οξειδωτικό Στρες Νεαρών και Μεσαίας Ηλικίας Καλλιιεργημένων Ανθρώπινων Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων.

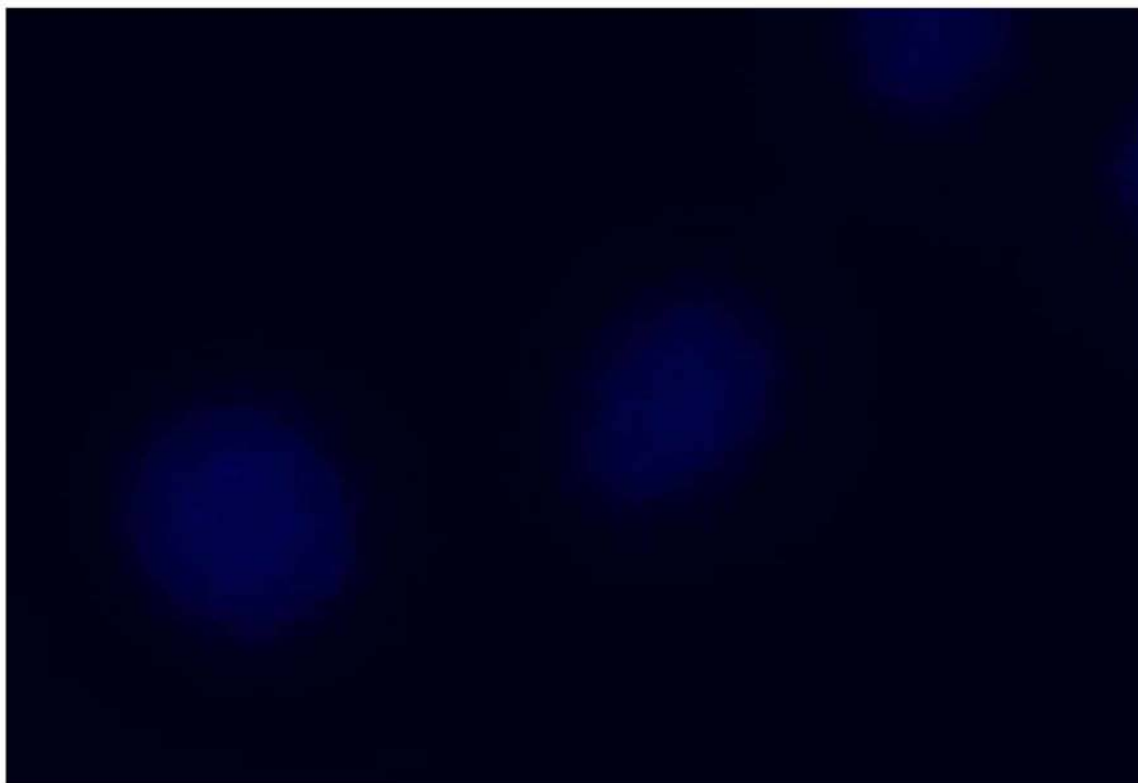
Στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα νεαρής και μέσης ηλικίας που υπέστησαν επίδραση με οξειδωτικό στρες πραγματοποιήθηκε η μέθοδος ανοσοφθορισμού με τη χρήση ιστόνης γH2AX θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τις προκαλούμενες από το στρες βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων όπως επίσης και να μετρήσουμε το ποσοστό των βλαβών αυτών σε κάθε χρονική στιγμή ανάκαμψης από το οξειδωτικό στρες. Όπως φαίνεται στις δύο ακόλουθες εικόνες έχουν πράγματι προκληθεί βλάβες στο DNA από την επίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επίσης παρατηρούμε πως τα νεαρής ηλικίας μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διορθώνουν τις βλάβες γρηγορότερα από τα μεσαίας ηλικίας κύτταρα μιας και στις 6h, 24h και 48h ανάκαμψης οι βλάβες των πρώτων είναι σταθερά σε χαμηλότερα ποσοστά από των δεύτερων.



