



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής κ. Βασίλειος Γ. Γοργούλης

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Ανάπτυξη, εφαρμογή και αξιολόγηση χημικών
αναλόγων του Sudan Black B στην ανθρώπινη
νόσο.”

Ρίζου Σοφία

Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια, MSc

Επιβλέπων: Επικ. Καθηγήτρια Χαβάκη Σοφία

ΑΘΗΝΑ, 2020

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΩΔΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ·
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
 ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
 Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΔΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Στοιχεία διδακτορικής διατριβής

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Χαβάκη Σοφία (Επιβλέπουσα), Επικ. Καθηγήτρια, Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Γοργούλης Βασίλης, Καθηγητής-Διευθυντής Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Γοργούλης Βασίλης, Καθηγητής-Διευθυντής Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Πάντος Κωνσταντίνος, Καθηγητής-Διευθυντής Εργ. Φαρμακολογίας

Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη, Αναπλ. Καθηγήτρια, Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Ευαγγέλου Κωνσταντίνος, Αναπλ. Καθηγητής, Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Χαβάκη Σοφία (Επιβλέπουσα), Επικ. Καθηγήτρια, Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Πατέρας Ιωάννης, Επικ. Καθηγητής, Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Μουρούζης Ιορδάνης, Επ. Καθηγητής, Εργ. Φαρμακολογίας

Ημερομηνία αρχικής αίτησης: 2/11/2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 22/12/2016

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16/2/2018

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 21/5/2020

Στην οικογένεια μου

Ρίζου Σοφία

Μοριακός Βιολόγος και Γενετίστρια, MSc

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens**
Konstantinos Evangelou, Nikolaos Lougiakis, **Sophia V Rizou**, Athanassios Kotsinas, Dimitris Kletsas, Daniel Muñoz Espín, Nikos Kastrinakis, Nicole Pouli, Panagiotis Marakos, Paul Townsend, Manuel Serrano, Jiri Bartek and Vassilis G. Gorgoulis
EMBO workshop on Nuclear function and cell fate choice, Kyllini 18-22 September 2016
- **NAT polymorphic variants in primates.**
Drakomathioulaki N., Giannouri D., Marinakis N., **Rizou S.**, Stefani I., Tsirka T., Zaliou S., Crouau-Roy B., Sabbagh A., Boukouvala S., Fakis G.
7th International Workshop on N-acetyltransferases (NAT), Trier, Germany, 18-20 June 2016
- **Functional in-vitro study of polymorphisms of the NAT1 enzyme in the primate *Macaca mulatta* (Rhesus).**
Marinakis Nikolaos, Giannouri Despoina, **Rizou Sophia**, Tsirka Theodora, Sabbagh Audrey, Boukouvala Sotiria, Fakis Giannoulis.
36ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Ιωάννινα, 8-10 Μαΐου 2014.
- **Enzymatic activities of novel NAT1 and NAT2 polymorphic variants found in a population of model primate *Macaca Mulatta* (Rhesus Macaque).**
Sotiria Boukouvala, Theodora Tsirka, Nafsika Drakomathioulaki, Despina Giannouri, Nikolaos Marinakis, **Sofia Rizou**, Sofia Zaliou, Audrey Sabbagh, Brigitte Crouau-Roy and Giannoulis Fakis.
19th North American Regional Meeting of the International Society for the Study of the Xenobiotics (ISSX), San Francisco, CA, USA, 19-23 October 2014.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Σήμερα

Υποψήφια διδάκτωρ στο εργαστήριο Ιστολογίας-εμβρυολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών στο εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, στην ομάδα Μοριακής καρκινογένεσης.

2014-2016

Διατμηματικό πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Μοριακή Ιατρική" του ΕΚΠΑ.

2010-2014

Μοριακή Βιολογία και Γενετική (ΜΒΓ) της Σχολής Επιστημών Υγείας του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης με βαθμό πτυχίου 6.86.

2010

1^ο Γενικό Λύκειο Άρτας με βαθμό απολυτηρίου 18 9/10.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

10/2015-10/2016

Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, ομάδα Μοριακής καρκινογένεσης, Ιατρική Αθηνών του Καθηγητή κ. Γοργούλη Β. (vgorg@med.uoa.gr)

Διπλωματική εργασία με τίτλο: "Συγκριτική μελέτη δεικτών ανίχνευσης κυτταρικής γήρανσης".

Τεχνικές

Ανοσοϊστοχημία, κυτταροκαλλιέργειες, ιστοχημική χρώση Sudan Black B, SA β-gal assay, Απομόνωση πρωτεϊνών, Western blotting, Flow cytometry analysis, Electron microscopy

06/2015 - 09/2015

Χωρέμειο ερευνητικό εργαστήριο του νοσοκομείου Παιδών 'Αγία Σοφία' στα πλαίσια του μεταπτυχιακού.

Τεχνικές

MLPA, PCR, αιμοληψία, DNA extraction, RFLP, ανάλυση καρυότυπου, Sequencing

11/2014 - 05/2015

Εργαστήριο του Ερευνητή Γ'κ.Κλινάκη στο ΙΙΒΕΑ στα πλαίσια του μεταπτυχιακού. Εργαστηριακή εκπαίδευση σε μοριακά μονοπάτια του καρκίνου.

Τεχνικές

Κυτταροκαλλιέργειες, διαχείριση πειραματοζώων, PCR, Western Blotting.

10/2013 - 10/2014

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής της Επίκουρου Καθηγήτριας κ.Μπουκουβάλα Σ. (sboukouv@mbg.duth.gr) του ΜΒΓ για τη Διπλωματική εργασία με θέμα:

«Λειτουργική μελέτη πολυμορφισμών του ενζύμου NAT1 στο πρωτεύον *Macaca mulatta* (Rhesus)».

Τεχνικές

Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA (Cloning), Site-Directed Mutagenesis, Σχεδιασμός εκκινωτών (primer), Ανάλυση αλληλούχησης, PCR, Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης, Μετασχηματισμός βακτηρίων, Miniprep, Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών, SDS-PAGE, Μέτρηση ενζυματικής ενεργότητας, Western Blotting.

06/2013 - 08/2013

Πρακτική Άσκηση - ΕΣΠΑ 2007-2013 στο Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής της Επίκουρου Καθηγήτριας κ. Μπουκουβάλα Σ. (sboukouv@mbg.duth.gr) με θέμα "Πρακτική άσκηση σε μοριακές τεχνικές απομόνωσης βιολογικών μορίων (RNA, DNA, πρωτεΐνες) από ανθρώπινο ιστό και βακτηριακά κύτταρα.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- **Αγγλικά** – Certificate of Proficiency
- **Γαλλικά** – Delf B2

ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ-ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Εθελοντική εργασία στο Athens Science Festival στην Αθήνα στις 17-22/3/2015
- Καλή γνώση ηλεκτρονικών υπολογιστών
- Συμμετοχή στη χορευτική ομάδα του συλλόγου Κρητών Έβρου
- Συμμετοχή στη θεατρική ομάδα του συλλόγου Δασκάλων και Νηπιαγωγών Πρωτοβάθμιας εκπαίδευσης
- Σπουδές ακορντεόν (5 χρόνια)
- Συμμετοχή με διάκριση σε διαγωνισμό ζωγραφικής

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2019

Διαλέξεις στα προγράμματα μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο “Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική” και “Molecular Biomedicine”

2015-Σήμερα

Ιδιαίτερα μαθήματα Βιολογίας Προσανατολισμού και Γενικής Παιδείας σε μαθητές Γ' Λυκείου

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΓΚΡΙΤΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- **A novel quantitative method for the detection of lipofuscin, the main by-product of cellular senescence, in fluids.**
Rizou, S.V., Evangelou, K., Myrianthopoulos, V. et al.
Methods in Molecular Biology, 2019, vol. 1896, doi:10.1007/978-1-4939-8931-7_12
- **Population variability of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) NAT1 gene for arylamine N-acetyltransferase 1: Functional effects and comparison with human.**
Boukouvala S., Chasapopoulou Z., Giannouri D., Kontomina E., Marinakis N., Rizou S.V., et al.
Scientific Reports, 2019, vol.9, issue 10937
- **Immunohisto(cyto)chemistry: An old time classic tool driving modern oncological therapies.**
Cooks, T., Theodorou, S.D.P., Paparouna, E., **Rizou, S.V.** et al.
Histology and Histopathology, 2019, vol.34, issue 4
- **A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence.**
Komseli, E.-S., Pateras, I.S., Krejsgaard, T., Stawiski, K., **Rizou, S.V.**, Polyzos, A. et al.
BMC Genomics, 2018, vol.19, issue 1, doi: 10.1186/s12864-017-4375-1
- **Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease.**
Kritsilis, Marios, **Rizou, Sophia V.**, Koutsoudaki, Paraskevi N., Evangelou, Konstantinos, Gorgoulis, Vassilis G., Papadopoulos, Dimitrios
International Journal of Molecular Sciences, 2018, doi:10.3390/ijms19102937
- **Monitoring autophagy immunohistochemically and ultrastructurally during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway.**
Havaki, S., Vlachou, V., Zampetidis, C.P., Selemenakis, P., Kotsinas, A., Mavrogonatou, E., Rizou, S.V., Kyrodimos, E., Evangelou, K., Kletsas, D.
International Journal of Molecular Sciences, 2017, vol.18, issue 9, doi: 10.3390/ijms18091920
- **Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens**
Konstantinos Evangelou, Nikolaos Lougiakis, **Sophia V Rizou**, Athanassios Kotsinas, Dimitris Kletsas, Daniel Muñoz Espín, Nikos Kastrinakis, Nicole Pouli, Panagiotis Marakos, Paul Townsend, Manuel Serrano, Jiri Bartek and Vassilis G. Gorgoulis
Aging Cell, 2016 Nov, vol.16, issue 1, doi: 10.1111/acer.12545
- **Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: the role of TGF-β.**
Liakou E, Mavrogonatou E, Pratsinis H, **Rizou S**, Evangelou K, Panagiotou PN, Karamanos NK, Gorgoulis VG, Kletsas D.
Aging (Albany NY). 2016 Aug;8(8):1650-69. doi: 10.18632/aging.100989.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ – ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Παρακολούθηση απογευματινών μαθημάτων διάρκειας 10 ωρών για τη δομή και λειτουργία *in-vitro* Διαγνωστικών εργαστηρίων του σύγχρονου Νοσοκομείου, Ελληνική Εταιρεία Κλινική Χημείας-Βιοχημείας, Αθήνα, 3/2-18/5 2016.
- Παρακολούθηση των εργασιών του «Masterclass on Tumor Biomarkers», Ελληνική Ογκολογική Ερευνητική Ομάδα, Αθήνα, 12-13 Μαΐου 2016.
- Παρακολούθηση του 16^{ου} Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Γενετικής «**Νεότερα δεδομένα στην Κλινική Γενετική**» του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 16 Απριλίου 2016.
- Παρακολούθηση του 15^{ου} Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Γενετικής «**Η νέα γενετική κοντά στον κλινικό ιατρό**» του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, 28 Μαρτίου 2015.
- Συμμετοχή στο **36^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών**, Ιωάννινα, 8-10 Μαΐου 2014.
- Παρακολούθηση των εργασιών του **64^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας**, Αθήνα, 6-8 Δεκεμβρίου 2013.
- Παρακολούθηση των εργασιών του συνεδρίου «**Sexually Transmitted Viral Infections: Current Diagnostic and Therapeutic Approaches**», Αλεξανδρούπολη, 15-17 Νοεμβρίου 2013.
- Συμμετοχή στο 12^ο Συνέδριο «**Ιατρική Χημεία: Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων**». Επίτιμος και Κεντρικός Ομιλητής του Συνεδρίου ήταν ο Dr James D. Watson, Nobel in Medicine and Physiology (1962), Πάτρα, 12-15 Απριλίου 2011.
- Παρακολούθηση 3^{ης} Ημερίδας «**Φαρμακογονιδιωματική και εξατομικευμένη θεραπεία**» από την Goldenhelix, Αλεξανδρούπολη, 8^η Απριλίου 2011.
- Παρακολούθηση των εργασιών του **61^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας**, Αλεξανδρούπολη, 18-22 Οκτωβρίου 2010.

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διδακτορική διατριβή με τίτλο “Ανάπτυξη, εφαρμογή και αξιολόγηση χημικών αναλόγων του Sudan Black B στην ανθρώπινη νόσο” εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το χρονικό διάστημα 2016-2020. Τα αποτελέσματα της διατριβής έχουν δημοσιευθεί σε άρθρα σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά.

Για την υλοποίηση του συγκεκριμένου εγχειρήματος συνέβαλαν αρκετοί άνθρωποι, τους οποίους οφείλω να αναφέρω και να εκφράσω τις ευχαριστίες μου. Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Βασίλη Γοργούλη για την ευκαρία που μου έδωσε να γίνω μέλος αυτής της ερευνητικής ομάδας, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση του. Αποτέλεσε έμπνευση για την ερευνητική μου πορεία και με βοήθησε να εξελιχθώ ως ερευνήτρια, αλλά και ως άνθρωπος.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Σοφία Χαβάκη για όλες τις στιγμές που μοιραστήκαμε, για την στήριξη της και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Ευαγγέλου, καθώς χωρίς τη βοήθειά του δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής. Όλα αυτά τα χρόνια η στήριξη και η καθοδήγηση του ήταν ανεκτίμητες.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μυρσίνη Κουλούκουσα, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Πατέρα, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πάντο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιορδάνη Μουρούζη, που με τίμησαν λαμβάνοντας μέρος στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή αυτής της Διατριβής, καθώς και για την υπέροχη συνεργασία που είχαμε. Ιδιαίτερο ευχαριστώ στον κ. Πατέρα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κοτσίνα για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ πολύ, επίσης, όλα τα μέλη, πρώην και νυν, της ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας για την

αλληλοϋποστήριξη και το κλίμα συνεργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ελένη Δαμιανίδου, την Σοφία Θεοδώρου, τον Δημήτρη Βερούτη, την Δανάη Βελτσίστα, τον Χρήστο Ζαμπετίδη και την Πέγκυ Τσιώλη, γιατί οι πιο εύκολες και πιο δύσκολες στιγμές είναι καλύτερες όταν τις περνάς με παρέα.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω και να ευχαριστήσω τη φίλη μου Μελίνα Μητσιογιάννη, για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη όλο αυτό το διάστημα. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους φίλους μου Βασίλη Μεντώνη, Μαργαρίτα Πιτσιάνη, Στυλιανό Λαπαρίδη, Χριστίνα Ανδρονίκου, Ραφαέλα Φιλίππου, Βέρα Φασουλάκη και Παναγιώτη Μανδρέκα, γιατί ξεκινήσαμε τη φοιτητική ζωή όλοι μαζί και συνεχίζουμε να στηρίζουμε ο ένας τον άλλον.

Πάνω απ'όλα, όμως, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στον σύντροφο μου, Νίκο Μαρινάκη, γιατί σε αυτό το ταξίδι στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε στιγμή, δίνοντας μου αισιοδοξία και δύναμη να συνεχίσω.

Περίληψη

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί το στάδιο της μη αναστρέψιμης, στις περισσότερες περιπτώσεις, διακοπής της κυτταρικής ανάπτυξης, στην οποία το κύτταρο παραμένει μεταβολικά ενεργό. Εμπλέκεται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, σε φυσιολογικές καταστάσεις, στο γήρας (aging), καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις. Η συνεισφορά της μπορεί να είναι θετική, όπως στην περίπτωση της επούλωσης πληγής, ή να έχει αρνητικά αποτελέσματα, όπως στην περίπτωση της σαρκοπενίας. Η γήρανση είναι εξίσου σημαντική, καθώς αποτελεί φραγμό της καρκινογένεσης. Αν, όμως, συνεχιστεί η βλάβη του ιστού και γίνει μειωμένη προσέλκυση των μακροφάγων, τότε η γήρανση παύει να αναστέλλει την ανάπτυξη του αδενώματος και δημιουργεί ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη του όγκου. Μέχρι σήμερα, ο δείκτης που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της γήρανσης, είναι ο SA β-gal. Ο δείκτης αυτός, όμως, παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα, με αποτέλεσμα να γίνεται όλο και πιο δύσκολη η μελέτη της γήρανσης στα διάφορα κυτταρικά συστήματα. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία πιο βελτιωμένη, και με ευρεία εφαρμογή, νέα τεχνική ανίχνευσης των γηρασμένων κυττάρων, που βασίζεται στην χρώση με Sudan Black B (SBB), η οποία με την σειρά της έχει κάποιες τεχνικές προκλήσεις. Υπήρξε, λοιπόν, η ανάγκη για την σύνθεση νέων χημικών ενώσεων, οι οποίες εντοπίζουν τη λιποφουσκίνη, και επομένως τα γηρασμένα κύτταρα. Οι ενώσεις, αυτές, δοκιμάστηκαν σε συστήματα αναφοράς για τη γήρανση και το αποτέλεσμα ήταν ενθαρρυντικό. Το νέο χημικό ανάλογο του SBB, το οποίο ονομάζεται GL13 δεσμεύεται ειδικά και με ευαισθησία με τη λιποφουσκίνη. Χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13 αναπτύξαμε μία υβριδική ιστοχημική-ανοσοϊστοχημική μέθοδο και δείξαμε ότι η συσσώρευση λιποφουσκίνης αποτελεί ορόσημο της γήρανσης σε μεγάλη ποικιλία βιολογικών δειγμάτων. Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής εξετάστηκε, επίσης, το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης στον ορό του αίματος υγιών και ασθενών ατόμων, μετρώντας τα επίπεδα της λιποφουσκίνης. Οι υγιείς ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ηλικία, ενώ οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με την ασθένεια από την οποία πάσχουν. Οι ασθένειες που εξετάστηκαν είναι η καρδιακή ανεπάρκεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Βασική ιδέα αυτών των πειραμάτων είναι να ερευνήσουμε αν τα επίπεδα της ελεύθερης λιποφουσκίνης στον ορό διαφοροποιούνται ανάλογα με την ηλικία και σε τι ποσοστό, καθώς επίσης, αν αυτά τα επίπεδα αλλάζουν σε κάποιες ασθένειες, αποτελώντας, ίσως, μελλοντικό προγνωστικό δείκτη.

Abstract

Cellular senescence is an essentially irreversible cell-cycle arrest that can be an alarm response instigated by numerous stressors, including exposure to genotoxic agents, nutrient deprivation. It is a cell state implicated in various physiological processes and a wide range of age-related diseases and contributes to organismal development, aging, and diverse pathologies. Senescence is, also, important as an anti-tumour barrier to carcinogenesis. However, if tissue damage continues and macrophage attraction is reduced, senescent cells are not able to inhibit adenoma development and carcinogenesis, creating an environment conducive to tumor growth.

To date, the most widely used method to detect senescent cells is Senescence-associated b-galactosidase activity (SA-b-gal) assay. This biomarker, however, has many disadvantages, making it increasingly difficult to study senescence in various cellular systems. Recently, it has been reported specific recognition of senescent cells in biological material including cultured cells, fresh/frozen, and archival (formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) tissues, applying the Sudan Black B (SBB) histochemical dye. SBB reacts with lipofuscin, a non degradable aggregate of oxidized proteins, lipids, and metals. Lipofuscin accumulates in senescent cells, as a by-product of the senescent process, and should be considered as a new 'hallmark' of senescence. There was, therefore, a scientific idea to synthesize new chemical compounds, which detect lipofuscin, and therefore senescent cells. We designed and synthesized a lipophilic, biotin-linked Sudan Black B (SBB) analogue, GL13, suitable for sensitive and specific, antibody-enhanced detection of lipofuscin-containing senescent cells in any biological material. This new hybrid histo-/immunochemical method is easy to perform, reliable, and universally applicable to assess senescence in biomedicine, from cancer research to gerontology.

During the doctoral dissertation, the phenomenon of cellular senescence in the blood serum of healthy and pathological samples was also examined, measuring the levels of lipofuscin. The healthy were classified into two categories depending on age, while the patients were classified according to the disease from which they suffer. The diseases that were examined were heart failure, rheumatoid arthritis, cancer and neurodegenerative diseases.

The aim of these experiments was to investigate whether lipofuscin levels in blood serum vary according to age and in what percentage, as well as whether these levels change in some diseases, possibly indicating lipofuscin as a future prognosis biomarker.