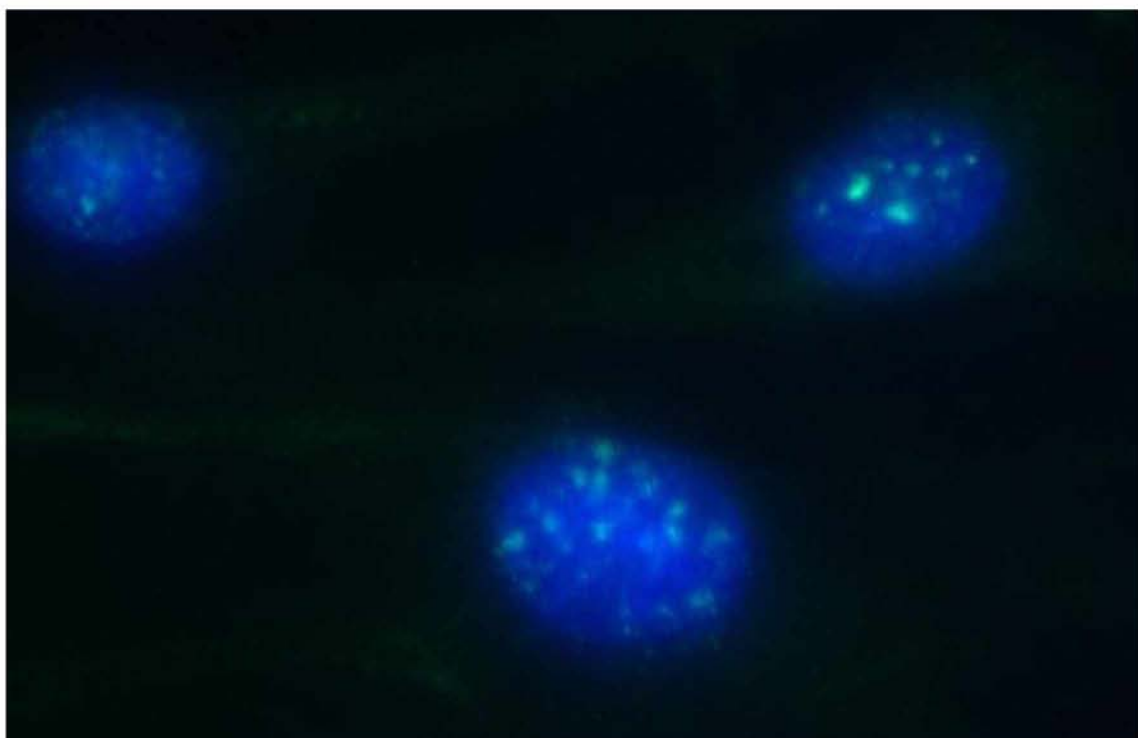
Εικόνα 5.1: ποσοστά των νεαρής ηλικίας (passage 8) μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που εμφανίζουν βλάβες στο DNA σε κάθε χρονικό σημείο ανάκαμψης μετά την επίδραση με οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 5.2 : ποσοστά των μεσαίας ηλικίας (passage 15) μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που εμφανίζουν βλάβες στο DNA σε κάθε χρονικό σημείο ανάκαμψης μετά την επίδραση με οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 5.3 : εικόνα μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που μετά από μέθοδο ανοσοφθορισμού με ιστόνη γH2AX φαίνεται να μην εμφανίζουν βλάβες στο γενετικό τους υλικό.



Εικόνα 5.4 : εικόνα μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που μετά από μέθοδο ανοσοφθορισμού με ιστόνη γH2AX φαίνεται να εμφανίζουν πράσινές φωσφορίζουσες κηλίδες οι οποίες υποδηλώνουν βλάβες στο γενετικό τους υλικό.

Α. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται η κατάσταση αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των μεταβολικά ενεργών κυττάρων ως αδυναμία αυτών να ανταπεξέλθουν σε καταστάσεις στρες. Το οξειδωτικό στρες είναι ένας παράγοντας που όχι μόνο μπορεί να συμβάλει στην εγκαθίδρυση της γήρανσης στα κύτταρα αλλά να προκαλέσει εκτεταμένες βλάβες σε όλα τα βασικά συστατικά του κυττάρου. Ως μόριο που αποκρίνεται στο στρες η πρωτεΐνη Gadd45a εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στα ρυθμιστικά μονοπάτια των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της διέγερσης της επισκευής του DNA. Οι πρωτεΐνη Gadd45a αλληλοεπιδρά με πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών όπως της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης 1 (Cdk1), η οποία είναι ένας ισχυρός αναστολέας της δραστηριότητας Cdk1-κυκλίνης B1 αποτελώντας σημαντικό συστατικό του σημείου ελέγχου της φάσης G2 του κυτταρικού κύκλου (Wang et al., 1999, Zhan et al., 1999). Επιπλέον η πρωτεΐνη Gadd45a δεσμεύεται άμεσα σε ιστόνες των νουκλεοσωμάτων τροποποιώντας την προσβασιμότητα του DNA, ιδιαίτερα σε σημεία που εντοπίζεται η κατεστραμμένη χρωματίνη, η οποία είναι ένας ρόλος που αναφέρθηκε για την Gadd45a στην επισκευή DNA (Smith *et al.*, 2000), το οποίο λόγω του οξειδωτικού στρες συχνά εμφανίζει βλάβες και οδηγεί στη γήρανση του κυττάρου. Δεδομένης της σύνδεσης του οξειδωτικού στρες με τις βλάβες που προκαλούνται στο κύτταρο και του γνωστού ρόλου της Gadd45a ως μόριο που αποκρίνεται σε διάφορων ειδών στρες και συμβάλλει στα σηματοδοτικά μονοπάτια επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να βρεθεί η σχέση της Gadd45a με το οξειδωτικό στρες και πώς η σχέση αυτή επηρεάζεται κατά τη γήρανση των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.

Για το λόγο αυτό τα μεσεγχυματικά ανθρώπινα βλαστοκύτταρα (Wharton jelly mesenchymal stem cells (MSCs)) καλλιεργήθηκαν μέχρι να επέλθει η γήρανση τους, ενώ στη συνέχεια νεαρά και κύτταρα μέσης ηλικίας υποβλήθηκαν σε εξωγενές οξειδωτικό στρες (300μM H₂O₂, 30min) και αφέθηκαν να ανακάμψουν σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0h, 1h, 6h, 24h, 48h). Σε όλα τα διαφορετικά passages καθώς και σε όλα τα χρονικά σημεία συλλέχθηκαν δείγματα για ανάλυση α) των μεταγραφικών επιπέδων της Gadd45a με real-time PCR και β) των πρωτεϊνικών επιπέδων της Gadd45a με western blot ανάλυση. Επίσης μελετήθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έπειτα από επίδραση

με UVB 250 J m⁻².

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας έπειτα από την επίδραση της ακτινοβολίας UVB παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Gadd45a επιβεβαιώνοντας το γνωστό ρόλο της στην απόκριση στο UV στρες γεγονός που έχει αποδειχθεί και από τους (Hollander *et al.*, 1993) σε κυτταρικές σειρές ποντικών CHO-K1, hamster V79 και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HeLa RKO. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν επίσης κατόπιν της επαγωγής με ιοντίζουσα ακτινοβολία (Xrays, 2Gy) του γονιδίου gadd45 σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων (Papathanasiou *et al.*, 1991).