Περιεχόμενα

Περίληψη	10
Abstract	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
1.1 Τι είναι η κυτταρική γήρανση	19
1.2 Είδη της γήρανσης	19
1.3 Χαρακτηριστικά της γήρανσης	21
1.3.1 Κυτταρικός κύκλος	21
1.3.2 Φαινότυπος έκκρισης-σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP)	23
1.3.3 Βλάβες σε μακρομόρια	26
1.3.3.1 Βλάβες στο DNA	26
1.3.3.2 Βλάβες σε πρωτεΐνες	27
1.3.3.3 Βλάβες σε λιπίδια	28
1.3.4 Διαταραχές στη δομή της χρωματίνης	29
1.4 Το μοντέλο της γήρανσης	30
1.5 Το φαινόμενο της γήρανσης σε φυσιολογικές καταστάσεις	32
1.6 Το φαινόμενο της γήρανσης σε παθολογικές καταστάσεις	33
1.7 Ανίχνευση της λιποφουσκίνης σε βιολογικά δείγματα	35
1.8 Μέθοδοι ανίχνευσης της γήρανσης	37

1.8.1 Ενζυμική δραστικότητα SA-β-gal	37
1.8.2 Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο Sudan black B	39
1.8.3 Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13	41
1.9 Η γήρανση ως θεραπευτικός στόχος	43
1.10 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	47
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1 Προετοιμασία του αντιδραστηρίου GL13	48
2.2 Κυτταρικές σειρές	48
2.3 Δείγματα ιστών	48
2.4. <i>In situ</i> τεχνικές	48
2.4.1α Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο Sudan Black B (SBB)	49
2.4.1β Χρώση SA-β-gal	49
2.4.2 Ανοσοϊστοχημεία	50
2.4.3 Ανοσοϊστοχημική χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13	52
2.4.4 Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13	55
2.4.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση του αντιδραστηρίου GL13	57
2.4.6 <i>In situ</i> υβριδισμός και ανοσοφθορισμός με τη χρήση του χημικού αντιδραστηρίου GL13 σε κύτταρα	59
2.5 Κυτταρομετρία ροής με τη χρήση του χημικού αντιδραστηρίου GL13	61

2.6 Απομόνωση και ανίχνευση της λιποφουσκίνης με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και τη χρήση του αντιδραστηρίου GL13	63
2.7 Σχεδιασμός καμπύλης βαθμονόμησης	68
2.8 Απεικόνιση λιποφουσκίνης με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	69
2.9 Αντισώματα	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	73
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
3.1 <i>In situ</i> τεχνικές	74
3.1.1. Μελέτη του φαινομένου της γήρανσης σε κυτταρικές σειρές με τη χρήση του χημικού αντιδραστηρίου GL13.	74
3.1.1.1 Ανοσοφθορισμός	74
3.1.1.2 Ανοσοκυτταροχημεία	75
3.1.1.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη του φαινομένου της γήρανσης	78
3.1.1.4 Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13	80
3.1.1.5 Σύγκριση του χημικού αντιδραστηρίου GL13 με το αντιδραστήριο SBB και τη χρώση SA-β-gal.	82
3.2. Μελέτη του φαινομένου της γήρανσης και άλλων παραγόντων σε δείγματα εγκεφάλου με τη νόσο Σκλήρυνση κατά πλάκας.	85
3.3 Κυτταρομετρία ροής με το χημικό αντιδραστήριο GL13	87
3.4 Μελέτη της έκφρασης του miR34c σε γηρασμένα κύτταρα.	88
3.5 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε βιολογικά δείγματα	91
3.5.1 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε κύτταρα	91

3.5.2 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε ορούς αίματος	93
3.5.3 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε ωοθυλακικό υγρό	95
3.5.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε ομογενοποιημένο ανθρώπινο ιστό ήπατος.	97
3.6 Απεικόνιση της λιποφουσκίνης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	101
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	124
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	124
Συντομογραφίες	125
Δημοσιεύσεις	126

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι η κυτταρική γήρανση

Πρώτη φορά η γήρανση μελετήθηκε από τον Hayflick και τους συνεργάτες του, οι οποίοι παρατήρησαν ότι ανθρωπίνοι ινοβλάστες έχουν πεπερασμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε συνθήκες καλλιέργειας μετά από αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις (Hayflick, 1965). Σήμερα γνωρίζουμε ότι το συγκεκριμένο φαινόμενο αντικατοπτρίζει έναν ειδικό τύπο κυτταρικής γήρανσης, που δημιουργείται από τη μείωση του μήκους των τελομερών ύστερα από παρατεταμένο πολλαπλασιασμό, απουσία ενδογενούς δράσης της τελομεράσης. Η κυτταρική γήρανση είναι το φαινόμενο της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, ενώ παράλληλα το κύτταρο παραμένει μεταβολικά ενεργό. Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η αντίληψη ότι το φαινόμενο αυτό είναι μη αναστρέψιμο (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007), γεγονός που σήμερα γνωρίζουμε πως δεν ισχύει, καθώς έχειδειχθεί πειραματικά ότι η γήρανση μπορεί να αντιστραφεί (Komseli *et al.*, 2018; Galanos *et al.*, 2019; Gorgoulis *et al.*, 2019). Το φαινόμενο της γήρανσης αποτελεί θεμελιώδη βιολογική διαδικασία που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και ενήλικης ζωής και εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Rodier and Campisi, 2011).

1.2 Είδη της γήρανσης

Η γήρανση διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το αίτιο που την προκαλεί, την αναδιπλασιαστική (replicative) και την πρόωρη γήρανση (premature senescence). Στην αναδιπλασιαστική γήρανση τα τελομερή υπόκεινται σε φθορά εξαιτίας της ανικανότητας της DNA πολυμεράσης να αντιγράψει τις μονόκλωνες αλυσίδες (Gorgoulis and Halazonetis, 2010; Sikora *et al.*, 2011). Τα τελομερή είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5'-TTAGGG-3', συνδεόμενες με πρωτεΐνες που καλύπτουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων και τα προστατεύουν από την επίδραση του μονοπατιού DDR και την αποικοδόμηση (Harley, Futcher and Greider, 1990; D'Adda Di Fagagna, Teo and Jackson, 2004). Όταν τα τελομερή φτάσουν σε κρίσιμο ελάχιστο μήκος, η προστατευτική τους δομή διαταράσσεται και ενεργοποιείται δίκτυο κυτταρικών μονοπατιών, τα οποία εντοπίζουν και επιδιορθώνουν την βλάβη στο DNA (DNA Damage Response-DDR). Η απόκριση στην βλάβη του DNA είναι συνδεδεμένη με την εμφάνιση εστιών (foci), θετικών για την φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2A

(φωσφορυλίωση στο αμινοξύ σερίνη 139) και των DDR πρωτεϊνών 53BP1, NBS1 και MDC1 στον πυρήνα των κυττάρων. Στα γηρασμένα κύτταρα είναι, επίσης, ενεργοποιημένες οι κινάσες ATM και ATR (D'Adda Di Fagagna *et al.*, 2003). Οι κινάσες αυτές, με την σειρά τους, ενεργοποιούν τις κινάσες σερίνης-θρεονίνης CHK1 και CHK2. Η αλληλεπίδραση των DDR παραγόντων με τον μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου επέρχεται από την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων των CDC25 και p53. Όλες αυτές οι αλλαγές μπορούν να επάγουν την διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επιτρέποντας στα κύτταρα να επιδιορθώσουν την βλάβη. Η αναδιπλασιαστική γήρανση, εκτός από την πρωτεΐνη p53, έχει συνδεθεί με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη RB, όπως και άλλους παράγοντες του ίδιου σηματοδοτικού μονοπατιού, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης p16^{INK4A}. Η ενεργοποίηση τόσο του p53, όσο και του p16^{INK4A}-RB μονοπατιού είναι κρίσιμη για την επαγωγή της γήρανσης σε μία ποικιλία ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Η συνεισφορά της ενεργοποίησης των δύο αυτών μονοπατιών εξαρτάται από την κυτταρική σειρά, καθώς κάποιες απαιτούν μόνο την ενεργοποίηση του ενός από τα δύο μονοπάτια, ενώ άλλες και τα δύο (Kuilman *et al.*, 2010).

Η πρόωρη γήρανση μπορεί να προκύψει όταν το κύτταρο σταματά να πολλαπλασιάζεται, κάτω από διάφορες στρεσογόνες συνθήκες, οι οποίες δεν έχουν σχέση με το μήκος των τελομερών. Μία κατηγορία πρόωρης γήρανσης αποτελεί η επαγόμενη από ογκογονίδιο γήρανση (oncogene-induced senescence-OIS), όπου φυσιολογικά κύτταρα ανταποκρίνονται στην ενεργοποίηση διαφόρων ογκογονιδίων, και οδηγούνται σε κυτταρική γήρανση. Η OIS αποτελεί τη μορφή της γήρανσης, η οποία έχει συσχετιστεί περισσότερο με τις ανθρώπινες προκαρκινικές βλάβες (Collado *et al.*, 2005; Michaloglou *et al.*, 2005). Το φαινόμενο παρατηρήθηκε πρώτη φορά στο γονίδιο *RAS* (Serrano *et al.*, 1997) και αργότερα επεκτάθηκε σε άλλους παράγοντες του σηματοδοτικού μονοπατιού, όπως οι RAF, MEK, MOS, BRAF (Lin *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998; Michaloglou *et al.*, 2005). Έχει συνδεθεί, επίσης, με την αυξανόμενη έκφραση των ογκοκατασταλτικών p16^{INK4A} και ARF, καθώς και την ενεργοποίηση του μονοπατιού ελέγχου των δίκλωνων θραυσμάτων στο DNA (DNA double strand

breaks-DSB), ενδεικνύοντας πως αποτελεί τμήμα του φραγμού ογκογένεσης (Bartkova *et al.*, 2006). Παρόλο που η γήρανση επηρεάζει μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, τα *in vitro* μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του φαινομένου της OIS βασίζονται κυρίως στους ινοβλάστες. Δεδομένου ότι οι περισσότερες συχνές κακοήθειες είναι επιθηλιακής προέλευσης, η έλλειψη μη κακοηθών επιθηλιακών μοντέλων αποτελεί σημαντική έλλειψη στο πεδίο. Οι βασικοί λόγοι είναι η δυσκολία διατήρησης του εξειδικευμένου επιθηλιακού συστήματος κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (Geraghty *et al.*, 2014) και η ανεπιτυχής αθανатоποίηση με έκτοπη έκφραση ανεστραμμένης ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT) σε επιθηλιακά κύτταρα σε αντίθεση με τους ινοβλάστες (Dickson *et al.*, 2000).

1.3 Χαρακτηριστικά της γήρανσης

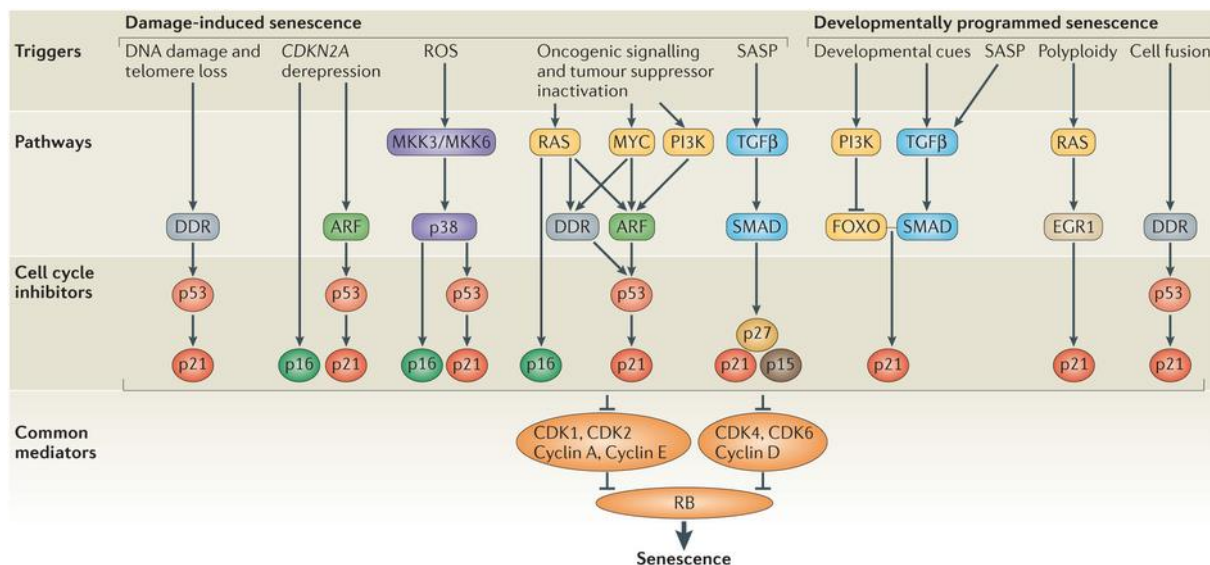
1.3.1 Κυτταρικός κύκλος

Κοινό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων αποτελεί μία ουσιαστικά αμετάκλητη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η οποία μπορεί να είναι αντίδραση που προκλήθηκε από επιβλαβή ερεθίσματα ή ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Αυτή η διακοπή του κυτταρικού κύκλου διαφέρει από την κατάσταση ηρεμίας/ αδράνειας και την τελική διαφοροποίηση (He and Sharpless, 2017). Η κατάσταση ηρεμίας/αδράνειας είναι ένα προσωρινό στάδιο στο οποίο ο πολλαπλασιασμός μπορεί να επανέλθει μέσω του κατάλληλου ερεθίσματος. Η τελική διαφοροποίηση αποτελεί την απόκτηση συγκεκριμένων κυτταρικών λειτουργιών, που συνοδεύονται από διαρκή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στην οποία συμμετέχουν μονοπάτια διαφορετικά από αυτά που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Αντίθετα τα γηρασμένα κύτταρα αποκτούν ένα νέο φαινότυπο. Παρόλο που η διακοπή του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της γήρανσης είναι γενικά αμετάκλητη, μπορεί το κύτταρο να εισέλθει ξανά στον κυτταρικό κύκλο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ιδιαίτερα στα καρκινικά κύτταρα (Galanos *et al.*, 2016; Saleh *et al.*, 2019).

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος

(RB) και η πρωτεΐνη p53 είναι σημαντικές για την εγκαθίδρυση της διακοπής του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Rodier and Campisi, 2011). Η πρωτεΐνη RB1 και οι πρωτεΐνες της οικογένειας p107 (RBL1) και p130 (RBL2) είναι φωσφορυλιωμένες από συγκεκριμένες κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs, CDK4, CDK6, CDK2). Η φωσφορυλίωση μειώνει την ικανότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας RB να καταστέλλουν τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος είναι απαραίτητος για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Sharpless and Sherr, 2015). Στα γηρασμένα κύτταρα, όμως, αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης p21^{WAF1/Cip1}, η οποία αποτελεί αναστολέα της CDK2, καθώς και της πρωτεΐνης p16^{INK4A} - αναστολέα των κινάσων CDK4/6. Αυτή η συσσώρευση είναι αποτέλεσμα της επίμονης ενεργοποίησης των πρωτεϊνών της οικογένειας RB ή της πρωτεΐνης p53 (Beauséjour *et al.*, 2003). Η διατήρηση αυτής της ενεργοποίησης ενισχύεται από το σχηματισμό ετεροχρωματίνης στα γονίδια-στόχους του μεταγραφικού παράγοντα E2F (Salama *et al.*, 2014), την επίδραση των κυτταροκινών που εκκρίνονται από τα γηρασμένα κύτταρα (Rodier and Campisi, 2011) και συχνά από τη διαρκή παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS) (Takahashi *et al.*, 2006).

Παρόλο που στα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζονται οι συγκεκριμένες αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο, δεν έχει ακόμα αναγνωριστεί ειδικός δείκτης που σχετίζεται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια του φαινομένου της γήρανσης. Για παράδειγμα η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RB και p53 μπορεί να συμβεί και σε άλλους τύπους διακοπής του κυτταρικού κύκλου (Rodier and Campisi, 2011). Έχει βρεθεί, επίσης, πως ακόμα και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p16^{INK4A}, η οποία θεωρείται ότι ενεργοποιείται ειδικά στο στάδιο της γήρανσης, μπορεί να εκφραστεί σε συγκεκριμένα κύτταρα που δεν είναι γηρασμένα (Sharpless and Sherr, 2015), καθώς και να μην ενεργοποιείται σε όλα τα γηρασμένα κύτταρα (Hernandez-Segura *et al.*, 2017). Επομένως η εύρεση της διακοπής του κυτταρικού κύκλου που σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση απαιτεί ποσοτικοποίηση πολλαπλών παραγόντων και χαρακτηριστικών (Εικόνα 1.1).



Πηγή: Munoz-Espin and Serrano, 2014, *Nature*

Εικόνα 1.1: Μοριακά μονοπάτια της γήρανσης. Πολλαπλοί στρεσογόνοι και βλάβης παράγοντες πυροδοτούν την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης RB. Οι παράγοντες βλάβης του DNA και η απώλεια των τελομερών ενεργοποιούν το μηχανισμό/δίκτυο μονοπατιών DDR, το οποίο ενεργοποιεί απευθείας την πρωτεΐνη p53 και τον μεταγραφικό της καθοδικά στόχο p21^{WAF/Cip1}. Πολλά είδη γήρανσης σχετίζονται με την επιγενετική αποκαταστολή της περιοχής του γονιδίου *CDKN2A*. Οι ελεύθερες ρίζες ROS ενεργοποιούν τις p16^{INK4a} και p53, μέσω των MAP κινασών MKK3 και MKK6, καθώς και της πρωτεΐνης p38. Σηματοδότηση από ογκογονίδιο ή απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες p16^{INK4a} και p53, σε συνεργασία με το δίκτυο DDR και την ARF. Ο παράγοντας TGF-β αποτελεί σημαντικό συστατικό του SASP και ρυθμίζει ανοδικά τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF/Cip1}, p27^{Kip1} και p15^{INK4b} μέσω του συμπλέγματος SMAD. Κατά την ανάπτυξη η γήρανση προκύπτει μέσω του p21^{WAF/Cip1}, από την επαγωγή των PI3K και TGF-β μονοπατιών. Η πολυπλοειδία και η κυτταρική σύντηξη ρυθμίζουν, επίσης, ανοδικά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p21^{WAF/Cip1} μέσω του DDR και του p53, και μέσω της επαγόμενης από το RAS ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα EGR1 (Muñoz-Espin and Serrano, 2014).

1.3.2 Φαινότυπος έκκρισης-σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP)

Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν πληθώρα παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνες και χημειοκίνες, ρυθμιστές της ανάπτυξης, παράγοντες αγγειογένεσης και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Για όλους

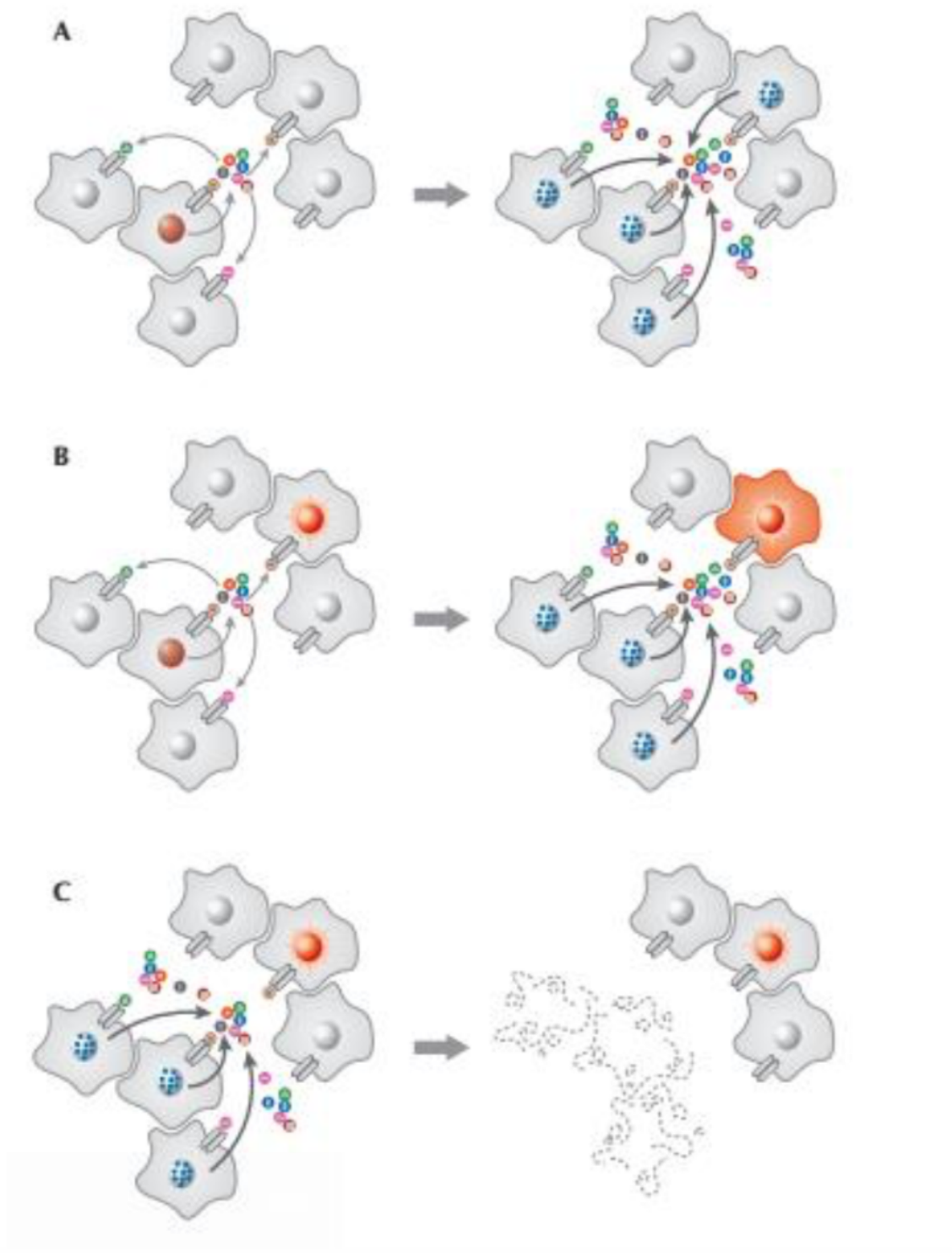
μαζί τους παράγοντες συνολικά χρησιμοποιείται ο όρος Φαινότυπος έκκρισης-σχετιζόμενος με τη γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype- SASP) ή αλλιώς σύνολο εκκριτικών μηνυμάτων στη γήρανση (Senescence messaging secretome-SMS) (Coppé *et al.*, 2010).

Το SASP αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των γηρασμένων κυττάρων και ρυθμίζει πολλές από τις παθο-φυσιολογικές επιδράσεις τους. Αποτελεί κατά κύριο λόγο μια ιδιότητα κυττάρων που γηράσκουν λόγω, ή συνοδεύονται από, γονιδιωματική βλάβη ή επιγενετική διαταραχή. Έτσι, τα φυσιολογικά κύτταρα που οδηγούνται σε γήρανση λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p21 ή της p16^{INK4a} δεν εκφράζουν τον εκκριτικό SASP, παρά το γεγονός ότι εμφανίζουν άλλα χαρακτηριστικά της γήρανσης (Coppé *et al.*, 2011). Αντίθετα, τα κύτταρα που γηράσκουν λόγω βλάβης στο DNA, δυσλειτουργικών τελομερών, επιγενωμικής διαταραχής, μιτοχόνδρων σημάτων, οξειδωτικού στρες και άλλων ερεθισμάτων που προκαλούν γήρανση αναπτύσσουν ένα εκκριτικό φαινότυπο SASP με διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς την ποιότητα και την αντοχή (Kang *et al.*, 2003; Bavik *et al.*, 2006; Hampel *et al.*, 2006; Acosta *et al.*, 2008; Wajapeyee *et al.*, 2008; Coppé *et al.*, 2008, 2010; Kuilman and Peeper, 2009; Rodier *et al.*, 2009; Novakova *et al.*, 2010; Pazolli *et al.*, 2012).