Επιπροσθέτως καταγράφηκε σημαντική αύξηση τόσο στα μεταγραφικά όσο και στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Gadd45a κατά την γήρανση των hMSC, όπως χαρακτηριστικά φαίνεται από τη διαφορά μεταξύ p8 και p14. Οι (Plyusnina, Shaposhnikov and Moskalev, 2011) έδειξαν ότι υπερέκφραση της d-Gadd45 *Drosophila melanogaster* οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής της δίχως να επηρεάζεται η γονιμότητα και η φυσική της δραστηριότητα. Επίσης σύμφωνα πάλι με την ίδια έρευνα στην άγριου τύπου *Drosophila melanogaster* η Gadd45 οδηγείται σε δραματική μείωση των επιπέδων της. Συγκρίνοντας κάποιος επιφανειακά τις δύο αυτές μελέτες θα μπορούσε να οδηγηθεί στο συμπέρασμα πως έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά δε θα ήταν ένα ασφαλές συμπέρασμα καθώς στη δική μας μελέτη έχουμε εικόνα μόνο για μεσαίας ηλικίας βλαστοκύτταρα και όχι για εκτένως γηρασμένα κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η αύξηση αυτή των επιπέδων της Gadd45a στα μεσαίας ηλικίας κύτταρα πιθανά υποδηλώνει μια προσπάθεια των κυττάρων μας να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες βλάβες που είναι γνωστό πως δημιουργούνται κατά τη γήρανση έτσι ώστε να αποφευχθεί η εγκαθίδρυσή της.

Παρότι η Gadd45a σχετίζεται με πληθώρα ειδών στρες λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν το οξειδωτικό στρες. Οι (Kobayashi *et al.*, 2005) παρατήρησαν σε κύτταρα *C. elegans* την επαγωγή της Gadd45 μέσω αναστολής της FOXO. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έπειτα από επίδραση με εξωγενές οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα παρατηρήθηκε πως τόσο σε νεαρά όσο και σε μεσαίας ηλικίας κύτταρα αυξάνονται τα πρωτεϊνικά και τα μεταγραφικά επίπεδα της σε όλα σχεδόν τα χρονικά διαστήματα ανάκαμψης κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των (Kobayashi *et al.*, 2005).

Οι βλάβες που προκλήθηκαν μετά το οξειδωτικό στρες στα βλαστοκύτταρά

μας, επιβεβαιώθηκαν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού μέσω της ιστόνης γH2AX καταδεικνύοντας πως τα νεαρής ηλικίας κύτταρα επιδιορθώνουν τις βλάβες από το οξειδωτικό στρες γρηγορότερα από αυτά μεγαλύτερης ηλικίας. Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξαν οι (Trachana et al., 2017) χρησιμοποιώντας μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από λιπώδη ιστό.

Τέλος θελήσαμε να συγκρίνουμε αν το πρότυπο ανάκαμψης (0h, 1h, 6h, 24h, 48h) έπειτα από την εξωγενή οξειδωτική προσβολή εμφανίζει διαφορές μεταξύ νεαρών και μεσαίας ηλικίας μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Στα νεαρά κύτταρα (p8) παρατηρείται μεγάλη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της στην 1h ανάκαμψης από το εξωγενές στρες και σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Gadd45a στο ίδιο χρονικό σημείο. Η αύξηση αυτή των επιπέδων της Gadd45a ακολουθείται από σημαντική μείωση στις 6 και 24h ανάκαμψης. Αντίθετα από την επίδραση του οξειδωτικού στρες σε κύτταρα μεγαλύτερου passage (p14) παρατηρείται πολύ μικρότερη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της Gadd45a. Επιπλέον παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Gadd45a, που όμως εμφανίζεται στις 6h ανάκαμψης και φαίνεται να διατηρείται ακόμη και 24h μετά την επίδραση του στρες. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των (Edwards et al., 2004) όπου παρατηρήθηκε πως σε μερικούς ιστούς ποντικών η ικανότητα των γηρασμένων κυττάρων να ανταποκρίνονται στο οξειδωτικό στρες μειώνεται αρκετά. Συγκεκριμένα οι (Edwards et al., 2004) αυξάνοντας την παραγωγή ριζών σουπεροξειδίου σε καρδιομυοκύτταρα νεαρών ποντικών αυξάνεται η έκφραση και των τριών πρωτεϊνών της οικογένειας Gadd45 ενώ δε συμβαίνει το ίδιο σε καρδιομυοκύτταρα γηρασμένων ποντικών.