Η λειτουργία του SASP μπορεί να γίνει με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο (Coppé *et al.*, 2010) και να ενεργοποιήσει την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού για την εξάλειψη των γηρασμένων κυττάρων (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Οι παράγοντες του SASP συμμετέχουν στην γήρανση κατά την ανάπτυξη (Storer *et al.*, 2013), στην επούλωση πληγής (Demaria *et al.*, 2014), στην πλαστικότητα του ιστού (Mosteiro *et al.*, 2016), όπως επίσης και στην χρόνια φλεγμονή (Franceschi and Campisi, 2014). Το SASP μπορεί να στρατολογήσει ανοσοκατασταλτικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία δεν έχουν ωριμάσει, σε καρκίνο προστάτη και ήπατος και να διεγείρει την καρκινογένεση οδηγούμενη από την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Coppé *et al.*, 2010). Επομένως, μέσω του SASP μπορεί να εξηγηθούν οι επιβλαβείς, προγηραντικές επιδράσεις των γηρασμένων κυττάρων.

Ενώ η διακοπή του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και p16^{INK4A}/Rb, το SASP ελέγχεται από την αναδιαμόρφωση και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι NF-κB, C/EBPb, GATA4 (Ito, Hoare and Narita, 2017), καθώς και των μονοπατιών mTOR και

p38MAPK (Kuilman and Peeper, 2009; Ito, Hoare and Narita, 2017). Συνοψίζοντας, ο προσδιορισμός των εκκριτικών παραγόντων της γήρανσης σε κάθε βιολογικό δείγμα μπορεί να συμβάλει στην αναγνώριση μοριακών χαρακτηριστικών που βασίζονται στο φαινόμενο της γήρανσης (Εικόνα 1.2).



Πηγή: Young and Narita , 2009, *EMBO Rep.*

Εικόνα 1.2: Ο ρόλος του SASP στη γήρανση. Το SASP αποτελεί τμήμα του μηχανισμού της γήρανσης στην αντιμετώπιση του μη φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά η έκκριση αυτών των παραγόντων στο εξωκυττάριο περιβάλλον μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις. Στη συγκεκριμένη εικόνα περιγράφονται γεγονότα μεταξύ κυττάρων. **A.** Το στρες που μπορεί να προκληθεί από ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου (πυρήνας με καφέ χρώμα) εντός ενός κυττάρου πυροδοτεί το SASP, το οποίο μπορεί να επάγει γήρανση (κουκίδες με μπλε χρώμα) με αυτοκρινή ή/και παρακρινή τρόπο. Αυτά τα σήματα προκαλούν επιπλέον έκκριση, και επομένως την ενίσχυση του φαινότυπου. **B.** Ένα γειτονικό κύτταρο έχει προδιάθεση για πολλαπλασιασμό (κύτταρο με πορτοκαλί χρώμα πυρήνα). Οι εκκρινόμενοι παράγοντες από το γηρασμένο κύτταρο προκαλούν το φαινόμενο γήρανση σε πολλά από τα κύτταρα που το περιβάλλουν, αλλά το συγκεκριμένο το οδηγούν στο μετασχηματισμό. **C.** Το SASP μπορεί, επίσης, να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα, με στόχο την εξάλειψη των γηρασμένων κυττάρων (Young and Narita, 2009).

1.3.3 Βλάβες σε μακρομόρια

1.3.3.1 Βλάβες στο DNA

Το πρώτο μοριακό χαρακτηριστικό που σχετίζεται με το φαινόμενο της γήρανσης είναι η μείωση του μήκους των τελομερών, λόγω προβλημάτων στην ολοκλήρωση της αντιγραφής, ύστερα από πολλές κυτταρικές διαιρέσεις. Τα τελομερή αποτελούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, οι οποίες βρίσκονται σε τερματικούς βρόχους στα άκρα των χρωμοσωμάτων και σταθεροποιούνται από το σύμπλεγμα Shelterin. Το σύμπλεγμα αυτό καθιστά τα τελομερή μη αναγνωρίσιμα από τα επιδιορθωτικά μονοπάτια DDR και DSB. Η τελομεράση, το ένζυμο που διατηρεί το μήκος των τελομερών, δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα (τα οποία δεν αποτελούν βλαστικά κύτταρα), αλλά η έκφραση της αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα που έχουν ξεφύγει από τη γήρανση. Η ανασύσταση της δράσης της τελομεράσης, επίσης, σε φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην επιμήκυνση των τελομερών, επεκτείνοντας τον χρόνο αντιγραφής τους (Shay and Wright, 2019). Αν και οι μισές από τις εστίες βλάβης του DNA στον πυρήνα των γηρασμένων κυττάρων εντοπίζονται σε τελομερή, υπάρχουν κι άλλα στρεσογόνα ερεθίσματα που μπορούν να οδηγήσουν στη γήρανση, προκαλώντας ανεπανόρθωτη βλάβη στο DNA.

Πολυάριθμοι γενοτοξικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων ακτινοβολίας (υπεριώδης και ιονισμού), φαρμακευτικών παραγόντων (π.χ. ορισμένων χημειοθεραπευτικών) και οξειδωτικού στρες προκαλούν γήρανση. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν γήρανση, περιορίζοντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό δυνητικά καρκινικών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό συχνά ρυθμίζεται από τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p16^{INK4A} και ARF, οι οποίες κωδικοποιούνται από τον γονιδιακό τόπο *CDKN2A*, επιβάλλοντας διακοπή κυτταρικού κύκλου (Serrano *et al.*, 1997; Kuilman *et al.*, 2010). Όμως, σημαντικό ρόλο στη γήρανση που προκαλείται από ογκογόνα ερεθίσματα, παίζει, επίσης, η απόκριση που ενεργοποιείται στις βλάβες του DNA (Gorgoulis and Halazonetis, 2010; Gorgoulis *et al.*, 2019). Στην περίπτωση αυτή το σήμα της βλάβης προέρχεται από θηλιές αντιγραφής που έχουν καταρρεύσει, ως αποτέλεσμα του υπερπολλαπλασιασμού που προκαλείται από τα ογκογονίδια. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα μονοπάτια απόκρισης στη βλάβη του DNA και το σηματοδοτικό μονοπάτι ARF μπορούν να δράσουν μαζί, με το πρώτο να απαιτεί μικρότερο ογκογόνο ερέθισμα για να ενεργοποιηθεί σε σχέση με το δεύτερο (Gorgoulis *et al.*, 2018) (Εικόνα 1.3).

1.3.3.2 Βλάβες σε πρωτεΐνες

Η τοξικότητα των πρωτεϊνών αποτελεί χαρακτηριστικό της κυτταρικής γήρανσης και του γήρατος (Kaushik and Cuervo, 2015). Επομένως οι κατεστραμμένες πρωτεΐνες μπορούν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση των γηρασμένων κυττάρων. Μια σημαντική πηγή πρωτεϊνικής βλάβης είναι ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών (ROS), όπου πραγματοποιείται οξείδωση των αμινοξέων μεθειονίνη και κυστεΐνη, μεταβάλλοντας την αναδίπλωση στον χώρο και τη λειτουργία των πρωτεϊνών (Höhn *et al.*, 2017). Πολλές φωσφατάσες τυροσίνης (PTP) περιέχουν αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης στις δραστικές τους θέσεις, οι οποίες μπορούν να αδρανοποιηθούν με οξείδωση. Αυτή η απενεργοποίηση μπορεί να προκαλέσει γήρανση με υπερενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης των πρωτεϊνών ERK/MAPK, παρόμοια με την επίδραση των ενεργοποιημένων ογκογονιδίων (Deschênes-Simard *et al.*, 2013). Οι ελεύθερες ρίζες ROS, παρουσία μετάλλων, μπορεί να καρβονυλιώνουν τα αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης, θρεονίνης, λυσίνης και αργινίνης.

Η καρβονυλίωση της πρωτεΐνης εκθέτει υδρόφοβες επιφάνειες, ξεδιπλώνοντάς την πρωτεΐνη (Nyström, 2005). Το καρβονύλιο μπορεί να αντιδράσει με τις αμινομάδες, συμβάλλοντας στη συσσωμάτωση πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συσσώρευση των ζημιών συνεχίζεται, ακόμη και όταν διακόπτεται η κυτταρική διαίρεση, και μπορεί να συνεχιστεί για μήνες ή και χρόνια (Εικόνα 1.3).

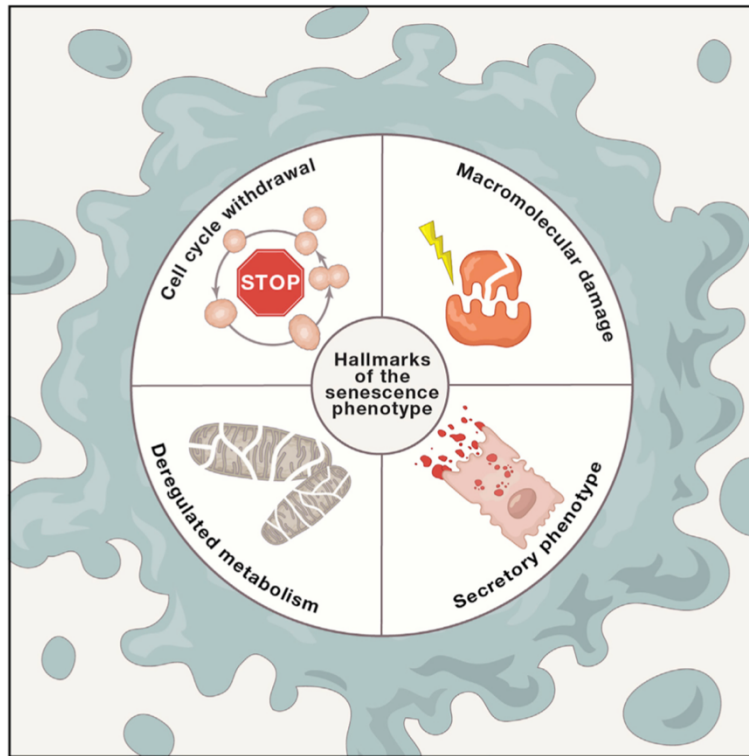
1.3.3.3 Βλάβες σε λιπίδια

Τα λιπίδια είναι απαραίτητα για την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, την παραγωγή ενέργειας και τη μεταγωγή σήματος. Ορισμένες ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία χαρακτηρίζονται από αλλοιωμένο μεταβολισμό λιπιδίων, με αποτέλεσμα αλλαγές στο προφίλ των λιπιδίων. Παρόλο που τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο στον μεταβολισμό των λιπιδίων, δεν είναι σαφές πως το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει στον φαινότυπο της γήρανσης. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία κατά τη διάρκεια της γήρανσης μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή λιπιδίων από τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, σε εναπόθεση λιπιδίων (Ogrodnik *et al.*, 2017) και στη συσσώρευση λιποφουσκίνης (Gorgoulis *et al.*, 2018). Η επακόλουθη σύνδεση με τα σάκχαρα και τα λιπίδια σχηματίζει αδιάλυτα συσσωματώματα, που ονομάζεται λιποφουσκίνη, από το ελληνικό "lipos" που σημαίνει λίπος και "fuscus" που σημαίνει σκοτάδι. Η λιποφουσκίνη μπορεί να παρατηρηθεί σε λυσοσώματα με οπτικό μικροσκόπιο ή με ιστοχημική μέθοδο χρησιμοποιώντας ένα βιοτινυλιωμένο ανάλογο της χημικής ένωσης SBB (GL13) (Evangelou *et al.*, 2017; Gorgoulis *et al.*, 2018; Myrianthopoulos *et al.*, 2019). Συγκεκριμένα η συσσώρευση λιποφουσκίνης στα γηρασμένα κύτταρα μπορεί να οπτικοποιηθεί με διάφορες χρώσεις και μεθόδους ή χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που σχετίζονται με λιπίδια, όπως η πρωτεΐνη perilipin 2 (Ogrodnik *et al.*, 2017). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι γονιδιακή ή φαρμακολογική αφαίρεση των γηρασμένων κυττάρων σε ηλικιωμένα και παχύσαρκα ποντίκια μείωσε τα επίπεδα των εναποθέσεων λιπιδίων στο ήπαρ (Ogrodnik *et al.*, 2017) και στον εγκέφαλο (Ogrodnik, Salmonowicz and Gladyshev, 2019). Παρά τη συσχέτιση με τη συσσώρευση λιπιδίων, οι γνώσεις μας σχετικά με τη συγκεκριμένη σύνθεση λιπιδικού μεταβολίτη στα γηρασμένα κύτταρα είναι περιορισμένη (Εικόνα 1.3).

1.3.4 Διαταραχές στη δομή της χρωματίνης

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να συμβούν κατά τη διάρκεια της γήρανσης αλλά εξαρτώνται κυρίως από το περιβάλλον (Rando and Chang, 2012; Sidler, Kovalchuk and Kovalchuk, 2017). Για παράδειγμα, η αναδιπλασιαστική γήρανση έχει συσχετιστεί με απώλεια της μεθυλίωσης του DNA σε νησίδες CpG. Επιπλέον η κυτταρική γήρανση συνεπάγεται εστιακές αυξήσεις στη μεθυλίωση του DNA σε ορισμένες νησίδες CpG, όπως μπορεί να συμβεί τον καρκίνο ή το γήρας (Cruickshanks *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2018).

Η γήρανση σχετίζεται, επίσης, με μορφολογικές αλλαγές της χρωματίνης. Οι συσχετιζόμενες με γήρανση εστίες ετεροχρωματίνης (SAHFs) αποτελούνται, κυρίως, από πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1 (HP1). Οι εστίες SAHFs προέρχονται από παράγοντες χρωματίνης - συμπεριλαμβανομένων της πρωτεΐνης RB, της ιστόνης H2A, των HIRA / UBN1 / CABIN1 και ASF1a, και αυξημένη πυκνότητα πυρηνικών πόρων (Salama *et al.*, 2014; Boumendil *et al.*, 2019). Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι εστίες ετεροχρωματίνης συμβάλλουν στη γονιδιακή ρύθμιση. Αποδείχθηκε, ωστόσο, ότι αποτελούσαν, σε μεγάλο βαθμό, περιοχές με καθυστερημένη αντιγραφή γονιδίων, ακόμη και σε κύτταρα με πολλαπλασιαστικό δυναμικό, γεγονός που υποδηλώνει μικρό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση που σχετίζεται με τη γήρανση (Salama *et al.*, 2014) (Εικόνα 1.3).



Πηγή: Gorgoulis *et al.*, 2019, *Cell*

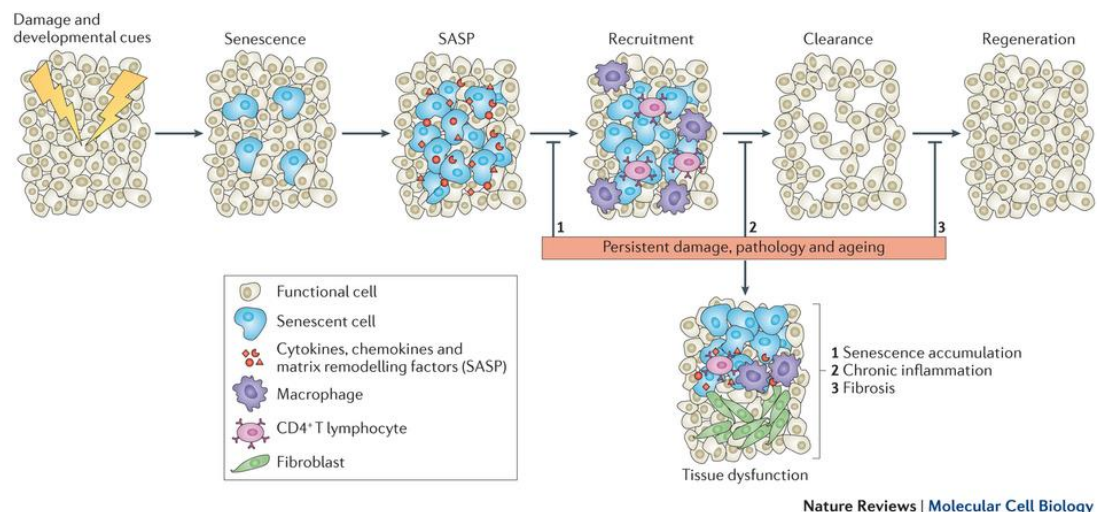
Εικόνα 1.3 Τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης. Τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να εμφανίσουν τέσσερις αλληλοεξαρτώμενα χαρακτηριστικά. Οι δείκτες αυτοί είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η βλάβη μακρομορίων, ο εκκριτικός φαινότυπος και ο απορρυθμισμένος μεταβολισμός (Gorgoulis *et al.*, 2019).

1.4 Το μοντέλο της γήρανσης

Με βάση τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από μελέτες, φαίνεται πως η γήρανση αποτελεί συστατικό κλειδί στην αναδιαμόρφωση του ιστού, τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης όσο και σε πολλαπλές παθολογικές καταστάσεις. Γενικά, η κυτταρική γήρανση συντονίζεται με την αναδιαμόρφωση του ιστού μέσω τριών διαδικασιών. Πρώτα συμβαίνει σταθερή διακοπή του πολλαπλασιασμού και στη συνέχεια ένας φαινότυπος έκκρισης (SASP) προσελκύει κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Έπειτα πραγματοποιείται η κινητοποίηση των γειτονικών προγονικών κυττάρων που αναδομούν τον ιστό (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Στην περίπτωση των καλοήθων όγκων, κύτταρα που δέχονται ογκογόνο stress μετατρέπονται σε γηρασμένα και μπορούν, επίσης, να πυροδοτήσουν την εκκαθάριση του ιστού. Εξαιρέση αποτελούν οι καλοήθειες μελανοκυτταρικές βλάβες, οι οποίες

περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *BRAF* και υπόκεινται σε γήρανση (Michaloglou *et al.*, 2005)

Μετά από επίμονη βλάβη ή στην περίπτωση των γηρασμένων ιστών, όμως, η εκκαθάριση και η αναγέννηση του ιστού μπορούν να τεθούν σε κίνδυνο λόγω μειωμένης στρατολόγησης μακροφάγων ή ατελή αναγεννητική απόκριση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται και δημιουργούν μία σταθερή γηρασμένη βλάβη που μπορεί να επιδεινώσει την παθολογική κατάσταση. Η ισορροπία, επομένως, μεταξύ των ευεργετικών και των επιβλαβών επιδράσεων της γήρανσης εξαρτάται αν τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζονται παροδικά ή συσσωρεύονται στην πάροδο του χρόνου (Muñoz-Espín and Serrano, 2014) (Εικόνα 1.4).



Πηγή: Muñoz-Espín and Serrano, 2014, *Nature*

Εικόνα 1.4: Μοντέλο της γήρανσης. Η γήρανση ξεκινάει με την αναδιαμόρφωση του ιστού μέσω προσέλκυσης των μακροφάγων μέσω SASP. Τα μακροφάγα εξαλείφουν τα γηρασμένα κύτταρα, και τα προγονικά κύτταρα αναγεννούν τον κατεστραμένο ιστό. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων μπορεί να απομειωθεί μετά από επίμονη βλάβη, παθολογικές καταστάσεις ή γήρανση. Τα γηρασμένα κύτταρα δεν εξαλείφονται αποτελεσματικά και ο ιστός δεν αναγεννάται πλήρως. Η ανάλυση της βλάβης περιλαμβάνει σημάδι ίνωσης με γηρασμένα κύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα και ινώδη ιστό (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

1.5 Το φαινόμενο της γήρανσης σε φυσιολογικές καταστάσεις

Ο ρόλος της γήρανσης έχει, κυρίως, περιγραφεί σε συνθήκες κυτταρικής βλάβης ή στρες. Έχει βρεθεί, όμως, ότι το φαινόμενο αυτό μπορεί να συμβεί σε μεγάλο αριθμό εμβρυϊκών δομών και σε ορισμένα εξειδικευμένα κύτταρα ενηλίκων. Το εύρημα ότι η γήρανση προκύπτει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έχει στηριχθεί κυρίως σε μελέτες πάνω σε έμβρυα ποντικού (Storer *et al.*, 2013). Το φαινόμενο, όμως, έχει παρατηρηθεί, επίσης, σε έμβρυα που προέρχονται από άνθρωπο (Muñoz-Espín *et al.*, 2013), όρνιθα (Storer *et al.*, 2013) και ορτύκι (Nacher *et al.*, 2006), ενδεικνύοντας ότι αποτελεί συντηρημένο πρότυπο στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών. Παραδείγματα περιοχών που είναι θετικές για γήρανση αποτελούν τα μεσонеφρικά σωληνάρια κατά τον σχηματισμό του μεσόνεφρου, ο ενδολεμφικός σάκος, η εξωδερμική κορυφογραμμή των άκρων (Apical ectodermal ridge - AER) και τον σχηματισμό του νευρικού σωλήνα (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013).

Πιο διεξοδικά έχουν μελετηθεί οι αναπτυξιακές δομές των μεσонеφρικών σωληναρίων, του ενδολεμφικού σάκου και του AER. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η γενετική ανάλυση της γήρανσης σε αυτές τις δομές αποκάλυψε το βασικό ρόλο του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF/Cip1} σε έμβρυα με έλλειψη του γονιδίου *Cdkn1a*, ενώ σε έμβρυα με έλλειψη άλλων γονιδίων (*Cdkn2a* και *Trp53*) δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα. Το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων της μεσонеφρικής δομής και του AER, όσον αφορά την γήρανση, έδειξε αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τα μονοπάτια ανάπτυξης, ειδικότερα για τα TGFβ, WNT, Hedgehog μονοπάτια, καθώς και για τον φαινότυπο έκκρισης-παρόμοιο του SASP, ο οποίος περιλαμβάνει τους παράγοντες FGF4 και FGF8 (Munoz-Espin, D. *et al.*, 2013., Storer *et al.*, 2013). Μηχανιστικές και γενετικές αναλύσεις της μεσонеφρικής δομής και του ενδολεμφικού σάκου αποκάλυψαν ότι η ρύθμιση ανοδικά του p21^{WAF/Cip1} και η γήρανση ελέγχονται από τα μονοπάτια TGFβ-SMAD και PI3K-FOXO (Munoz-Espin, D. *et al.*, 2013). Αξιοσημείωτο είναι, πως τα ίδια μονοπάτια συμμετέχουν στην επαγόμενη από βλάβη γήρανση στα ενήλικα σωματικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, η έκκριση αυξητικών παραγόντων, όπως οι FGF4 και FGF8, ενεργοποιούν το ERK μονοπάτι στα μεσεγχυματικά κύτταρα που βρίσκονται πλησίον του AER και, με τη

σειρά τους, αυτά τα κύτταρα σηματοδοτούν την διατήρηση της γήρανσης στο AER (Storer *et al.*, 2013). Οι μελέτες αυτές, λοιπόν, προτείνουν πως η προγραμματισμένη κατά την ανάπτυξη γήρανση χαρακτηρίζεται από αναπτυξιακά στοιχεία τα οποία συγκλίνουν στον παράγοντα p21^{WAF/Cip1}.

Εκτός από την γήρανση κατά την ανάπτυξη, το φαινόμενο μπορεί, επίσης, να προκύψει με φυσιολογικό τρόπο σε ενήλικους οργανισμούς. Δύο σημαντικές κατηγορίες κυττάρων είναι τα μεγακαρυοκύτταρα (Besancenot *et al.*, 2010) και τα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τις χοριακές λάχνες του πλακούντα – αποτελούν τη δομή της συγκυτιοτροφοβλάστης (Churpin *et al.*, 2013). Στα μεγακαρυοκύτταρα ενεργοποιείται το φαινόμενο της γήρανσης, καθώς αποτελεί φυσιολογικό βήμα του προγράμματος ωρίμανσης. Στην περίπτωση των μεγακαρυοκυττάρων που προέρχονται από τον ποντικό και τον άνθρωπο, η γήρανση μπορεί να χαρακτηριστεί μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση (SA β-gal), της διακοπής του πολλαπλασιασμού, καθώς και την συσσώρευση της πρωτεΐνης HP1γ. Μελέτες έχουν δείξει πως η γήρανση των μεγακαρυοκυττάρων, η οποία είναι προγραμματισμένη με παρόμοιο τρόπο με το φαινόμενο που συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, εξαρτάται από την πρωτεΐνη p21^{WAF/Cip1}, αλλά όχι από τις πρωτεΐνες p16, p53 ή p27 (Beauséjour *et al.*, 2003). Σε δείγματα ανθρώπινου πλακούντα, επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένη SA β-gal δραστηριότητα στα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τις εμβρυϊκές χοριακές λάχνες του, σε συνδυασμό με τους δείκτες p16, p21^{WAF/Cip1} και p53. Το γεγονός πως και στις δύο περιπτώσεις φυσιολογικής πολυπλοειδίας προκύπτει προγραμματισμένη γήρανση φυσιολογικά, υποδεικνύει ότι η γήρανση θα μπορούσε να αποτελεί ένα γενικό αποτέλεσμα του πολυπλοειδισμού. (Churpin *et al.*, 2013).

1.6 Το φαινόμενο της γήρανσης σε παθολογικές καταστάσεις

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό της φυσιολογικής ανάπτυξης και της ομοιόστασης, αλλά μπορεί να προκύψει, επίσης, σε πολλές παθολογικές συνθήκες, όπως η κυστική ίνωση (Fischer *et al.*, 2013), η επούλωση των

πληγών (Jun and Lau, 2010), ο καρκίνος (Collado and Serrano, 2010) και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι (Kritsilis *et al.*, 2018).

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του καρκίνου έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες από διαφορετικά εργαστήρια για το ρόλο της γήρανσης στην εξέλιξη του όγκου. Το φαινόμενο της γήρανσης εντοπίζεται κυρίως σε καλοήθεις όγκους. Σε κακοήθεις όγκους, ωστόσο, τα κύτταρα υπόκεινται σε γήρανση μέσω βλαβών που συμβαίνουν σε ογκοκατασταλτικά γονίδια ή σε ογκογονίδια. Τα γηρασμένα κύτταρα του όγκου μπορούν να καταπολεμηθούν από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας στην αποτελεσματική υποχώρηση του όγκου (Xue *et al.*, 2007). Αυτό οφείλεται στην άμεση αναγνώριση των γηρασμένων κυττάρων από τα Τ-Βοηθητικά λεμφοκύτταρα (Kang *et al.*, 2011) όπως, επίσης, και των μακροφάγων κατά τη φλεγμονή (Xue *et al.*, 2007), τα οποία πιθανότατα έλκονται από τους παράγοντες SASP (Kuilman *et al.*, 2010). Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι, εκτός από τον καθορισμό εκφυλιστικής παθολογίας, τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε υπερπλαστική παθολογία. Τα πιο πειστικά στοιχεία για αυτή τη δραστηριότητα προέρχονται από μελέτες ξενομοσχεύματος.

Όσον αφορά τις νευροεκφυλιστικές νόσους η κυτταρική γήρανση μπορεί, ακόμη, να συμβάλει ουσιαστικά στην παθογένεση της νόσου και να καθορίζει την ευαισθησία, την ηλικία εμφάνισης της νόσου και το ρυθμό εξέλιξης της νόσου. Ειδικότερα, το φαινόμενο της γήρανσης προωθεί την χρόνια φλεγμονή μέσω του SASP, (Corré *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2018), το οποίο μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση του εκφυλισμού και μπορεί να καθορίσει την ευαισθησία ή την επιδείνωση της πορείας της νόσου (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007). Για παράδειγμα, η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) που αποτελεί ένα τυπικό ρυθμιστή του SASP, εμφανίζεται με αυξημένα επίπεδα σε εγκεφάλους ηλικιωμένων ατόμων και σε δείγματα ασθενών με τη νόσο Alzheimer (Bauer *et al.*, 1991; Huell *et al.*, 1995; Kiecolt-Glaser *et al.*, 2003). Έχει δειχθεί, επίσης, ότι η υπερέκφρασή της μπορεί να οδηγήσει στον νευροεκφυλισμό του εγκεφάλου *in vivo* (Campbell *et al.*, 1993).

1.7 Ανίχνευση της λιποφουσκίνης σε βιολογικά δείγματα

Η λιποφουσκίνη είναι ένα μη αποικοδομήσιμο προϊόν του μεταβολισμού που συσσωρεύεται στα κύτταρα λόγω διαταραχής της λειτουργίας του άξονα μιτοχονδρίων/ λυσοσωμάτων και του πρωτεασώματος, μετά από στρες ή κυτταρική βλάβη (Ivy *et al.*, 1990; Brunk and Terman, 2002a, 2002b; Terman, Gustafsson and Brunk, 2006). Τα κύτταρα που έχουν καταστραφεί ή έχουν υποστεί στρες παύουν να πολλαπλασιάζονται και συνεπώς δεν είναι ικανά να εξισσοροπήσουν το φορτίο των συσσωμάτων λιποφουσκίνης μέσω κυτταρικής διαίρεσης (Jung, Bader and Grune, 2007; Höhn and Grune, 2013; Höhn *et al.*, 2017; König *et al.*, 2017). Η μάζα αυτή του ετερογενούς υλικού αποτελείται από οξειδωμένες πρωτεΐνες / λιποπρωτεΐνες, οξειδωμένα λιπίδια και μέταλλα που καθίστανται ανθεκτικά στην υδρόλυση από ένζυμα του λυσοσώματος. Η λιποφουσκίνη δεν είναι ανενεργή και ακίνδυνη, αλλά διαθέτει επιβλαβείς ιδιότητες. Αρχικά, η συσσώρευση λιποφουσκίνης είναι γνωστό ότι μειώνει την πρωτεόσταση και ιδιαίτερα τη δράση του πρωτεασώματος, αναστέλλοντας έτσι την αποτελεσματική ανατροπή των τροποποιημένων / οξειδωμένων πρωτεϊνών. Διευκολύνει, επίσης, την παραγωγή ελεύθερων ριζών ROS, μέσω της μεσολάβησης των οξειδοαναγωγικών μετάλλων που περιέχει. Οι ιδιότητες αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη σύνθεση οξειδωμένων ενδοκυτταρικών μορίων, η οποία με τη σειρά της προωθεί επιπλέον τη συσσώρευση λιποφουσκίνης ως θετική ανταπόκριση (Gaspar, Mathieu and Alvarez, 2016; Höhn *et al.*, 2017; König *et al.*, 2017). Συνοψίζοντας, η ενδοκυτταρική συσσώρευση της λιποφουσκίνης δείχνει μία εξασθενημένη κυτταρική κατάσταση και απορυθμισμένη ομοιόσταση.

Η ποσοτικοποίηση της λιποφουσκίνης θεωρείται ότι έχει μεγάλη σημασία για ένα ευρύ φάσμα Βιοεπιστημών και συναφών επιστημονικών κλάδων. Τα επίπεδα της λιποφουσκίνης φαίνεται να παρέχουν ιστορικό μαζικής έκθεσης στο μεταβολικό στρες και συνεπώς σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία της γήρανσης και έχουν παθοφυσιολογική σημασία (Sheehy, 2002; Di Guardo, 2015; Gaspar, Mathieu and Alvarez, 2016; König *et al.*, 2017). Όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν τη γραμμική συσχέτιση των επιπέδων της λιποφουσκίνης με την ηλικία και τις ασθένειες

που σχετίζονται με αυτή (Gaspar, Mathieu and Alvarez, 2016; König *et al.*, 2017; Kritsilis *et al.*, 2018). Αυτό είναι, μάλλον, αναμενόμενο δεδομένου ότι ο αριθμός των γηρασμένων κυττάρων στους ιστούς και τα όργανα αυξάνεται με την ηλικία, καθώς το στρες και οι βλάβες συσσωρεύονται. Έχουν περιγραφεί ορισμένες τεχνικές για τον καθορισμό της ηλικίας σε οργανισμούς, οι οποίες στηρίζονται στην ποσοτικοποίηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης (Bluhm and Brey, 2001; Bluhm, Brey and Klages, 2001; Puckett, Secor and Ju, 2008). Ένα μεγάλο, επίσης, φάσμα διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η νόσος Alzheimer και Parkinson και η καρδιακή ανεπάρκεια έχουν συσχετιστεί με την συσσώρευση λιποφουσκίνης στους ιστούς (Sparrow, Nakanishi and Parish, 2000; Meredith *et al.*, 2002; Nozynski *et al.*, 2013; König *et al.*, 2017). Μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του Beregi, προς το τέλος του 20^{ου} αιώνα, έδειξαν αυξημένα επίπεδα λιποφουσκίνης που συμβαδίζουν με την ηλικία σε ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα και κύτταρα του αίματος (Beregi and Regius, 1983). Επιπλέον, η παρουσία κοκκίων λιποφουσκίνης έχει αναφερθεί στην μεμβράνη ερυθρών αιμοσφαιρίων ασθενών της νόσου Alzheimer (Skoumalová, Mádllová and Topinková, 2012).

Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει πειραματικά ότι η λιποφουσκίνη υπάρχει επίσης σε διαλυτή μορφή σε διάφορα σωματικά υγρά. Ειδικότερα, η ερευνητική ομάδα του Feng ισχυρίστηκε ότι οι συγκεντρώσεις λιποφουσκίνης που ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα του αίματος ανθρώπινων δειγμάτων εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από αυτά που παρατηρήθηκαν στο σάλιο (Feng *et al.*, 2015). Έχουν έρθει, επίσης, στο φως έμμεσες ενδείξεις σχετικά με την ύπαρξη λιποφουσκίνης στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος με βάση τις ιδιότητες αυτοφθορισμού (Masako *et al.*, 1985; Roumen *et al.*, 1994; Sutherland, Williams and de Jong, 2007; Skoumalová *et al.*, 2011; Kuznetsov *et al.*, 2015; Chmátalová *et al.*, 2016). Ορισμένες από αυτές τις αναφορές εστίασαν στην πιθανή συσχέτιση των επιπέδων λιποφουσκίνης στα σωματικά υγρά (κυρίως στο πλάσμα) με την ηλικία και τις διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, σε μια προσπάθεια να καθιερωθεί μια ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση και την παρακολούθηση τόσο της γήρανσης όσο και της ασθένειας (Roumen *et al.*, 1994; Madhuri *et al.*, 2003; Skoumalová *et al.*, 2011; Kuznetsov *et al.*, 2015)

Ωστόσο, έχουν προκύψει πολλές δυσκολίες οι οποίες σχετίζονται με τη μέτρηση της λιποφουσκίνης σε βιολογικά δείγματα με μεγάλη ακρίβεια. Η σύσταση της λιποφουσκίνης ποικίλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ιστών, οργάνων και ειδών, οδηγώντας έτσι σε διαφορές στην κατανομή, τη χρώση, τη διαλυτότητα και την ενζυμική δραστηριότητα (Sheehy and Roberts, 1991; Mochizuki *et al.*, 1995; Yin, 1996). Επιπρόσθετα, αυτό το πολύπλοκο μίγμα οξειδωμένων μακρομορίων παρουσιάζει ιδιότητες αυτοφθορισμού που πιθανώς σχηματίζονται από αντιδράσεις μεταξύ καρβονυλίων και αμινοξικών καταλοίπων (Höhn and Grune, 2014). Το μεγάλο εύρος τιμών στη διέγερση και την εκπομπή (μήκη κύματος που κυμαίνονται από 320 έως 480 nm και από 460 έως 630 nm αντίστοιχα) δημιουργεί σοβαρές δυσκολίες σε μεθόδους που βασίζονται στον άμεσο φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό (Brunk and Terman, 2002a; Croce and Bottiroli, 2014; Di Guardo, 2015).

Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι μια αλλαγή στην οξειδοαναγωγή της αλβουμίνης του ωοθυλακικού υγρού επηρεάζει τη βιωσιμότητα των αναρροφούμενων ανθρώπινων ωαρίων (Otsuki *et al.*, 2012). Η συσσώρευση λιποφουσκίνης με τη μορφή εγκλεισμάτων εντός των ωοκυττάρων σχετίζεται με σημαντικά μειωμένο ρυθμό γονιμοποίησης και δυσμενή ανάπτυξη της βλαστοκύστης (Otsuki, Nagai and Chiba, 2007).

1.8 Μέθοδοι ανίχνευσης της γήρανσης

1.8.1 Ενζυμική δραστηριότητα SA-β-gal

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης της κυτταρικής γήρανσης, αποτελεί η δραστηριότητα του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση που σχετίζεται με τη γήρανση σε συγκεκριμένες συνθήκες pH (Dimri *et al.*, 1995; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009). Ο Dimri και οι συνεργάτες του μελέτησαν την ιστοχημική έκφραση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση σε κύτταρα από ποντικό και άνθρωπο, τα οποία αναπτύσσονταν σε καλλιέργεια. Παρατήρησαν ότι σε συνθήκες pH 6, στα κύτταρα τα οποία ήταν γηρασμένα, λάμβανε χώρα η ενζυμική αντίδραση. Με τα αποτελέσματα

τους υποστήριζαν ότι αυτός ο δείκτης παρέχει *in situ* αποδείξεις ότι είναι αυτά τα κύτταρα μπορεί να υπάρχουν και να συσσωρεύονται με την ηλικία (Dimri *et al.*, 1995). Παρόλα αυτά, ένα σημαντικό μειονέκτημα στο σχεδιασμό μεγάλων κλινικών μελετών για το ρόλο της κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινες βλάβες είναι ότι η χρώση SA-β-gal απαιτεί νωπό ιστό, καθώς βασίζεται σε ενζυμική αντίδραση (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009). Το γεγονός αυτό περιορίζει την εκμετάλλευση των ευρέως διαθέσιμων δειγμάτων μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη (FFPE), συμπεριλαμβανομένων και των ιστών-δειγμάτων ομαδοποιημένων σε μικροσυστοιχίες (Gorgoulis and Halazonetis, 2010).

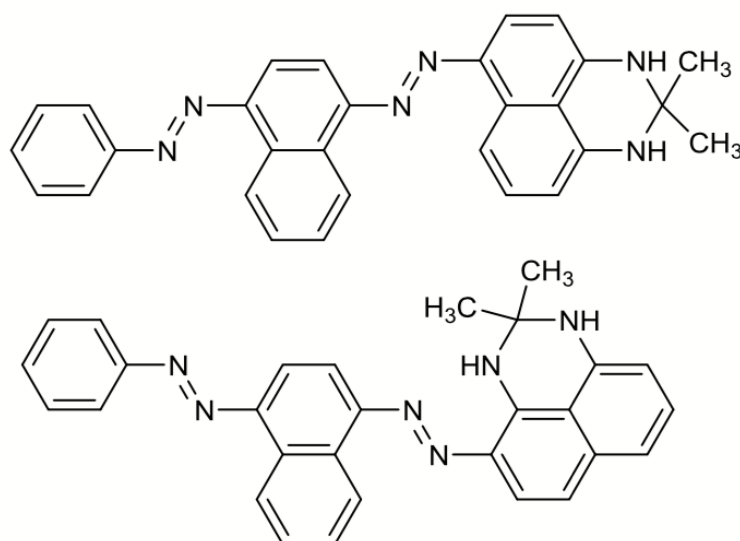
Εκτός από το γεγονός ότι η χρώση απαιτεί νώπο βιοπτικό υλικό, ακόμη και η ανάλυση της ενζυμικής δραστηριότητας του SA-β-gal παράγει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, κάτω από ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας όπως έλλειψη ορού και θρεπτικών υλικών (Severino *et al.*, 2000; Yang and Hu, 2005). Επιπλέον, ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορούν να δοθούν εάν τα κύτταρα ή οι ιστοί επωάζονται στο διάλυμα με τον σάκχαρο X-gal (το οποίο αποτελεί υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης) για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Σε αυτή την περίπτωση όλα τα κύτταρα τελικά θα αποκτήσουν τη χαρακτηριστική τirkουάζ χρώση, λόγω της κανονικής ενζυματικής δραστηριότητας και δεν θα μπορεί να αξιολογηθεί το θετικό σήμα στα γηρασμένα κύτταρα (Lee *et al.*, 2006; Georgakopoulou *et al.*, 2013). Αντίθετα, στα κύτταρα που δεν εκφράζουν το γονίδιο της γαλακτοσιδάσης, δεν υπάρχει η δράση του ενζύμου, αλλά τα κύτταρα εκτελούν πλήρως το πρόγραμμα της γήρανσης, δίνοντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Lee *et al.*, 2006). Συνεπώς για την εκτέλεση της τεχνικής απαιτείται πάντοτε ένα δείγμα ελέγχου και η παρατήρηση του δείγματος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Οι διαφορετικοί ιστοί και οι κυτταρικές σειρές απαιτούν διαφορετικούς χρόνους επώασης και ο επιθυμητός χρωματισμός επιλέγεται υποκειμενικά από τον παρατηρητή, η πυκνότητα και η ένταση του χαρακτηριστικού χρώματος που θεωρούνται θετικά ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων μελετών.

1.8.2 Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο Sudan black B

Το Sudan Black B (SBB) είναι μία λιπόφιλη χημική ένωση, η οποία αναγνωρίζει τη λιποφουσκίνη. Διαλύεται σε αιθανόλη και μπορεί να εφαρμοστεί με ιστοχημική χρώση και να χρησιμοποιηθεί σε *in vitro* και *in situ* μελέτες (Gatenby and Moussa, 1949; Rasmussen, 1961; Jung, Höhn and Grune, 2010). Λόγω της λιπόφιλης φύσης της ένωσης αυτής, όταν έρχεται σε επαφή με λιπίδια, συνδέεται πάνω στην λιπιδική επιφάνεια, καθώς είναι περισσότερο διαλυτό στα λιπίδια παρά σε αιθανόλη. Συνεπώς, το SBB δίνει στο λιπιδικό συστατικό της λιποφουσκίνης χαρακτηριστικό σκούρο μπλε χρώμα (Romijn *et al.*, 1999). Στηριζόμενοι στην ιδιότητα του αντιδραστήριου να συνδέεται ειδικά με τη λιποφουσκίνη, καλύπτοντας τον αυτοφθορισμό της, θεωρείται ότι αποτελεί μία από τις πιο αξιόπιστες ιστοχημικές χρώσεις (Romijn *et al.*, 1999; Viegas *et al.*, 2007; Jung, Höhn and Grune, 2010; Kumar and Kiernan, 2010). Η χημική ένωση SBB, άλλωστε, είναι κατάλληλη για χρήση τόσο σε παγωμένο ιστό, όσο και σε υλικό που έχει μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και εγκλειστεί σε παραφίνη (FFPE) (Kumar and Kiernan, 2010). Έχει, επίσης, επαληθευθεί ότι η χρώση SBB για τη λιποφουσκίνη μπορεί να απεικονίσει τα γηρασμένα κύτταρα σε τμήματα FFPE από προκαρκινικές αλλοιώσεις, στις οποίες έχει ήδη δειχθεί η παρουσία του φαινομένου της γήρανσης (Castro *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005; Georgakopoulou *et al.*, 2013). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά υποστηρίζουν την υποψηφιότητα του SBB για ένα ιδιαίτερα επιθυμητό εργαλείο για τη μελέτη του φαινομένου της γήρανσης σε αρχειακό βιοπτικό υλικό.