Θεωρούμε ότι τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ένα νέο ρόλο για την Gadd45a που την εμπλέκει τόσο στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες όσο και πιθανά στην εγκαθίδρυση της επαγόμενης από το στρες κυτταρικής γήρανσης. Περισσότερες μελέτες χρειάζονται ασφαλώς προκειμένου να διευκρινιστεί αυτός ο ρόλος και η σημασία του για την κυτταρική γήρανση.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aikens, J. and Dix, T. A. (1991) 'Perhydroxyl radical (HOO???) initiated lipid peroxidation: The role of fatty acid hydroperoxides', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1016/j.jallcom.2018.04.139.
- Antunes, F., Han, D. and Cadenas, E. (2002) 'Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01016-X.
- Baker, D. J. *et al.* (2011) 'Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders', *Nature*. doi: 10.1038/nature10600.
- Barreto, G. *et al.* (2007) 'Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation', *Nature*. doi: 10.1038/nature05515.
- Bartkova, J. *et al.* (2006) 'Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints', *Nature*. doi: 10.1038/nature05268.
- Beane, O. S. and Darling, E. M. (2012) 'Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration', *Annals of Biomedical Engineering*. doi: 10.1007/s10439-012-0639-8.
- BECKER, A. J., McCULLOCH, E. A. and TILL, J. E. (1963) 'Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells', *Nature*. doi: 10.1038/197452a0.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1997) 'Oxidative decay of DNA', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.272.32.19633.
- Bharathiraja, C. *et al.* (2014) 'Interaction of Wharton's Jelly Derived Fetal Mesenchymal Cells with Tumor Cells', *Current Stem Cell Research & Therapy*. doi: 10.2174/1574888X09666140507153248.
- Bindoli, A., Rigobello, M. P. and Deeble, D. J. (1992) 'Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/0891-5849(92)90182-G.

- Blanpain, C. *et al.* (2011) 'DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells', *Cell Stem Cell*. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.012.
- Bobis, S., Jarocha, D. and Majka, M. (2006) 'Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications', *Folia Histochemica et Cytobiologica*. doi: 10.4252/wjsc.v2.i4.67.
- Bongso, A. *et al.* (1994) 'Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts', *Hum Reprod*. doi: 10.1016/S0093-691X(05)80077-9.
- Brewer, T. F. *et al.* (2015) 'Chemical Approaches to Discovery and Study of Sources and Targets of Hydrogen Peroxide Redox Signaling Through NADPH Oxidase Proteins', *Annual Review of Biochemistry*. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034018.
- Burtner, C. R. and Kennedy, B. K. (2010) 'Progeria syndromes and ageing: What is the connection?', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2944.
- Cadenas, E. (1997) 'Basic mechanisms of antioxidant activity', *BioFactors*. doi: 10.1002/biof.5520060404.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. A. (2000) 'Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00317-8.
- Cadenas, E. and Sies, H. (1998) 'The lag phase', *Free Radical Research*. doi: 10.3109/10715769809065816.
- Campisi, J. (2001) 'From cells to organisms: Can we learn about aging from cells in culture?', in *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/S0531-5565(00)00230-8.
- Carey, B. W. *et al.* (2011) 'Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells', *Cell Stem Cell*. doi: 10.1016/j.stem.2011.11.003.
- Carrier, F. *et al.* (1999) 'Gadd45, a p53-Responsive Stress Protein, Modifies DNA Accessibility on Damaged Chromatin', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.19.3.1673.
- Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. (1993) 'An introduction to free radical