Αντίστοιχα με τη μέθοδο του SA-β-gal, η χρώση SBB εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά, η απεικόνιση SBB-θετικών κοκκίων λιποφουσκίνης εμφανίζονται ως κυτταροπλασματικοί κόκκοι κυανού-μαύρου ή καφέ χρώματος και έχουν μεταβλητό μέγεθος. Η αξιολόγηση, λοιπόν, του θετικού σήματος δεν είναι πάντα εύκολη και απαιτεί υψηλές μεγεθύνσεις στο οπτικό μικροσκόπιο. Ειδικά, σε δείγματα ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και εγκλειστεί σε παραφίνη, τα κοκκία μπορεί να είναι πολύ μικρά σε μέγεθος, λόγω μερικής λιπιδικής διαγραμμίσεως της λιποφουσκίνης κατά την παρασκευή του δείγματος, καθιστώντας τα έτσι δύσκολο να ανιχνευθούν. Εάν η αναλογία των γηρασμένων κυττάρων, επίσης, εντός ενός ιστού είναι χαμηλή και αυτά τα κύτταρα είναι διασκορπισμένα στο δείγμα, η ταυτοποίησή

τους μπορεί να είναι δύσκολη. Δεύτερον, η χρώση SBB απαιτεί μεγαλύτερη εμπειρία εξοικίωσης με την ανίχνευση των γηρασμένων κυττάρων. Εξίσου σημαντική είναι η απόκτηση εμπειρίας με τη διάκριση των πραγματικά SBB-θετικών κοκκίων λιποφουσκίνης στα γηρασμένα κύτταρα από «βρωμιά περιβάλλοντος», αντανακλώντας μη ειδική περίσσεια και καθίζηση της χρώσης που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ανάλυση (Evangelou *et al.*, 2017). Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί πως έχει ανιχνευθεί στη χρωστική SBB, μεγάλος αριθμός προσμίξεων, που αποτελούνται από χρωματιστά και άχρωμα υποπροϊόντα προϊόντα. Η παρουσία των προσμίξεων στα εμπορικά παρασκευάσματα SBB δεν επηρεάζει μόνο την απόδοση της χρώσης, που οφείλονται στη διακύμανση της διαλυτότητας και λιποφιλικότητα καθενός από τα συστατικά, αλλά και την ικανότητα να συζευχθούν με άλλα υποστρώματα (Pfüller, Franz and Preiß, 1977; Evangelou *et al.*, 2017) (Εικόνα 1.5).



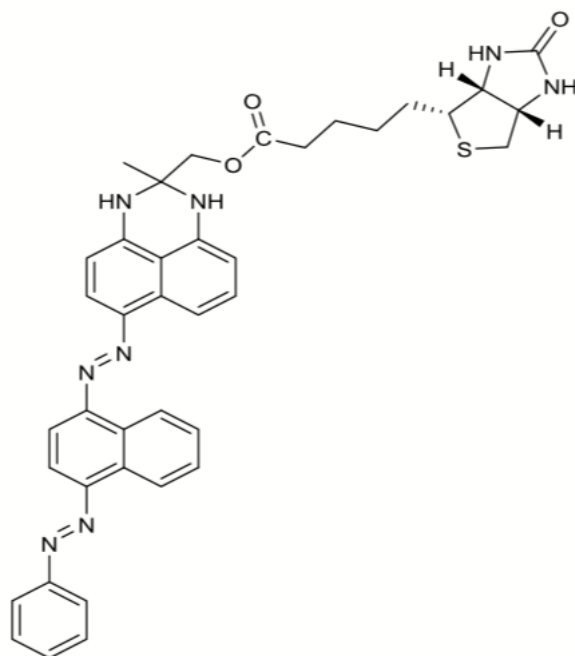
Εικόνα 1.5: Χημική δομή του αντιδραστηρίου Sudan Black B. Η δομή του Sudan Black B είναι (2,2-dimethyl-1,3-dihydroperimidin-6-yl)-(4-phenylazo-1-naphthyl) diazene.

1.8.3 Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13

Το αντιδραστήριο GL13 αποτελεί χημικό ανάλογο του αντιδραστηρίου SBB και είναι συζευγμένο με μόριο βιοτίνης. Η παρασκευή των χρώσεων βασίζεται στην ένωση (E)-4-(phenyldiazenyl)naphthalen-1-amine, ως υλικό έναρξης, η οποία πρώτα διαζωτώνεται και στη συνέχεια το diazonium salt συζεύγνυται με 2,2-dimethyl-2,3-dihydro-1H-perimidine. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε ένα πολύπλοκο μίγμα χημικών ενώσεων και το κύριο παράγωγο όλων των ενώσεων αποτελεί 2,2-dimethyl-6-((E)-(4-((E)-(phenyldiazenyl)naphthalen-1yl)diazenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidine, ακολουθούμενη από 2,2-dimethyl-4-((E)-(4-((E)-(phenyldiazenyl)naphthalen-1yl)diazenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidine.

Με βάση τη σύνθεση του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου μπορεί να εφαρμοσθεί μια καινοτόμος μέθοδος για την ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών υλικών. Αυτό το φάσμα περιλαμβάνει κυτταρικές σειρές, ιστούς (Evangelou *et al.*, 2017) και βιολογικά υγρά (Rizou *et al.*, 2019). Οι ιστοί μπορεί να είναι νωποί, διατηρημένοι σε θερμοκρασία -80°C, καθώς και μονιμοποιημένοι σε φορμαλδεΰδη/εγκλεισμένοι σε παραφίνη. Το αντιδραστήριο GL13 συνδέεται ειδικά με τη λιποφουσκίνη και με αυτό τον τρόπο αποτελεί ένα ευέλικτο εργαλείο για την

ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων, με την ίδια ειδικότητα με το SSB, αλλά με εντυπωσιακά βελτιωμένη ευαισθησία και βελτιωμένη αναλογία σήματος προς θόρυβο. Αυτή η νέα μεθοδολογία παρέχει πρωτοφανή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις δοκιμές που χρησιμοποιούνται σήμερα, καθώς είναι απλή, ευαίσθητη, συγκεκριμένη και ευρέως εφαρμόσιμη, ακόμη και από μη έμπειρους χρήστες. Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με συμβατική ανοσοϊστοχημεία που επιτρέπει την ταυτόχρονη οπτικοποίηση των γηρασμένων κυττάρων και άλλων, καθορισμένων με αντίσωμα βιοδεικτών του φαινομένου της γήρανσης ή άλλων διεργασιών (Evangelou *et al.*, 2017) (Εικόνα 1.6).

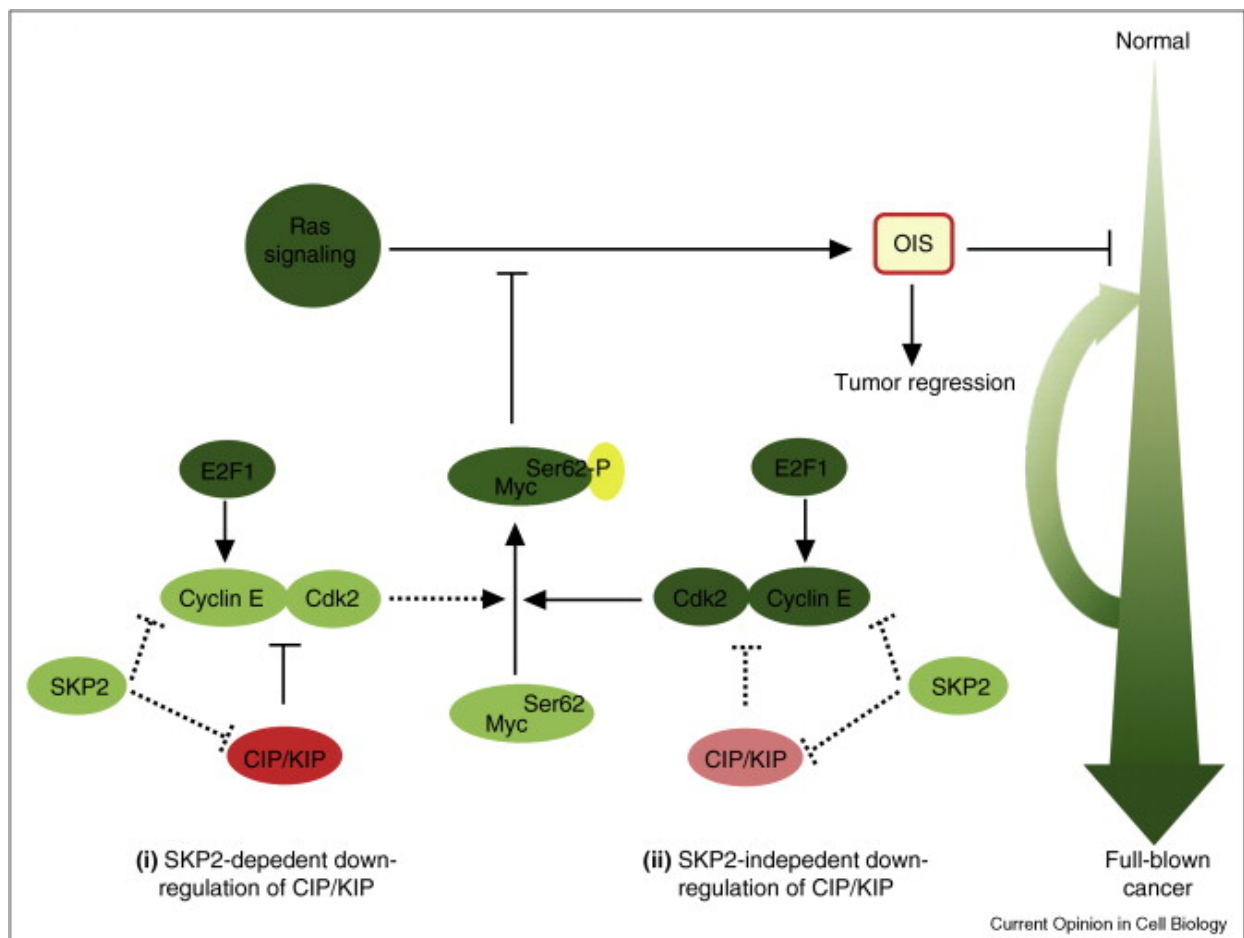


Εικόνα 1.6: Χημική δομή του αντιδραστηρίου GL13. Η παρασκευή του χημικού αντιδραστηρίου βασίζεται στην ένωση (E)-4- (phenyldiazenyl)naphthalen-1-amine, ως υλικό έναρξης, η οποία πρώτα διαζωτώνεται και στη συνέχεια το diazonium salt συνδέεται με 2,2-dimethyl-2,3-dihydro-1H- perimidine. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε ένα πολύπλοκο μίγμα χημικών ενώσεων και το κύριο παράγωγο όλων των ενώσεων αποτελεί η ένωση 2,2-dimethyl-6-((E)-4-((E)-(phenyldiazenyl)naphthalen-1yl)diazenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidine, ακολουθούμενη από 2,2-dimethyl-4-((E)-4-((E)-(phenyldiazenyl)naphthalen- 1yl)diazenyl)-2,3-dihydro-1H-perimidine.

1.9 Η γήρανση ως θεραπευτικός στόχος

Η ενεργοποίηση της απόπτωσης αποτελεί τη βάση της πρόσφατης καρκινικής θεραπείας. Η εγκαθίδρυση της γήρανσης ως δεύτερη «απάντηση» στην αντικαρκινική απόκριση καθιστά την διερεύνησή της απαραίτητη. Πολλές μελέτες αναφέρουν παρουσία της γήρανσης, ακολουθώντας θεραπεία του καρκίνου με χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Roberson *et al.*, 2005).

Μία θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η στόχευση των ογκογονιδίων, σε μία προσπάθεια να προκαλέσει μία αντισταθμιστική ογκοκατασταλτική απόκριση. Αυτό θα μπορούσε να συμβεί στοχεύοντας το γονίδιο *Skp2*, μία λιγάση, η οποία υπερεκφράζεται συχνά σε περιπτώσεις καρκίνου. Όμως η αναστολή του *Skp2* πρέπει να εφαρμόζεται με επιφυλάξεις, καθώς δεν αποικοδομεί μόνο αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, αλλά και μόρια, όπως η Cyclin E, που προωθούν τον κυτταρικό κύκλο (Koutsami *et al.*, 2008). Ανάλογο αποτέλεσμα θα έχει και η διαγραφή του γονιδίου *Cdk2* (κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 2) σε ένα περιβάλλον επαγόμενο από c-myc, αλλά σε αυτή την περίπτωση η γήρανση εξαρτάται από τις πρωτεΐνες p16^{INK4A} και p53. Η επιλεκτική καταστολή του c-myc, επίσης, επάγει τη γήρανση. Η φωσφορυλίωση του c-myc στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser-62, μέσω της αναστολής της δραστηριότητας του συμπλόκου Cdk2/cyclin E, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επαγωγή της γήρανσης. Όλα αυτά τα αποτελέσματα έχουν παραχθεί όχι μόνο γενετικά, αλλά με μικρά μόρια αναστολείς, κάνοντας αυτές τις προκλινικές δοκιμές αρκετά υποσχόμενες (Koutsami *et al.*, 2008) (Εικόνα 1.7).



Πηγή: Gorgoulis and Halazonetis, 2010, Curr Opin Cell Biol.

Εικόνα 1.7 Στοχευμένα ογκογονίδια μπορούν να οδηγήσουν στη γήρανση, ανάλογα με το μοριακό υπόβαθρο. Η κατάργηση της φωσφορυλίωσης του c-myc στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser-62, μέσω της αναστολής της δραστηριότητας του συμπλόκου Cdk2/cyclin E, επάγει τη γήρανση. Επιλεκτική μείωση της πρωτεΐνης SKP2 ρυθμίζει ανοδικά τους κυκλινοεξαρτώμενους αναστολείς κινασών CIP/KIPs, οι οποίοι με τη σειρά τους αναστέλλουν τη δραστηριότητα του Cdk2/cyclin E συμπλέγματος. Παρόλα αυτά, όταν η ρύθμιση καθοδικά των αναστολέων CIP/KIPs είναι ανεξάρτητη της SKP2, η αναστολή της SKP2 ρυθμίζει ανοδικά την cyclin E με πιθανές επιβλαβείς επιδράσεις (Gorgoulis and Halazonetis, 2010).

1.10 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης αποτελεί το στάδιο της μη αναστρέψιμης, στις περισσότερες περιπτώσεις, διακοπής της κυτταρικής ανάπτυξης, στην οποία το κύτταρο παραμένει μεταβολικά ενεργό. Εμπλέκεται τόσο στην εμβρυϊκή, όσο και στην ενήλικη ανάπτυξη. Δεν σχετίζεται, όμως, μόνο με φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και με παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Η συνεισφορά της, μπορεί να έχει θετικό, καθώς και αρνητικό, αντίκτυπο για την αντιμετώπιση της παθολογικής κατάστασης.

Μέχρι τώρα οι πιο διαδεδομένοι βιοδείκτες για τον εντοπισμό των γηρασμένων κυττάρων είναι η δραστικότητα του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence associated β-galactosidase-SA β-gal), καθώς και το χημικό αντιδραστήριο Sudan Black B (SBB). Οι δύο μέθοδοι ανίχνευσης των γηρασμένων κυττάρων, όμως, παρουσιάζουν τεχνικές προκλήσεις, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ευασθησία και την ειδικότητα κάθε πειράματος. Υπήρξε, λοιπόν, η ανάγκη να συντεθούν νέες χημικές ενώσεις, ανάλογα του SBB, οι οποίες εντοπίζουν τα γηρασμένα κύτταρα και δεν εμφανίζουν τεχνικές δυσκολίες. Η σύνθεση του νέου χημικού αναλόγου του SBB πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο και ονομάζεται GL13. Το αντιδραστήριο δεσμεύεται ειδικά και με ευαισθησία με τη λιποφουσκίνη, η οποία αποτελεί συσσωμάτωμα οξειδωμένων μακρομορίων. Η ποσοτικοποίηση της λιποφουσκίνης θεωρείται μεγάλης σημασίας για ένα ευρύ φάσμα των Επιστημών Ζωής και των σχετικών κλάδων. Τα επίπεδα της λιποφουσκίνης φαίνεται πως αποτελούν αποτέλεσμα μαζικών εκθέσεων στο μεταβολικό στρες και, συνεπώς, συνδέονται άμεσα με την διαδικασία του γήρατος και τις παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Υπάρχουν πολλά στοιχεία που υποστηρίζουν πως υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση των επιπέδων της λιποφουσκίνης με την ηλικία, καθώς και με ασθένειες που σχετίζονται με αυτή. Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι ο αριθμός των γηρασμένων κυττάρων σε ιστούς και όργανα αυξάνεται με την ηλικία, καθώς το στρες και οι βλάβες συσσωρεύονται. Είναι ενδιαφέρον ότι έχουν περιγραφεί ορισμένες μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των οργανισμών με βάση την ποσοτικοποίηση των λιποφουσκίνης.

Οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13, να αναπτυχθούν πρωτόκολλα που στηρίζονται σε μία υβριδική ιστοχημική-ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Η τεχνική αυτή θα επιτρέπει την ανίχνευση των γηρασμένων κυττάρων, μέσω εντοπισμού της λιποφουσκίνης, σε οποιοδήποτε βιολογικό υλικό. Θα είναι, επομένως, εφικτή η μελέτη του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης σε νωπούς και μονιτοποιημένους ιστούς, σε κυτταρικές σειρές, καθώς και σε βιολογικά υγρά. Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης θα εξεταστεί, επίσης, σε ορό αίματος μετρώντας τα επίπεδα της ελεύθερης λιποφουσκίνης, σε ασθενείς και υγιείς. Τα δείγματα θα ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την παθολογική κατάσταση και την ηλικία. Οι ασθένειες που θα εξετασθούν είναι η καρδιακή ανεπάρκεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Βασική ιδέα αυτών των πειραμάτων είναι η συσχέτιση των επιπέδων της ελεύθερης λιποφουσκίνης στον ορό με την ηλικία και σε ποιο βαθμό, καθώς επίσης, αν τα επίπεδα λιποφουσκίνης μεταβάλλονται σε κάποιες ασθένειες, αποτελώντας, ίσως, μελλοντικό προγνωστικό δείκτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία του αντιδραστηρίου GL13

Προσθήκη 7.5ml από διάλυμα αιθανόλης 100% v/v (σε dH₂O) σε 40mg αντιδραστηρίου GL13. Στη διαδικασία χρησιμοποιείται parafilm, ώστε να μην υπάρχουν διαρροές. Επώαση για συνολικά 120 λεπτά στους 60°C σε υδατόλουτρο και ανά 30 λεπτά απαλή ανάδευση με το χέρι, μέχρι το αντιδραστήριο να διαλυθεί πλήρως. Μετά την αραίωση, το GL13 μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές U2OS, DLFs, HeLa, Li-Fraumeni και Saos καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Thermo Fisher Scientific) συμπληρωμένο με 10% ορό FBS (Thermo Fisher Scientific) ή Tet-system approved FBS (Clontech Laboratories) στην περίπτωση κυτταρικού συστήματος επαγωγίμης υπερέκφρασης με τη τεχνολογία Tet-ON και 1% αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Thermo Fisher Scientific). Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς ανθρώπινων κυττάρων βρογχικού επιθηλίου (HBEC) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Keratinocyte serum free medium, συμπληρωμένο με 50 µg/ml εκχυλίσματος βόειας υπόφυσης και 5ng/ml επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (#17005-075, Thermo Fisher Scientific). Όλες οι κυτταρικές σειρές συντηρήθηκαν σε κλίβανο με σταθερή παροχή CO₂ 5% στους 37°C.

2.3 Δείγματα ιστών

Τα δείγματα ιστών που χρησιμοποιήθηκαν έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη. Στο σύνολο τους τα περιστατικά ανταποκρίνονται σε φυσιολογικούς ιστούς, προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε μετά από έγκριση της επιτροπής βιοηθικής με αριθμό πρωτοκόλλου 1718025215.

2.4. *In situ* τεχνικές

2.4.1α Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο Sudan Black B (SBB)

Για την προετοιμασία του SBB διαλύματος, σε 100ml 70% αιθανόλης διαλύονται 0.7g από το SBB και το διάλυμα αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου ολονύκτια. Στο ποτήρι ζέσεως τοποθετείται διπλό parafilm, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της αιθανόλης. Αφού το διάλυμα φιλτραριστεί δύο φορές είναι έτοιμο για χρήση.

Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για την χρώση αφυδατώνονται αρχικά σε διάλυμα αιθανόλης 50% v/v για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε 70% αιθανόλη για τον ίδιο χρόνο σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το δεύτερο διάλυμα αφυδάτωσης, τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα, με σύριγγα και φίλτρο διαμέτρου 0.22μm, σταγόνα SBB και χρησιμοποιείται καλυπτρίδα για να καλύψει το δείγμα. Η αντίδραση παρατηρείται στο μικροσκόπιο για 8 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρείται προσεκτικά η καλυπτρίδα και το δείγμα ξεπλένεται για 3-5 φορές σε διάλυμα 50% v/v αιθανόλης. Έπειτα ξεπλένεται σε απιονισμένο νερό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα Nuclear Fast Red για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα ξεπλένεται ξανά σε απιονισμένο νερό και χρησιμοποιείται διάλυμα 40% γλυκερόλης/PBS και καλυπτρίδα για την κάλυψή του. Τα αποτελέσματα παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.4.1β Χρώση SA-β-gal

Η μέθοδος στηρίζεται στη συσσώρευση της λυσοσωμικής β-γαλακτοζιδάσης (senescence associated beta-galactosidase), η οποία υδρολύει τα β-γαλακτοζίδια σε μονοσακχαρίτες στα γηρασμένα κύτταρα. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.0, χρησιμοποιώντας χρωμογόνο υπόστρωμα (X-gal). Η χρώση γίνεται εμφανής με τον εντοπισμό γαλάζιου ιζήματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 40mM Citric acid/Disodium hydrogen phosphate dihydrate (pH 6.0), 5mM Potassium ferrocyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂ και 1mg/ml X-gal.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες και μονιμοποιούνται σε διάλυμα φορμαδεύδης 4% v/v σε PBS για 10 λεπτά και επωάζονται για 8 ώρες με το ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθεί, προαιρετικά, χρώση των πυρήνων με διάλυμα Nuclear Fast Red για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη χρήση μονιμοποιητικού υλικού και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.4.2 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μία *in situ* τεχνική, η οποία συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Ένα αντίσωμα συνδέεται με ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο με μία χημική αντίδραση, με την οποία μπορεί να γίνει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Στις μεθόδους έμμεσης ανίχνευσης χρησιμοποιείται ένα δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με ένα ένζυμο, συνήθως το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP), και με τη βοήθεια ενός υποστρώματος, το σήμα παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο.

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Αποπαραφίνωση:

- Επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά σε κλίβανο στους 60°C.
- Ξυλόλη I για 5 λεπτά
- Ξυλόλη II για 10 λεπτά

2. Ενυδάτωση των τομών σε υδατικά διαλύματα αιθανόλης με σταδιακή μείωση της συγκέντρωσής της.

- Αιθανόλη I 100% v/v για 5 λεπτά
- Αιθανόλη II 100% v/v για 10 λεπτά
- Αιθανόλη 96% v/v για 10 λεπτά
- Αιθανόλη 80% v/v για 5 λεπτά
- Αιθανόλη 70% v/v για 3 λεπτά
- Αιθανόλη 50% v/v για 3 λεπτά
- Διάλυμα Tris Buffer Saline (TBS) για 5 λεπτά.

3. Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων χρησιμοποιώντας διάλυμα κιτρικού οξέος 1x, 10mM pH 6. Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για συνολικά 25 λεπτά (5' ζέσταμα δ/τος και 20' επώαση) ή σε μηχανήμα steamer για συνολικά 45 λεπτά (5' ζέσταμα δ/τος και 40 λεπτά επώαση δειγμάτων). Οι τομές βρίσκονται στο διάλυμα του κιτρικού οξέος και τοποθετούνται σε σκεύος με νερό βρύσης για 20 λεπτά.
4. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
5. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης με διάλυμα 3% v/v H₂O₂/ dH₂O για 13 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι.
6. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
7. Παρεμπόδιση αντίδρασης μη ειδικών θέσεων για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση του αντιδραστήριου Ultra V Block, από το kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific.
8. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
9. Προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος σε καθορισμένη αραίωση. Οι συνθήκες επώασης και η αραίωση εξαρτώνται από το εκάστοτε αντίσωμα που θα χρησιμοποιήσουμε και τον ιστό που εφαρμόζεται μετά από δοκιμές των καταλληλότερων συνθηκών. Η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4°C.
10. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.

11. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα. Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Primary enhancer του kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, (Thermo Fisher Scientific) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
13. Επώαση με το αντιδραστήριο HRP Polymer του kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD (Thermo Fisher Scientific) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό το στάδιο γίνεται σε σκοτάδι.
14. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
15. Χρώση με το αντιδραστήριο DAB (1μl DAB chromogen σε 100μl DAB substrate) του kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD (Thermo Fisher Scientific). Η αντίδραση παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο.
16. Αδρανοποίηση της αντίδρασης με νερό βρύσης.
17. Χρώση με αιματοξυλίνη και πλύση με τρεχούμενο νερό.
18. Αφυδάτωση (αντίστροφη διαδικασία της ενυδάτωσης, όπως περιγράφεται στο βήμα 2).
19. Κάλυψη των παρασκευασμάτων με καλυπτρίδες με το μέσο κάλυψης DPX, που είναι διαλυτό στην ξυλόλη.

Όταν χρησιμοποιούνται κύτταρα επιστρωμένα σε καλυπτρίδες (ανοσοκυτταροχημεία), το πρωτόκολλο ξεκινάει από το στάδιο της αδρανοποίησης της ενδογενούς υπεροξειδάσης και δεν πραγματοποιείται το βήμα της αφυδάτωσης.

2.4.3 Ανοσοϊστοχημική χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13

1. Αποπαραφίνωση:

- Επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά σε κλίβανο στους 60°C.
- Επώαση σε ξυλόλη I για 5 λεπτά
- Επώαση σε ξυλόλη II για 10 λεπτά

2. Ενυδάτωση των τομών σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης περιεκτικότητας σε dH₂O.

- Αιθανόλη I 100% v/v για 5 λεπτά
- Αιθανόλη II 100% v/v για 10 λεπτά
- Αιθανόλη 96% v/v για 10 λεπτά
- Αιθανόλη 80% v/v για 5 λεπτά
- Αιθανόλη 70% v/v για 3 λεπτά
- Αιθανόλη 50% v/v για 3 λεπτά
- Διάλυμα TBS για 5 λεπτά

3. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης με διάλυμα 3% v/v H₂O₂/ dH₂O για 13 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι.

4. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.

5. Επώαση με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Επώαση με 70% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Χρώση με το αντιδραστήριο GL13 που είναι συζευγμένο με βιοτίνη, για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (παράλληλη παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο) ή για 10 λεπτά στους 37°C. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται μία σύριγγα και κατάλληλο φίλτρο (μεγέθος φίλτρου 13mm, μέγεθος πόρων

μεμβράνης 0.22μm). Αφού τοποθετηθεί κατάλληλη ποσότητα του αντιδραστηρίου, χρησιμοποιείται καλυπτρίδα ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της αιθανόλης.

8. Απομάκρυνση της καλυπτρίδας και της περίσσειας αντιδραστηρίου με χρήση διηθητικού χαρτιού.
9. Πλύσεις με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
11. Επώαση με διάλυμα 0.3% v/v Triton X/ dH₂O για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος έναντι της βιοτίνης, ώστε να συνδεθεί με το αντιδραστήριο GL13 που είναι συζευγμένο με μόριο βιοτίνης. Το αντίσωμα χρησιμοποιείται σε αραίωση 1/300 σε διάλυμα TBS και η επώαση γίνεται ολονύκτια στους 4°C.
13. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
14. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα. Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Primary enhancer από το kit (από το kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
16. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου το αντιδραστήριο HRP Polymer από το kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Αυτό το στάδιο γίνεται σε σκοτάδι.

17. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
18. Χρώση με το αντιδραστήριο DAB (1μl DAB chromogen σε 200μl DAB substrate) από το kit Quanto Detection System HRP-DAB TL-060-QHD, της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Η αντίδραση παρατηρείται σε οπτικό μικροσκόπιο.
19. Αδρανοποίηση της αντίδρασης με νερό βρύσης.
20. Χρώση με αραιωμένη αιματοξυλίνη 1:2 σε dH₂O και πλύση με τρεχούμενο νερό.
21. Κάλυψη παρασκευασμάτων με καλυπτρίδες με τη χρήση καλυπτικού υλικού (40% v/v γλυκερόλη) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Αντίστοιχα, όταν πρόκειται για κύτταρα επιστρωμένα σε καλυπτρίδες (ανοσοκυτταροχημεία), το πρωτόκολλο ξεκινάει στο στάδιο της αδρανοποίησης της ενδογενούς υπεροξειδάσης και δεν πραγματοποιείται το βήμα της αφυδάτωσης.

2.4.4 Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13

Τα βήματα 1-16 είναι κοινά με τη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας. Ακολουθώς:

1. Επώαση με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Επώαση με 70% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Χρώση με το αντιδραστήριο GL13 για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (παράλληλη παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο) ή για 10 λεπτά στους 37°C. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται μία σύριγγα και κατάλληλο φίλτρο

- (μεγέθος φίλτρου 13mm , μέγεθος πόρων μεμβράνης 0.22μm). Αφού τοποθετηθεί κατάλληλη ποσότητα του αντιδραστηρίου, χρησιμοποιείται καλυπτρίδα ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της αιθανόλης.
4. Απομάκρυνση της καλυπτρίδας και της περίσσειας αντιδραστηρίου με χρήση διηθητικού χαρτιού.
 5. Πλύσεις με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 6. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
 7. Επώαση με το αντισώματος έναντι της βιοτίνης για 60 λεπτά στους 37°C, σε αραιώση 1/300 σε διάλυμα TBS.
 8. Πλύσεις με διάλυμα TBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
 9. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (αραιώση 1/800 σε διάλυμα TBS) για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι.
 10. Πλύσεις με διάλυμα TBS, 3 φορές για 5 λεπτά.
 11. Προετοιμασία του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης. Σε 10 ml dH₂O (τελικό όγκο) προσθέτουμε 1 ταμπλέτα NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate) (Sigma-Aldrich) και 20μl από 100mM Levamisol. Το σύμπλοκο NBT/BCIP αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενα χρωμογόνα υποστρώματα της αλκαλικής φωσφατάσης.
 12. Επώαση με το διάλυμα NBT/BCIP και παράλληλη παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

13. Πλύσεις με το διάλυμα KTBT (50mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 10mM KCl σε 1000ml dH₂O) 2 φορές για 5 λεπτά, ώστε να σταματήσει η αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης.
14. Πλύσεις σε τρεχούμενο νερό βρύσης
15. Κάλυψη παρασκευασμάτων με καλυπτρίδες με τη χρήση καλυπτικού υλικού (40% v/v γλυκερόλη) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.4.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση του αντιδραστήριου GL13

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται δευτερογενή φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και τον εντοπισμό συγκεκριμένου αντιγόνου μέσω πρωτογενών αντισωμάτων σε ιστούς ή κύτταρα. Στη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται, συνήθως, ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική που εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και η παρατήρηση γίνεται μέσω μικροσκοπίου φθορισμού. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη του φαινομένου της γήρανσης σε κυτταρικές σειρές, στις οποίες η γήρανση συμβαίνει φυσιολογικά λόγω μείωσης του μήκους των τελομερών ή έχει προκληθεί γήρανση λόγω υπερέκφρασης συγκεκριμένου γονιδίου. Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Πλύση των καλυπτρίδων με διάλυμα PBS.
2. Επώαση με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Επώαση με 70% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Χρώση με το αντιδραστήριο GL13 για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (παράλληλη παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο) ή για 10 λεπτά στους 37°C. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται μία σύριγγα και κατάλληλο φίλτρο (μεγέθος φίλτρου 13mm , μεμβράνη 0.22μm). Αφού τοποθετηθεί κατάλληλη

- ποσότητα του αντιδραστηρίου, χρησιμοποιείται καλυπτρίδα ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της αιθανόλης.
5. Απομάκρυνση της καλυπτρίδας και της περίσσειας αντιδραστηρίου με χρήση διηθητικού χαρτιού.
 6. Πλύσεις με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 7. Πλύσεις με διάλυμα PBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
 8. Επώαση με διάλυμα 0.3% v/v Triton X/ dH₂O για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 9. Προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος. Το αντίσωμα έναντι της βιοτίνης επώάζεται ολονύκτια στους 4°C, σε αραιώση 1/300 σε διάλυμα PBS.
 10. Πλύσεις με διάλυμα PBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
 11. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (αραιώση 1/200 σε PBS), το οποίο είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι.
 12. Πλύσεις με διάλυμα PBS, δύο γρήγορες και μία πλύση για 5 λεπτά.
 13. Για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική DAPI σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml. Τα δείγματα επώάζονται για 5 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
 14. Πλύση με διάλυμα PBS.
 15. Κάλυψη παρασκευασμάτων με καλυπτρίδες με τη χρήση καλυπτικού υλικού (40% v/v γλυκερόλη) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.4.6 *In situ* υβριδισμός και ανοσοφθορισμός με τη χρήση του χημικού αντιδραστήριου GL13 σε κύτταρα

Η *in situ* υβριδοποίηση αποτελεί μία μέθοδο που μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε ειδικά συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA (ή DNA) σε ιστούς ή κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης με μονόκλωνα μόρια νουκλεϊκών οξέων με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας. Στο πειραματικό πρωτόκολλο ο *in situ* υβριδισμός συνδυάστηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13, με στόχο τη μελέτη του ρόλου του miR34a στο κυτταρικό μοντέλο HBEC Cdc6 Tet ON.

1. Επώαση των κυττάρων σε διάλυμα 4% v/v παραφορμαλδεϋδης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με στόχο την μονιμοποίηση των κυττάρων που είναι ήδη επιστρωμένα σε γυάλινες καλυπτρίδες.
2. Απομάκρυνση διαλύματος και πλύση με PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Επώαση των κυττάρων με διάλυμα 0.3% v/v Triton X-100/PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης με διάλυμα 3% v/v H₂O₂/ dH₂O για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι.
6. Απομάκρυνση του διαλύματος και 2 πλύσεις με διάλυμα PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Προετοιμασία δειγμάτων με διάλυμα υβριδοποίησης απουσία του ανιχνευτή (προϋβριδισμός).

8. Επώαση με το διάλυμα υβριδοποίησης (το οποίο περιέχει τον κατάλληλο ανιχνευτή) για 1 ώρα σε κατάλληλη θερμοκρασία. Ειδικότερα, για τον εντοπισμό του miR34a, η ιδανική θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι $T_m=58^{\circ}\text{C}$.
9. Πλύσεις με διάλυμα Saline-Sodium Citrate (SSC, 3M sodium chloride and 300 mM trisodium citrate) από το kit miRCURY® LNA® miRNA ISH (Qiagen).
10. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Επώαση με διάλυμα που περιέχει μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους για κάλυψη μη ειδικών θέσεων σε κάθε δείγμα, για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Επώαση με αντίσωμα έναντι του DIG (digoxygenin) και συζευγμένο με υπεροξειδάση σε αραίωση 1:400 σε διάλυμα PBS 1x για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Επώαση με το διάλυμα TSA-FITS (Tyramide Signal Amplification-green fluorophore) TM Fluorescein System (Perkin Elmer, NEL741B001KT/NEL), το οποίο συνδέεται με την υπεροξειδάση, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αποφυγή έκθεσης σε φως.
15. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (4 φορές).
16. Επώαση με διάλυμα 1% v/v BSA και 1:20 ορού σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
17. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
18. Επώαση με 50% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αποφυγή έκθεσης σε φως.

19. Επώαση με 70% v/v αιθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
Αποφυγή έκθεσης σε φως.
20. Επώαση με το αντιδραστήριο GL13 για 10 λεπτά σε 37°C.
21. Πλύση με 50% v/v αιθανόλη για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Αποφυγή έκθεσης σε φως.
22. Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της βιοτίνης για 60 λεπτά στους 37°C.
23. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (4 φορές).
24. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα goat anti-mouse Alexa Fluor (532) σε αραιώση 1:200 σε διάλυμα PBS για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
25. Πλύσεις με διάλυμα PBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (4 φορές).
26. Κάλυψη των καλυπτρίδων με ειδικό μέσο κάλυψης για φθορισμό: Slow Fade Gold antifade with DAPI (Thermo Fisher Scientific).
27. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού AxioLab fluorescence microscope της εταιρείας Zeiss.

2.5 Κυτταρομετρία ροής με τη χρήση του χημικού αντιδραστήριου GL13

Κυτταρομετρία ροής ονομάζεται η διαδικασία καταμέτρησης κυττάρων, καθώς διελαύνουν από ακτίνα λέιζερ. Στόχος είναι η καταμέτρηση των κυττάρων που υπόκεινται στο φαινόμενο της γήρανσης. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι Saos p21^{WAF1/Cip1} Tet-ON σε αριθμό 10⁶ κύτταρα περίπου, όπου έχει γίνει πρόκληση της γήρανσης μέσω της ενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου p21^{WAF1/Cip1} για 3 ημέρες (Galanos *et al.*, 2016). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν έχει προκληθεί επαγωγή πρώιμης γήρανσης.

1. Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και συλλέγονται σε falcon.
2. Φυγοκεντρούνται στα 232g για 5 λεπτά, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα PBS και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις ίδιες στροφές για 5 λεπτά.
3. Μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% PFA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη διαλύματος PBS.
4. Φυγοκέντρηση στα 232g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
5. Επώαση με διάλυμα 0.1% v/v Triton X/PBS 1x για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Προσθήκη διαλύματος PBS, φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
7. Πλύση με διάλυμα αιθανόλης 50% για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στα 232g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
8. Πλύση με διάλυμα αιθανόλης 70% για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθήκη του αντιδραστηρίου GL13 αραιωμένο σε 50% αιθανόλης και επώαση για 8 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση. Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται μία σύριγγα και κατάλληλο φίλτρο (μεγέθος φίλτρου 13mm , μεμβράνη 0.22μm).
10. Πλύση με διάλυμα αιθανόλης 50% για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στα 232g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
11. Επανάληψη του βήματος 10.
12. Προσθήκη διαλύματος PBS, φυγοκέντρηση στα 232g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
13. Επώαση του ιζήματος με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της βιοτίνης (Abcam)

- για 60 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση, σε αραιώση 1/300 σε PBS 1x
14. Πλύση με διαλύμα PBS, φυγοκέντρωση στα 232g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
 15. Επώαση του ιζήματος με δευτερογενές αντίσωμα για 25 λεπτά σε πάγο, σε αραιώση 1/100 σε PBS.
 16. Πλύση με διαλύμα PBS, φυγοκέντρωση στα 232g για 5 λεπτά και αφαίρεση υπερκλειμένου.
 17. Επαναδιάλυση με διάλυμα PBS.
 18. Τα δείγματα φορτώνονται στο μηχάνημα FACS Calibur, Becton Dickinson.
 19. Η καταμέτρηση και η ανάλυση γίνονται με το πρόγραμμα Motif Software.

2.6 Απομόνωση και ανίχνευση της λιποφουσκίνης με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και τη χρήση του αντιδραστηρίου GL13

Με βάση την εξαιρετική εξειδίκευση του αντιδραστηρίου GL13, σχεδιάσαμε ένα γρήγορο, πολύ εξειδικευμένο και ακριβές πρωτόκολλο για την απομόνωση, την ανίχνευση και τη μέτρηση των επιπέδων της διαλυτής λιποφουσκίνης σε υπερκείμενο διάλυμα κυτταρικής καλλιέργειας, σωματικά υγρά, καθώς και ομογενοποιημένα κυττάρων και ιστών. Η τεχνική αυτή έχει σχεδιαστεί χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη μέθοδο εκχύλισης Folch, ώστε να απομονωθεί η λιποφουσκίνη και να μελετηθεί το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης σε βιολογικά υγρά/ δείγματα.

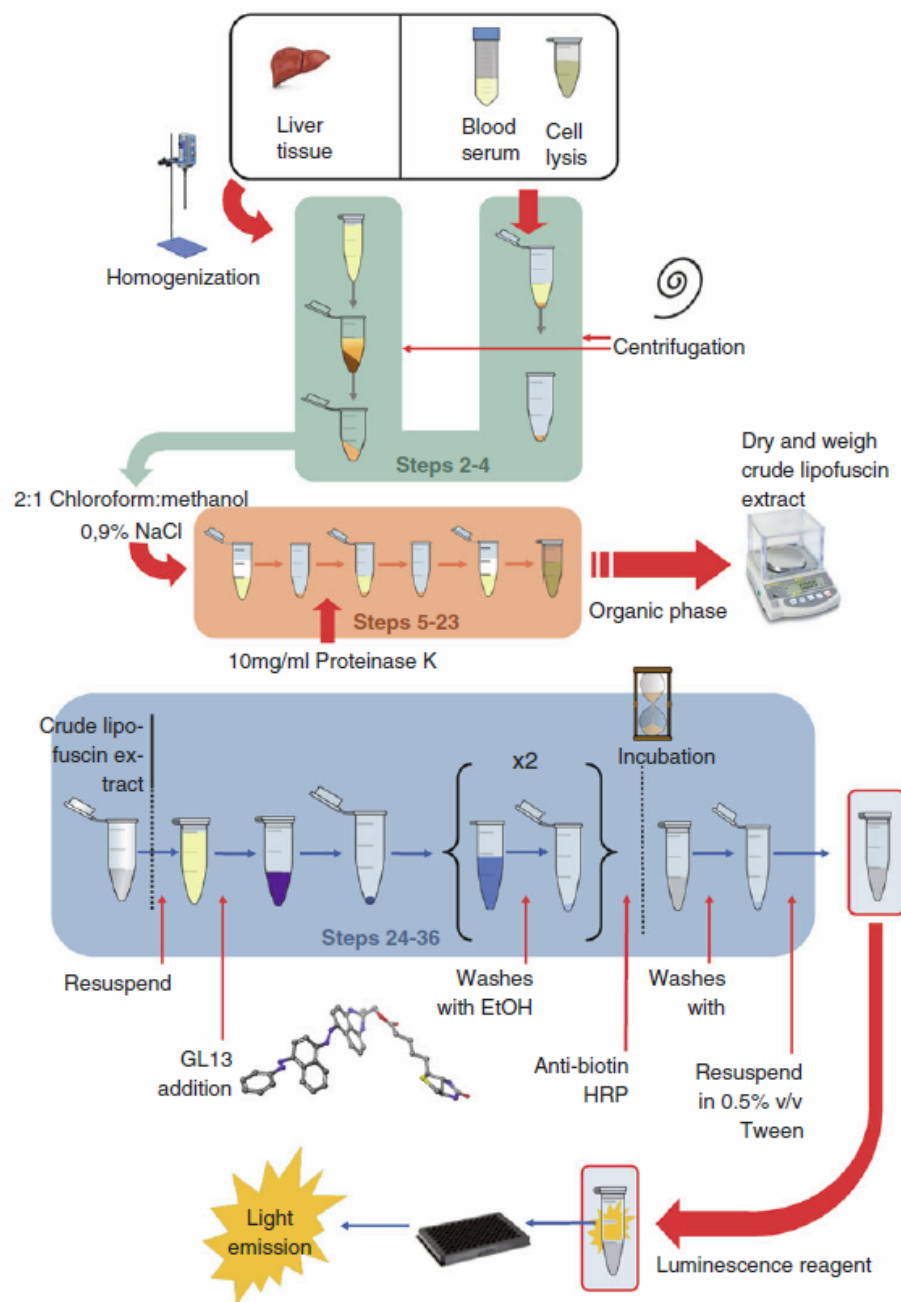
Μέθοδος

- 1) Μεταφορά 500μl δείγματος σε Eppendorf.
- 2) Φυγοκέντρωση στους 4°C στα 232g για 10 λεπτά.
- 3) Μεταφορά υπερκλειμένου σε Eppendorf και απόρριψη ιζήματος.
- 4) Φυγοκέντρωση στους 4°C στα 3700g για 10 λεπτά.