- biochemistry', *British Medical Bulletin*. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625.
- Clarkson, P. M. and Thompson, H. S. (2000) 'Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?', in *American Journal of Clinical Nutrition*. doi: 10.1093/ajcn/72.2.637S.
- Conner, E. M. and Grisham, M. B. (1996) 'Inflammation, free radicals and antioxidants', *Nutrition*. doi: 10.1016/S0899-9007(96)00000-8.
- Cretu, A. *et al.* (2009) 'Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer', *Cancer Therapy*.
- Cristofalo, V. J. and Kritchevsky, D. (1969) 'Cell size and nucleic acid content in the diploid human cell line WI-38 during aging', *Pharmacology*. doi: 10.1159/000137216.
- D'Adda Di Fagagna, F. *et al.* (2003) 'A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence', *Nature*. doi: 10.1038/nature02118.
- Dimri, G. P. *et al.* (1995) 'A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
- Dizdaroglu, M. (1991) 'Chemical determination of free radical-induced damage to DNA', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/0891-5849(91)90080-M.
- Dunlop, R. A., Brunk, U. T. and Rodgers, K. J. (2011) 'Proteins containing oxidized amino acids induce apoptosis in human monocytes', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/BJ20100682.
- Dutton, A. *et al.* (2004) 'Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0400765101.
- Edwards, M. G. *et al.* (2004) 'Impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the heart of aged C57BL/6 mice', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1196/annals.1297.017.

- Eijkelenboom, A. and Burgering, B. M. T. (2013) 'FOXOs: Signalling integrators for homeostasis maintenance', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3507.
- Eisenberg, L. M. and Eisenberg, C. A. (2003) 'Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation', *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. doi: 10.1002/bdrc.10017.
- Evans, P. and Halliwell, B. (2001) 'Micronutrients: oxidant/antioxidant status', *British Journal of Nutrition*. doi: 10.1049/BJN2000296.
- Fehrenbach, E. and Northoff, H. (2001) 'Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins', *Exercise Immunology Review*.
- Flores, I. *et al.* (2008) 'The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.451008.
- Fornace, A. J. *et al.* (1989) 'Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents.', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.9.10.4196.
- Fornace, A. J., Alamo, I. and Hollander, M. C. (1988) 'DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.85.23.8800.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. and Kulagina, N. N. (1976) 'Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.', *Experimental hematology*. doi: 10.1504/ijtm.2003.003454.
- Gao, L. R. *et al.* (2013) 'Common expression of stemness molecular markers and early cardiac transcription factors in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and embryonic stem cells', *Cell Transplantation*. doi: 10.3727/096368912X662444.
- Gardner, R. L. (2002) 'Stem cells: Potency, plasticity and public perception', *Journal of Anatomy*. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00029.x.
- Gorgoulis, V. G. *et al.* (2005) 'p53-Dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions', *Laboratory Investigation*. doi: 10.1038/labinvest.3700241.

- Gupta, M. P. *et al.* (1997) 'Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion', *Molecular and Cellular Biochemistry*. doi: 10.1023/A:1006829902442.
- Halliwell, B. (2007) 'Biochemistry of Oxidative Stress', *Angewandte Chemie International Edition in English*. doi: 10.1002/anie.198610581.
- Halliwell, B. and Cross, C. E. (1994) 'Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress', in *Environmental Health Perspectives*. doi: 10.2307/3432205.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1991) 'Free radicals in biology and medicine, second edition', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/0891-5849(91)90055-8.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004) 'Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?', *British Journal of Pharmacology*. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990) 'Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts', *Nature*. doi: 10.1038/345458a0.
- Hayflick, L. (1965) 'The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- Hollander, M. C. *et al.* (1993) 'Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage', *Journal of Biological Chemistry*.
- Hollander, M. C. and Fornace, A. J. (2002) 'Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1205774.
- Janzen, V. *et al.* (2006) 'Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 INK4a', *Nature*. doi: 10.1038/nature05159.
- Jin, S. G., Guo, C. and Pfeifer, G. P. (2008) 'GADD45A does not promote DNA demethylation', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1000013.