- 5) Απόρριψη υπερκείμενου.
- 6) Προσθήκη στο ίζημα για διαχωρισμό φάσεων:
 - α) 50μl μεθανόλη – υπερκείμενη υδατική φάση
 - β) 100μl χλωροφόρμιο – υποκείμενη οργανική φάση που περιέχει το σύνολο των λιπιδίων του δείγματος
 - γ) 30μl NaCl 0.9% σε ddH₂O
- 7) Επώαση υπό ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 8) Φυγοκέντρηση στους 4°C στα 3700g για 10 λεπτά.
- 9) Απομάκρυνση υπερκείμενης υδατικής φάσης.
- 10) Μεταφορά υποκείμενης οργανικής φάσης σε Eppendorf.
- 11) Προσθήκη σε μέση φάση διαλύματος Proteinase K 10mg/ml (REF 740506 Macherey-Nagel).
- 12) Επώαση για 1 λεπτό σε υδατόλουτρο με υπερήχους.
- 13) Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 λεπτά.
- 14) Φυγοκέντρηση στους 4°C στα 3700g για 10 λεπτά.
- 15) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 16) Προσθήκη στο ίζημα:
 - α) 50μl μεθανόλη – υπερκείμενη υδατική φάση.
 - β) 100μl χλωροφόρμιο – υποκείμενη οργανική φάση που περιέχει το σύνολο των λιπιδίων του δείγματος.
 - γ) 30μl NaCl 0.9% σε ddH₂O.
- 17) Καλή ανάμειξη των φάσεων με vortex.
- 18) Επώαση για 1 λεπτό σε υδατόλουτρο με υπερήχους.

- 19) Επώαση υπό ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 20) Φυγοκέντρωση στους 4°C στα 3700g για 10 λεπτά.
- 21) Απομάκρυνση υπερκείμενης υδατικής φάσης.
- 22) Μεταφορά υποκείμενης οργανικής φάσης στο Eppendorf από το στάδιο 10 (ανάμειξη των υποκείμενων οργανικών φάσεων).
- 23) Ολονύκτια επώαση οργανικών φάσεων με ανοιχτά Eppendorf σε απαγωγό, για εξάτμιση της οργανικής φάσης και λήψη στερεού ιζήματος λιπιδίων.
- 24) Αναδιάλυση του ιζήματος λιπιδίων σε 200μl ΕΤΟΗ 50% σε TBS.
- 25) Επώαση για 1 λεπτό σε υδατόλουτρο με υπερήχους.
- 26) Προσθήκη 7,5μl αντιδραστηρίου GL13 και ανάδευση.
- 27) Επώαση δειγμάτων και αρνητικού μάρτυρα ελέγχου υπό ανάδευση για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 28) Φυγοκέντρωση στους 4°C στα 7400g για 10 λεπτά.
- 29) Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 30) Πλύση με 500μl διαλύματος αιθανόλης 50% v/v και ανάδευση με πιπετάρισμα.
- 31) Φυγοκέντρωση στους 4°C στα 7400g για 10 λεπτά.
- 32) Επανάληψη των βημάτων 30 και 31.
- 33) Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος λιποφουσκίνης σε 100μl διαλύματος TBS.
- 34) Παρασκευή πρωτογενούς αντισώματος έναντι της βιοτίνης, το οποίο είναι συζευγμένο με HRP (Cell Signaling), σε αραιώση 1: 1.000 σε 0,5% Tween 20/TBS 1x.

- 35) Προσθήκη 100μl πρωτογενούς αντισώματος στα δείγματα και επώαση υπό ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 36) Φυγοκέντρωση στους 4°C στα 7400g για 10 λεπτά.
- 37) Πλύση με διάλυμα TBS και φυγοκέντρωση στους 4°C στα 7400g για 10 λεπτά.
- 38) Απομάκρυνση του υπερκείμενου και αναδιάλυση του ιζήματος λιποφουσκίνης σε 90μl διαλύματος 0,5% Tween 20/TBS.
- 39) Μεταφορά κάθε δείγματος σε πηγάδι τιτλοδότησης.
- 40) Ανάμειξη ίσων όγκων υποστρώματος χημειοφωταύγειας Lumiglo Reagent A και B (Cell Signaling) και προσθήκη 10μl του διαλύματος σε κάθε πηγάδι
- 41) Αφού περάσει 1 λεπτό, μετράμε το φως που εκπέμπεται, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Fluorchem και την CCD κάμερα της AlphaInnotech, software V1.3.0.7. **(Εικόνα 2.1)**

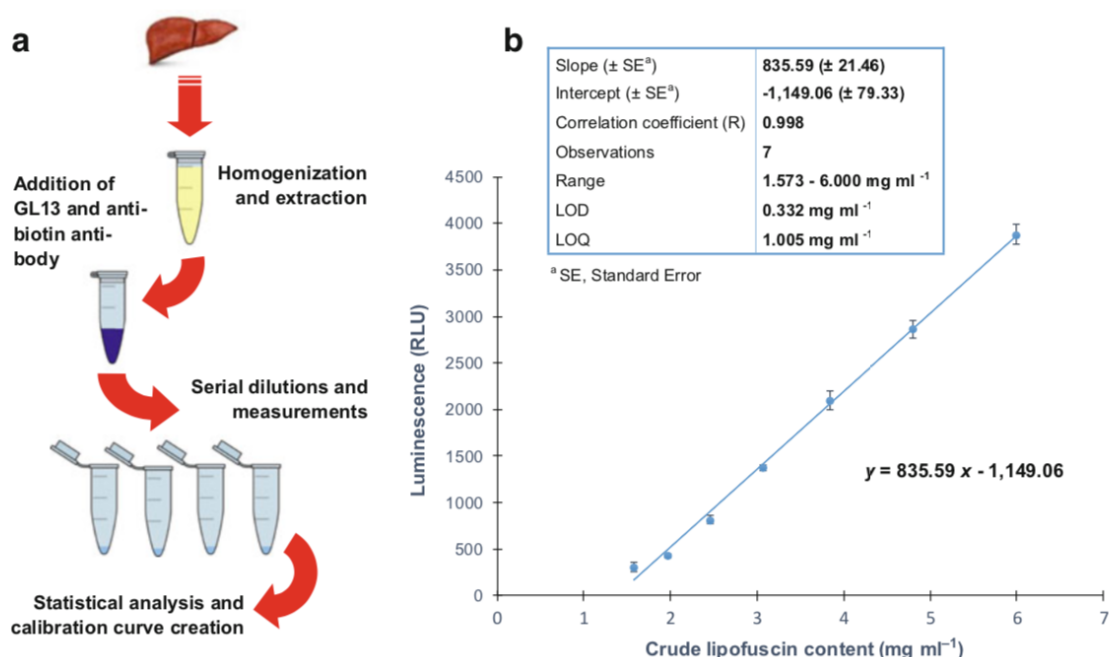


Εικόνα 2.1: Σχηματική ροή εργασίας της απομόνωσης και ανίχνευσης της λιποφουσκίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικά βιολογικά δείγματα. Το διάγραμμα απεικονίζει τα βασικά βήματα του πρωτοκόλλου, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία. Η λιποφουσκίνη είναι απομονωμένη από ομογενοποιημένο ανθρώπινο ιστό ήπατος, από ανθρώπινο ορό αίματος και από υπερκείμενο κυτάρων χρησιμοποιώντας χλωροφόρμιο – μεθανόλη, επωάζοντας με 10 mg/ml πρωτεϊνάσης K και φυγοκεντρώντας. Η λιποφουσκίνη διαλύεται στην οργανική φάση, η οποία εξατμίζεται και ζυγίζεται. Το ακατέργαστο εκχύλισμα της λιποφουσκίνης διαλύεται σε διάλυμα 1% v/v Tween 20/TBS. Μετά

από φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο. Η λιποφουσκίνη επαναδιαλύεται σε EtOH 50% και προστίθεται το αντιδραστήριο GL13. Το αντιδραστήριο δεσμεύεται με τη λιποφουσκίνη και το αντίσωμα έναντι της βιοτίνης-συζευγμένο με υπεροξειδάση συνδέεται με την βιοτίνη του αντιδραστηρίου GL13. Η υπεροξειδάση αντιδρά κατά την προσθήκη του υποστρώματος (H_2O_2) και εκπέμπεται φως. Η συγκέντρωση λιποφουσκίνης σε κάθε δείγμα είναι γραμμικά ανάλογη με την ένταση του φωτός.

2.7 Σχεδιασμός καμπύλης βαθμονόμησης

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του συσσωματώματος της λιποφουσκίνης των αναλυθέντων δειγμάτων, μετράται η φωτεινότητα και η ένταση του σήματος ταιριάζει με τις αντίστοιχες τιμές μιας καμπύλης βαθμονόμησης. Η καμπύλη αυτή δημιουργήθηκε ακολουθώντας ένα παρόμοιο πρωτόκολλο (Παράγραφος 2.6), με εξαίρεση την λιποφουσκίνη που εξάγεται από φρέσκο ανθρώπινο ηπατικό ιστό ηλικιωμένου ατόμου. Ενώ στα δείγματα των νεαρών ατόμων, τα επίπεδα λιποφουσκίνης ήταν χαμηλά [Σχετικές μονάδες έντασης φωτός (RLU): 10-471], σε αυτά που ελήφθησαν από ηλικιωμένα άτομα, παρατηρήσαμε αύξηση κατά 7,6 φορές στη μέτρηση (RLU: 486-3,252). Αυτά τα ευρήματα δεν παρέχουν μόνο μια ένδειξη των βασικών επιπέδων της λιποφουσκίνης στους ανθρώπους (νεαρά περιστατικά) και της κατανομής της σε ηλικιωμένα άτομα, αλλά επίσης επιβεβαιώνει σαφώς τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ της λιποφουσκίνης και της ηλικίας, υποδηλώνοντας περαιτέρω τον υποτιθέμενο ρόλο της ως βιοδείκτη για την παρακολούθηση της διαδικασίας γήρανσης.



Εικόνα 2.2 : (α) Σχηματική περίληψη της διαδικασίας που εφαρμόζεται για τη δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης. Η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάζεται ακολουθώντας τα βήματα για την απομόνωση της λιποφουσκίνης, όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία (Παράγραφος 2.6). Οι μετρήσεις καταγράφονται σε υπολογιστικό φύλλο Excel και πραγματοποιείται ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Ο προσδιορισμός των υπολογιζόμενων τιμών μπορεί να υποβοηθηθεί χρησιμοποιώντας το πρόσθετο ανάλυσης δεδομένων του Microsoft Excel και εφαρμόζοντας μη αυτόματες λειτουργίες. (β) Η καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ακατέργαστη λιποφουσκίνη σε δείγματα ιστού ήπατος μαζί με σχετικές παραμέτρους και μετρήσεις. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έχει πραγματοποιηθεί χωρίς συντελεστές στάθμισης, ενώ το σημείο 0,0 δεν συμπεριλήφθηκε ούτε η καμπύλη εξαναγκάστηκε μέσω αυτής κατά την τοποθέτησης (Μπάρες σφάλματος, n =3).

2.8 Απεικόνιση λιποφουσκίνης με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Για να επαληθευτεί ότι το εκχυλισμένο υλικό που απομονώνεται με την διαδικασία η οποία περιγράφεται στην Παράγραφο 2.6 περιέχει λιποφουσκίνη, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα ελέγχου. Τα πειράματα αυτά περιελάμβαναν προετοιμασία και βάφη εκχυλίσματος για παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Εικόνα 2.3).

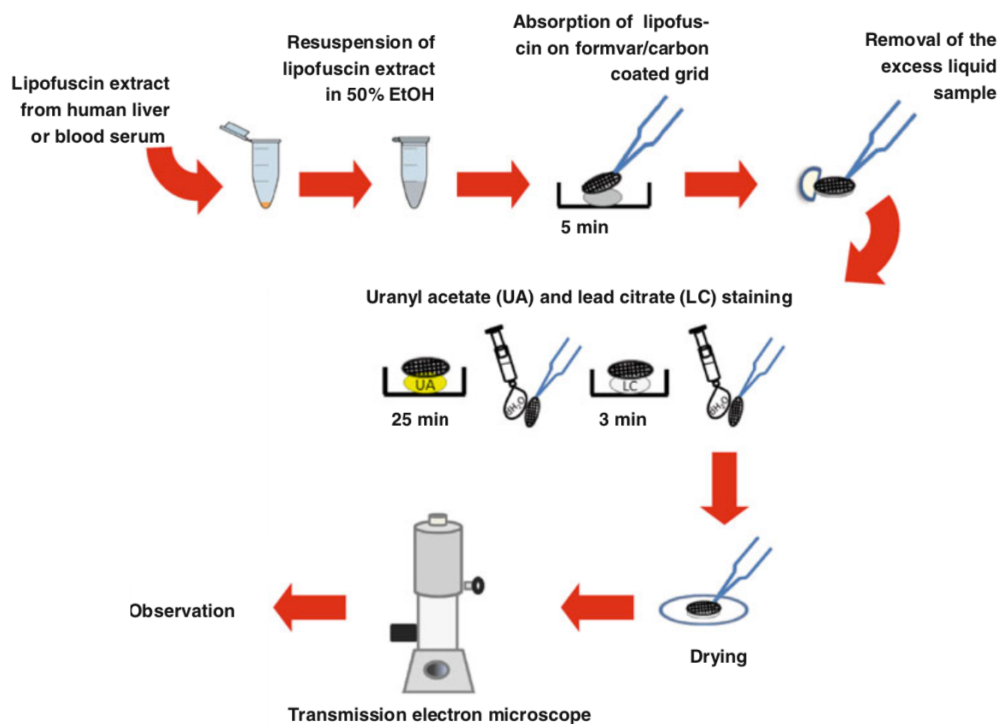
Μέθοδος

Για την παρατήρηση του εκχυλίσματος με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης πραγματοποιήθηκε χρώση στην απομονωμένη λιποφουσκίνη από το βήμα 23 της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.6. Τα βήματα είναι τα ακόλουθα:

- Προσθήκη διαλύματος ΕΤΟΗ 50% (20μl) και επαναδιάλυση.
- Τοποθέτηση μικρού όγκου δείγματος (σταγόνες) 5-10μl πάνω σε φύλλο Parafilm μέσα σε ένα τρυβλίο Petri.
- Πάνω σε κάθε σταγόνα δείγματος τοποθετείται ένα πλέγμα Cu ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με επίστρωση φορμάρ / άνθρακα και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει απορρόφηση του δείγματος.
- Αφαίρεση του επιπλέον δείγματος από κάθε πλέγμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εφαρμόζοντας προσεκτικά το σχισμένο άκρο του χαρτιού φίλτρου Whatman στην άκρη του πλέγματος.
- Τα πλέγματα τοποθετούνται σε φιλτραρισμένες σταγόνες (20-30 μl) οξικού ουρανυλίου 7% (υδατικό διάλυμα) σε ένα φύλλο Parafilm που είναι τοποθετημένο μέσα σε ένα τρυβλίο Petri, ώστε να προστατεύονται από τις σκόνες του περιβάλλοντος. Βαφή για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Τα πλέγματα πλένονται με τρεχούμενο αποσταγμένο νερό και στεγνώνονται σε διηθητικό χαρτί.
- Τα πλέγματα μεταφέρονται σε φιλτραρισμένες σταγόνες (20-30 μl) 0,4% κιτρικού μολύβδου (υδατικό διάλυμα) σε ένα φύλλο Parafilm που είναι τοποθετημένο μέσα σε ένα τρυβλίο Petri. Γύρω από το φύλλο Parafilm στο τρυβλίο Petri τοποθετούνται ταμπλέτες NaOH ή σταγονίδια διαλύματος NaOH 10 N για να δημιουργηθεί αλκαλική ατμόσφαιρα, που θα παρεμποδίσει τη δημιουργία ιζημάτων $PbCO_3$. Κάθε πλέγμα χρωματίζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Γρήγορες πλύσεις (περίπου 2s) των πλεγμάτων με διάλυμα NaOH 0,02 N και στη συνέχεια πλύση με τρεχούμενο αποσταγμένο νερό.
- Τα πλέγματα στεγνώνονται σε διηθητικό χαρτί και αποθηκεύονται σε ένα κουτί

φύλαξης πλεγμάτων.

- Παρατήρηση των δειγμάτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.



Εικόνα 2.3: Διαγραμματική αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή και την παρατήρηση εκχυλίσματος λιποφουσκίνης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Η παρασκευή και θετική χρώση του δείγματος λιποφουσκίνης πραγματοποιήθηκε σε πλέγμα Cu με επίστρωση formvar/άνθρακα. Το πλέγμα με το προσροφημένο δείγμα λιποφουσκίνης παρατηρήθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης που λειτουργεί στα 80 KV και είναι εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα.

2.9 Αντισώματα

Τα αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι εξής:

Πρωτογενή αντισώματα: **anti-biotin [Hyb8]** (1:300, ab201341, Abcam), **53BP1** (1:250, ab21083, Abcam), **γH2AX (Ser139)** (1:1000, #05-636, Millipore), **p53 (DO-7)** (1:100, sc-47698, Santa Cruz), **p21^{WAF1/Cip1}** (F-5) (1/200, sc-6246, Santa Cruz), **p16 (F-12)** (1:100, sc-1661, Santa-Cruz), **Ki-67 (SP6)** (1:200, ab16667, Abcam).

Δευτερογενή αντισώματα: **anti-biotin HRP-linked** (1:2000, #7075, Cell Signaling), **goat anti-rabbit IgG-AP conjugated** (1:800, #G-21079, Invitrogen), **goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488** (1:500, Invitrogen), **goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568** (1:500, Invitrogen), **goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 532** (1:200, Invitrogen)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

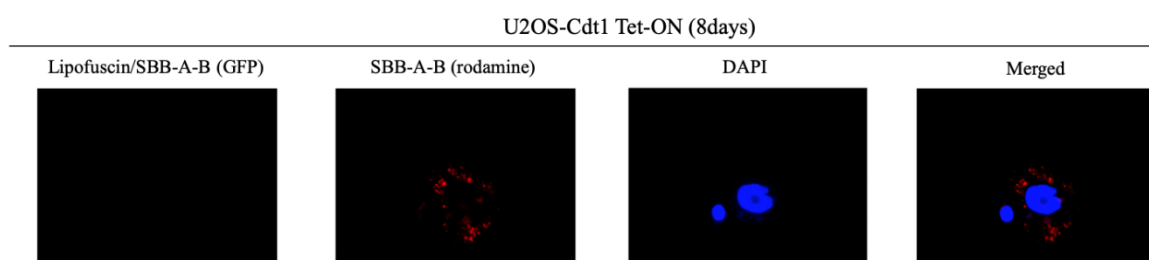
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 *In situ* τεχνικές

3.1.1. Μελέτη του φαινομένου της γήρανσης σε κυτταρικές σειρές με τη χρήση του χημικού αντιδραστήριου GL13.

3.1.1.1 Ανοσοφθορισμός

Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού στην κυτταρική σειρά U2OS Cdt1 Tet-ON (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος). Στα κύτταρα αυτά έγινε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *cdt1* για 8 ημέρες. Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα αυτά υπόκεινται σε κυτταρική γήρανση και σχηματίζουν χαρακτηριστικά κοκκία λιποφουσκίνης. Παράλληλα μελετήθηκε το σήμα αυτοφθορισμού της λιποφουσκίνης σε μήκος κύματος 485nm, για να ελεγχεί η ικανότητα και ειδικότητα πρόσδεσης του αντιδραστήριου στα συσσωματώματα λιποφουσκίνης. Το σήμα του αυτοφθορισμού ήταν αρνητικό, ενδεικνύοντας ότι το αντιδραστήριο GL13 δεσμεύεται ειδικά με τη λιποφουσκίνη καλύπτοντας την ικανότητα αυτοφθορισμού της (Εικόνα 3.1). Ως αρνητικός μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η ίδια κυτταρική σειρά, χωρίς την επαγωγή του γονιδίου (κύτταρα OFF).



Εικόνα 3.1: Ανάλυση ανοσοφθορισμού στην κυτταρική σειρά U2OS Cdt1 Tet -ON, στην οποία έχει γίνει επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης. Στην πρώτη εικόνα φαίνεται το αρνητικό σήμα του αυτοφθορισμού της λιποφουσκίνης στα 485nm, λόγω ειδικής δέσμευσης από το αντιδραστήριο GL13. Στη δεύτερη εικόνα τα κοκκία της λιποφουσκίνης είναι ευδιάκριτα με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική, ενώ στην τρίτη εικόνα φαίνεται ο πυρήνας του κυττάρου με μπλε χαρακτηριστικό χρώμα λόγω της χρώσης DAPI. Τέλος η τέταρτη εικόνα αποτελεί συγχώνευση των προηγούμενων τριών εικόνων.