- Jones, D. P. *et al.* (2000) 'Redox state of glutathione in human plasma', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00275-0.
- Ju, Z. *et al.* (2007) 'Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm1578.
- Jung, H. J. *et al.* (2007) 'Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1210557.
- Kastan, M. B. *et al.* (1992) 'A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia', *Cell*. doi: 10.1016/0092-8674(92)90593-2.
- Kemp, C. J. *et al.* (1993) 'Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors', *Cell*. doi: 10.1016/0092-8674(93)90461-X.
- Kenyon, C. J. (2010) 'The genetics of ageing', *Nature*. doi: 10.1038/nature08980.
- Khallouki, F. *et al.* (2003) 'Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects', *European Journal of Cancer Prevention*. doi: 10.1097/00008469-200302000-00011.
- Kobayashi, Y. *et al.* (2005) 'SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress.', *International journal of molecular medicine*. doi: 10.3892/ijmm.16.2.237.
- Krinsky, N. I. (2002) 'Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls', *The Journal of nutrition*.
- Kujoth, C. C. *et al.* (2005) 'Medicine: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging', *Science*. doi: 10.1126/science.1112125.
- Levine, R. L. (2002) 'Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00765-7.

- Liebermann, D. a and Hoffman, B. (2013) 'Gadd45 Stress Sensor Genes', *Advances in experimental medicine and biology*. doi: 10.1007/978-1-4614-8289-5.
- Lombard, D. B. *et al.* (2000) 'Mutations in the WRN Gene in Mice Accelerate Mortality in a p53-Null Background', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.20.9.3286-3291.2000.
- Loschen, G., Flohé, L. and Chance, B. (1971) 'Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/0014-5793(71)80459-3.
- Marnett, L. J. (2000) 'Oxyradicals and DNA damage', *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/21.3.361.
- Matsumura, T., Zerrudo, Z. and Hayflick, L. (1979) 'Senescent human diploid cells in culture: Survival, DNA synthesis and morphology', *Journals of Gerontology*. doi: 10.1093/geronj/34.3.328.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (2014) 'Superoxide Dismutases: You've Come a Long Way, Baby', *Antioxidants & Redox Signaling*. doi: 10.1089/ars.2013.5547.
- Miller, D. M., Buettner, G. R. and Aust, S. D. (1990) 'Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/0891-5849(90)90148-C.
- Mitchell, J. R., Wood, E. and Collins, K. (1999) 'A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita', *Nature*. doi: 10.1038/990141.
- Molofsky, A. V. *et al.* (2006) 'Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing', *Nature*. doi: 10.1038/nature05091.
- Monette, F. C. and Stockel, J. B. (1980) 'Blood-borne stem cells are immunologically distinct from those in other hematopoietic tissues', *Exp Hematol*.
- Morrison, S. J. and Kimble, J. (2006) 'Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer', *Nature*. doi: 10.1038/nature04956.
- Mulder, K. M. (2000) 'Role of Ras and Mapks in TGF β signaling', *Cytokine and Growth Factor Reviews*. doi: 10.1016/S1359-6101(99)00026-X.

- Ong, S. G. *et al.* (2015) 'MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells', *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi: 10.1016/j.addr.2015.04.004.
- Papathanasiou, M. A. *et al.* (1991) 'Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C.', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.11.2.1009.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review', *European Journal of Medicinal Chemistry*. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Plyusnina, E. N., Shaposhnikov, M. V. and Moskalev, A. A. (2011) 'Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to D-GADD45 overexpression in the nervous system', *Biogerontology*. doi: 10.1007/s10522-010-9311-6.
- Powers, S. K. and Lennon, S. L. (1999) 'Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle', in *Proceedings of the Nutrition Society*. doi: 10.1017/S0029665199001342.
- Ray, R. S. *et al.* (2001) 'Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics', *Drug and Chemical Toxicology*. doi: 10.1081/DCT-100102610.
- Reid, M. B. (2001) 'Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't.', *J Appl Physiol*. doi: 10.1152/japplphysiol.00017.2004.
- Reubinoff, B. E. *et al.* (2000) 'Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro', *Nature Biotechnology*. doi: 10.1038/74447.
- Schmitz, K. M. *et al.* (2009) 'TAF12 Recruits Gadd45a and the Nucleotide Excision Repair Complex to the Promoter of rRNA Genes Leading to Active DNA Demethylation', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.015.
- Schöler, H. R. (2004) 'The potential of stem cells. An Inventory', *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. doi: 10.1007/s00103-004-0818-3.
- Schrag, J. D. *et al.* (2008) 'The crystal structure and dimerization interface of

- GADD45 γ ', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0800086105.
- Serrano, M. *et al.* (1997) 'Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a)', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- Siems, W. G., Grune, T. and Esterbauer, H. (1995) '4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine', *Life Sciences*. doi: 10.1016/0024-3205(95)02006-5.
- Signer, R. A. J. and Morrison, S. J. (2013) 'Mechanisms that regulate stem cell aging and life span', *Cell Stem Cell*. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.001.
- Sikora, E. *et al.* (2011) 'Impact of cellular senescence signature on ageing research', *Ageing Research Reviews*. doi: 10.1016/j.arr.2010.10.002.
- Smith, M. L. *et al.* (1994) 'Interaction of the p53-regulated protein GADD45 with proliferating cell nuclear antigen', *Science*. doi: 10.1126/science.7973727.
- Smith, M. L. *et al.* (2000) 'p53-Mediated DNA Repair Responses to UV Radiation: Studies of Mouse Cells Lacking p53, p21, and/or gadd45 Genes', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.20.10.3705-3714.2000.
- Sperka, T., Wang, J. and Rudolph, K. L. (2012) 'DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3420.
- Stadtman, E. R. (2004) 'Role of Oxidant Species in Aging', *Current Medicinal Chemistry*. doi: 10.2174/0929867043365341.
- Takekawa, M. and Saito, H. (1998) 'A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81619-0.
- Tomás-Loba, A. *et al.* (2008) 'Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.034.
- Trachana, V. *et al.* (2017) 'Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage',

Cytotherapy. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.078.

- Trifunovic, A. *et al.* (2004) 'Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase', *Nature*. doi: 10.1038/nature02517.
- Troyer, D. L. and Weiss, M. L. (2008) 'Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population', *Stem Cells*. doi: 10.1634/stemcells.2007-0439.
- Valavanidis, A. *et al.* (2006) 'Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.
- Valko, M. *et al.* (2006) 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer', *Chemico-Biological Interactions*. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Valko, M. *et al.* (2007) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Pergamon, 39(1), pp. 44–84. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2006.07.001.
- Vaziri, H. and Benchimol, S. (1996) 'From telomere loss to P53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/0531-5565(95)02025-X.
- Wang, H.-S. *et al.* (2004) 'Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord', *Stem Cells*. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013.
- Wang, M. *et al.* (1996) 'Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.
- Wang, X. W. *et al.* (1999) 'GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.96.7.3706.
- Wong, K. K. *et al.* (2003) 'Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises

organ homeostasis and accelerates ageing', *Nature*. doi: 10.1038/nature01385.

Zerbini, L. F. *et al.* (2004) 'NF- κ B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45 α and γ is essential for cancer cell survival', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0402069101.

Zhan, Q. *et al.* (1998) 'Tumor Suppressor p53 Can Participate in Transcriptional Induction of the GADD45 Promoter in the Absence of Direct DNA Binding ', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.18.5.2768.

Zhan, Q. *et al.* (1999) 'Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1202667.

Zhu, N. *et al.* (2009) 'Gadd45- α and Gadd45- γ utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells', *Molecular Biology Reports*. doi: 10.1007/s11033-008-9419-9.