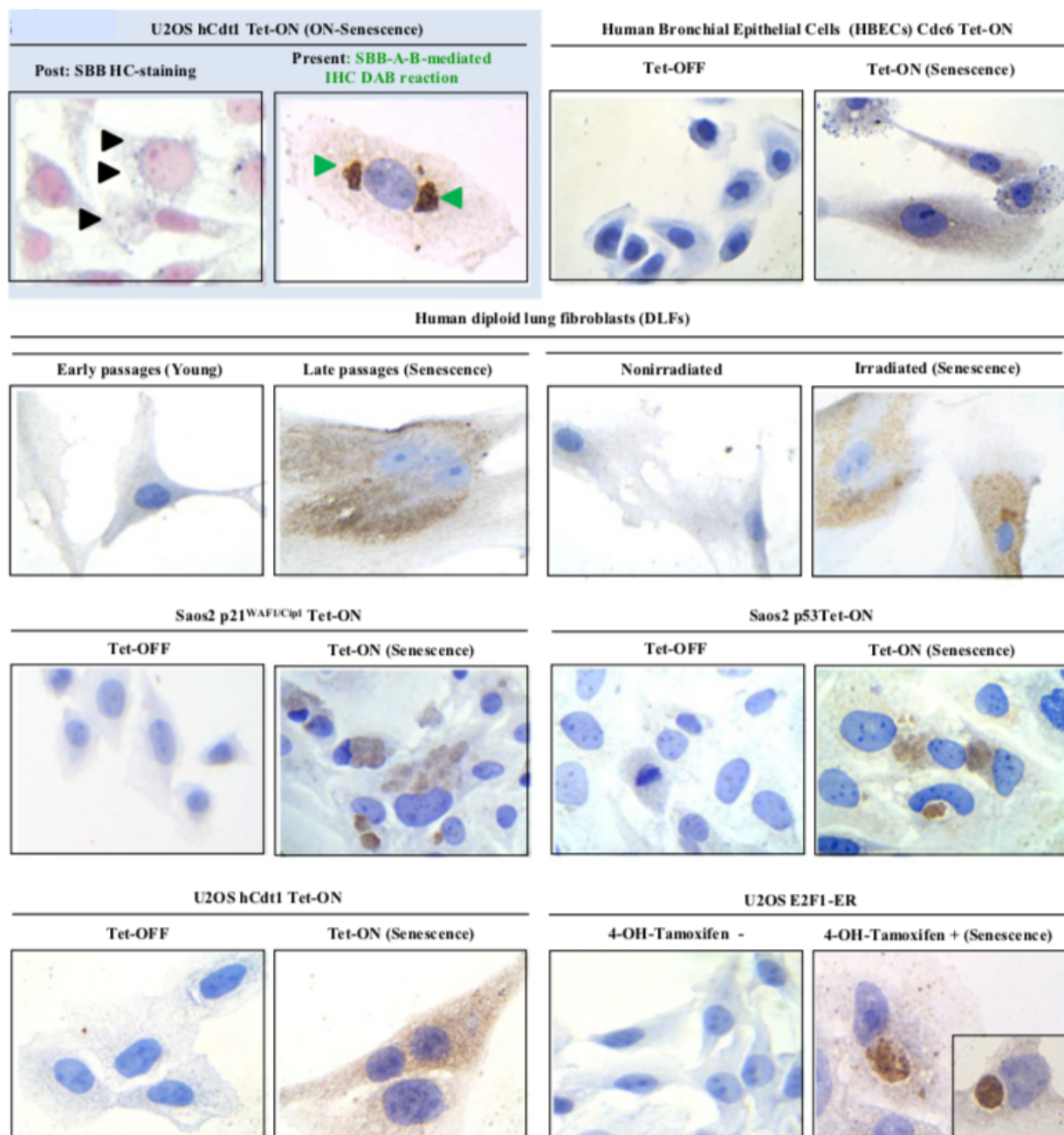
3.1.1.2 Ανοσοκυτταροχημεία

Για να ελεγχθεί η ειδικότητα σύνδεσης του χημικού αντιδραστηρίου GL13 με τη λιποφουσκίνη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές στις οποίες έχει γίνει πρόκληση της γήρανσης μετά από επαγωγή έκφρασης γονιδίου ή χρήση UV ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

- U2OS Cdt1 Tet-ON: ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος, στα οποία έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *Cdt1* για 8 ημέρες (πρώιμη γήρανση).
- U2OS E2F1-ER: ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος, στα οποία έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *E2F1* για 7 ημέρες, χρησιμοποιώντας την χημική ουσία Tamoxifen (πρώιμη γήρανση).
- HBEC Cdc6 Tet-ON: ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα στα οποία έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *Cdc6* για 5 ημέρες (πρώιμη γήρανση) (Komseli *et al.*, 2018).
- DLFs: ανθρώπινα κύτταρα-ινοβλάστες απομονωμένα από πνεύμονα, τα οποία έχουν εκτεθεί σε UVB ακτινοβολία (πρώιμη γήρανση) ή έχουν ολοκληρώσει μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (αναδιπλασιαστική γήρανση).
- Saos p21 Tet-ON και Saos p53 Tet-ON: ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος, στα οποία πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *p21^{WAF1/Cip1}* και *p53* αντίστοιχα για 8 ημέρες (πρώιμη γήρανση) (Galanos *et al.*, 2016).

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες σειρές στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή γονιδίου (στις U2OS Cdt1 Tet-ON, U2OS E2F1-ER, HBEC Cdc6 Tet-ON, Saos p21 Tet-ON και Saos p53 Tet-ON) ή χρήση UV ακτινοβολίας (για την κυτταρική σειρά DLFs)) και αποκαλούνται κύτταρα OFF. Ειδικότερα, για την κυτταρική σειρά DLFs χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα με μικρό αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Γνωρίζουμε ότι μετά από συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων το μήκος των τελομερών φθίνει λόγω μειωμένης δραστηριότητας της τελομεράσης και προκαλείται το φαινόμενο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης (Hayflick, 1965). Με την παρατήρηση των δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι η λιποφουσκίνη εμφανίζει δύο

διαφορετικά μοτίβα, είτε ως συσσωμάτωμα σφαιρικού σχήματος ή διάχυτη στο κυτταρόπλασμα γύρω από τον πυρήνα (Εικόνα 3.2). Επιπλέον, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2, σε όλες τις κυτταρικές σειρές παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες δεν είναι γηρασμένα, δεν συσσωρεύουν λιποφουσκίνη και είναι αρνητικά για την ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντιδραστήριο GL13.

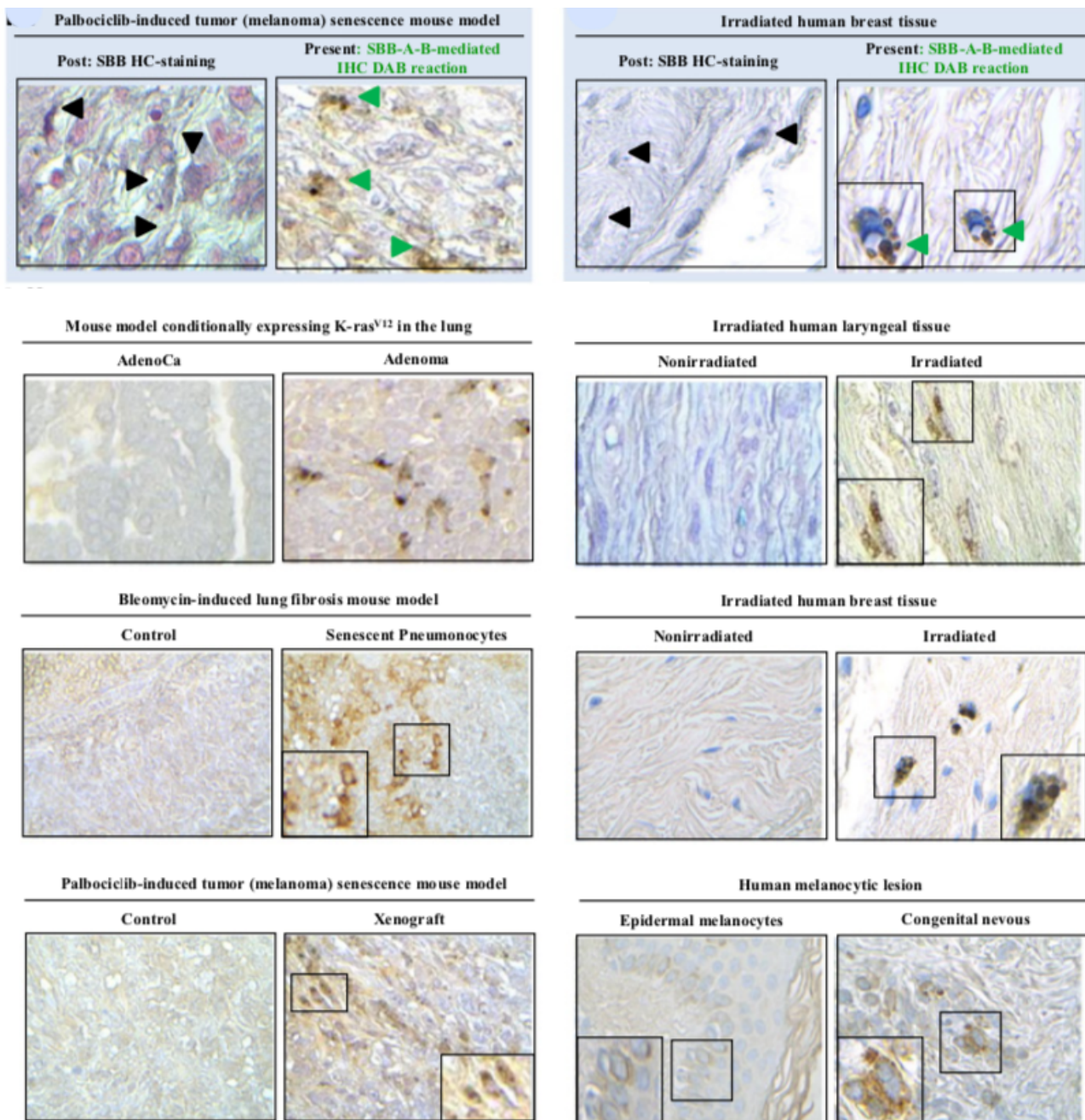


Εικόνα 3.2: Ανίχνευση των γηρασμένων κυττάρων σε κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: U2OS Cdt1 Tet-ON και Tet-OFF, HBEC Cdc6 Tet-ON και Tet-OFF, DLFs, Saos p21 Tet-ON και Tet-OFF, καθώς και Saos p53 Tet-ON και Tet-OFF. Στα Tet-OFF κύτταρα δεν έχει γίνει επαγωγή έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου. Με την τεχνική της ανοσοκυταροχημείας η σύνδεση του αντιδραστηρίου GL13-λιποφουσκίνης οπτικοποιήθηκε δίνοντας κυτταροπλασματικό καφέ χρώμα. Οι πυρήνες των κυττάρων έχουν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα λόγω χρώσης με αιματοξυλίνη.

3.1.1.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη του φαινομένου της γήρανσης

Με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας ελέγχθηκε η ευαισθησία και η ειδικότητα του αντιδραστήριου GL13 να εντοπίζει τη λιποφουσκίνη, και επομένως τα γηρασμένα κύτταρα, σε ανθρώπινα δείγματα ιστών, καθώς και σε ιστούς από ποντίκι. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δείγματα:

- Ζωικό μοντέλο με ξενομόσχευμα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μελανώματος, στο οποίο χορηγήθηκε το χημειοθεραπευτικό φάρμακο Palbociclib. Το συγκεκριμένο φάρμακο αποτελεί αναστολέα των κυκλινο-εξαρτόμενων κινασών CDK4/6 (Llanos *et al.*, 2019). Διαπιστώθηκε πως υπάρχουν γηρασμένα μελανοκύτταρα μέσα στο ξενομόσχευμα.
- Ιστός πνεύμονα από ζωικό μοντέλο στο οποίο έχει γίνει χορήγηση του αντιβιοτικού Bleomycin που δρα ως αντικαρκινικός παράγοντας αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA (Muñoz-Espín *et al.*, 2018). Με τη χορήγηση του φαρμάκου παρατηρήθηκε ίνωση και αύξηση των γηρασμένων κυττάρων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.
- Ιστός πνεύμονα από ζωικό μοντέλο όπου έχει γίνει επαγωγή τοπικά του ογκογονιδίου K-rasV12 (Collado *et al.*, 2005). Παρατηρήθηκε αύξηση των γηρασμένων κυττάρων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.
- Ανθρώπινη βιοψία μαστού, μετά από ακτινοθεραπεία. Μετά τη χρώση με το αντιδραστήριο GL13 εντοπίστηκαν γηρασμένοι ινοβλάστες στον συνδετικό ιστό του δείγματος.
- Ανθρώπινη βιοψία λάρυγγα, μετά από ακτινοθεραπεία. Μετά τη χρώση με το αντιδραστήριο GL13, το φαινόμενο της γήρανσης παρατηρήθηκε σε κύτταρα του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού.
- Ανθρώπινη βιοψία μελανώματος δέρματος. Στο συγκεκριμένο δείγμα εντοπίστηκαν γηρασμένα κύτταρα στην περιοχή του συγγενή σπίλου, ενώ δεν παρατηρήθηκαν κατά μήκος της επιδερμίδας (Εικόνα 3.3).

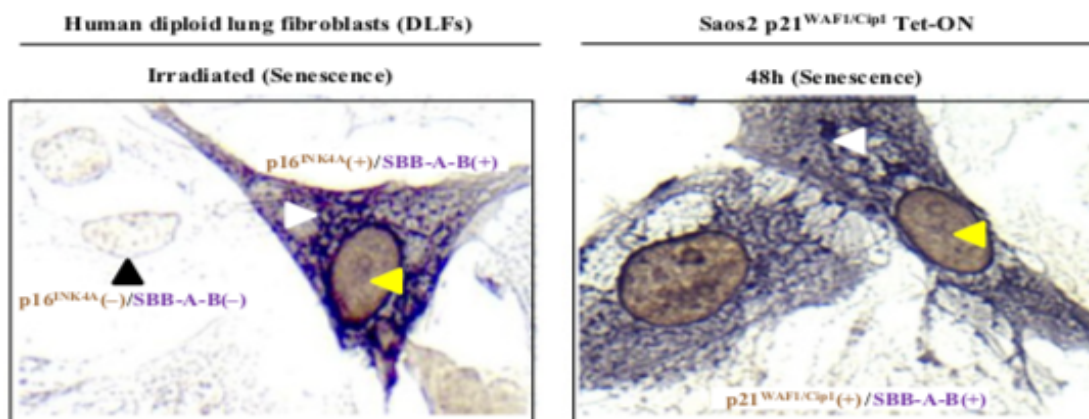


Εικόνα 3.3: Ανίχνευση των γηρασμένων κυττάρων σε ιστούς, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13 με ανοσοϊστοχημική τεχνική. Ως δείγματα έχουν χρησιμοποιηθεί ανθρώπινες βιοψίες και ζωικά μοντέλα. Η αντίδραση από τον υβριδικό ιστο- / ανοσοχημικό προσδιορισμό παρήγαγε ένα ευκρινές καφέ αδιάλυτο προϊόν που θυμίζει τυπικές ανοσοϊστοχημικές αντιδράσεις με βάση αντισώματα. Στις εικόνες φαίνονται με έντονη καφέ κυτταροπλασματική χρώση τα κοκκία της λιποφουσκίνης. Η ανίχνευση του σήματος μπορεί να γίνει εύκολα και με ακρίβεια γιατί το αντιδραστήριο GL13 είναι συζευγμένο με ένα μόριο βιοτίνης. Τα κυτταρικά συστήματα και τα δείγματα ιστών που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί

μάρτυρες (φυσιολογικά ή νεοπλασματικά), απουσία γηρασμένων κυττάρων, ήταν εντελώς αρνητικά στη διαδικασία της χρώσης, επαληθεύοντας την ειδικότητα της μεθόδου.

3.1.1.4 Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13

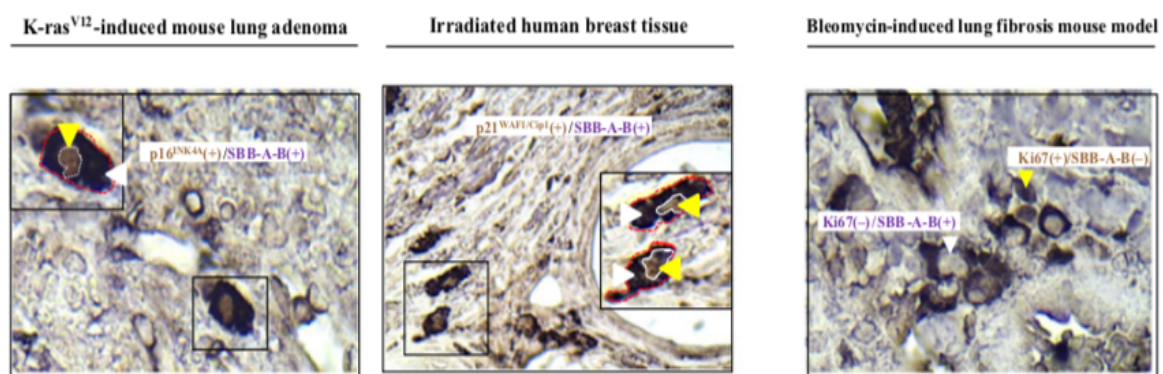
Για τον εντοπισμό ταυτόχρονα της έκφρασης των παραγόντων $p16^{INK4A}$ και $p21^{WAF1/Cip1}$ με το αντιδραστήριο GL13 πραγματοποιήθηκε διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση στις κυτταρικές σειρές DLFs και Saos $p21^{WAF1/Cip1}$ Tet-ON. Στα κύτταρα της σειράς DLF η επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας UVB ακτινοβολία. Αντίστοιχα στην κυτταρική σειρά Saos $p21^{WAF1/Cip1}$ Tet-ON επιτυγχάνεται με την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου $p21^{WAF1/Cip1}$ για 48 ώρες. Στα κύτταρα παρατηρήθηκε συνεντοπισμός των παραγόντων $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1/Cip1}$ και της λιποφουσκίνης. Ειδικότερα, σε κύτταρα αρνητικά για τους συγκεκριμένους παράγοντες δεν εμφανίζονται κοκκία λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.4.1).



Εικόνα 3.4.1: Εντοπισμός της έκφρασης των παραγόντων $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1/Cip1}$ και Ki-67 σε κυτταρικές σειρές. Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές DLFs και Saos $p21^{WAF1/Cip1}$ Tet-ON. Στον πυρήνα των κυττάρων εντοπίζεται η έκφραση των παραγόντων $p16^{INK4A}$ και $p21^{WAF1/Cip1}$ (καφέ χρώμα), ενώ στο κυτταρόπλασμα τα κοκκία της λιποφουσκίνης στα γηρασμένα κύτταρα (μωβ χρώμα). Το βέλος

με λευκό χρώμα δείχνει τα κοκκία της λιποφουσκίνης, ενώ το κίτρινο την έκφραση των παραγόντων στον πυρήνα.

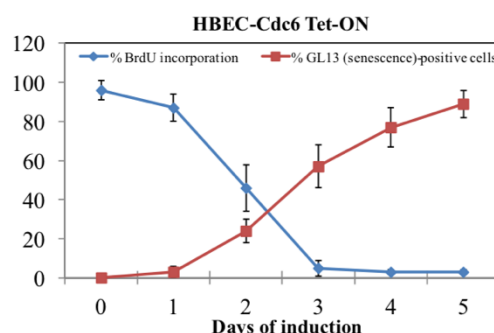
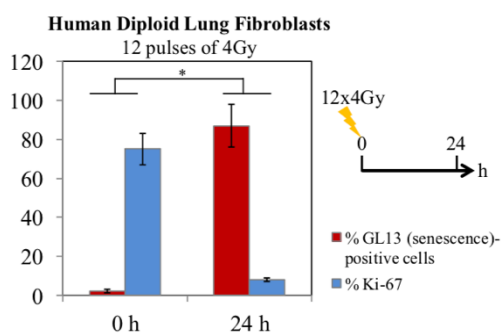
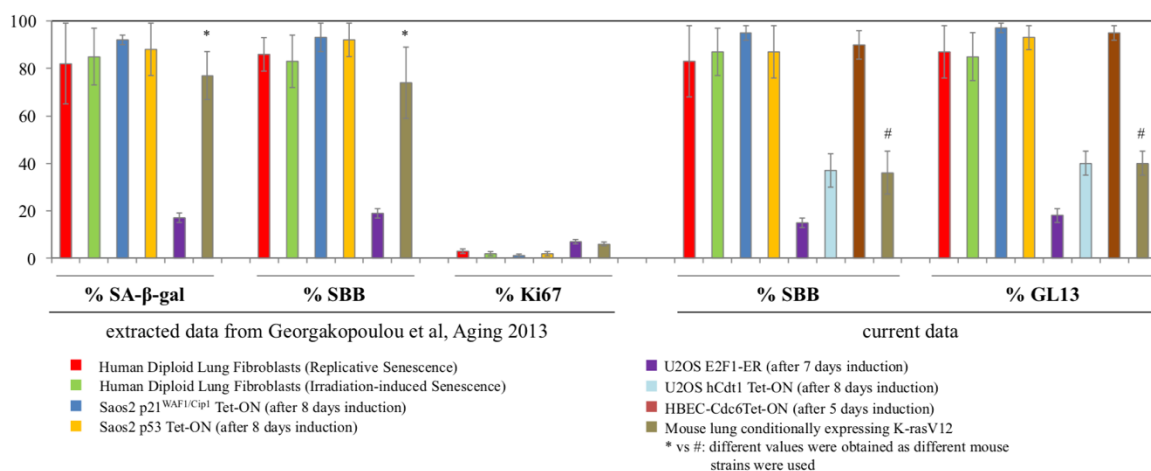
Παράλληλα, η ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1/Cip1}$ και Ki-67 με το αντιδραστήριο GL13 μελετήθηκε σε δείγματα ιστών. Οι ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι πνεύμονας από ζωικό μοντέλο όπου έχει γίνει επαγωγή τοπικά του ογκογονιδίου *K-rasV12*, ανθρώπινη βιοψία μαστού (μετά από ακτινοθεραπεία) και πνεύμονας από ζωικό μοντέλο στο οποίο έχει γίνει χορήγηση του αντιβιοτικού Bleomycin. Διαπιστώθηκε συνεντοπισμός της έκφρασης των παραγόντων $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1/Cip1}$ και της λιποφουσκίνης, ενώ στα κύτταρα τα οποία είναι θετικά για τον παράγοντα Ki-67 δεν υπάρχουν κοκκία λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.4.2).



Εικόνα 3.4.2: Εντοπισμός της έκφρασης των παραγόντων $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1/Cip1}$ και Ki-67 σε δείγματα ιστών. Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστών με επαγόμενη κυτταρική γήρανση. Στον πυρήνα των κυττάρων εντοπίζεται η έκφραση των παραγόντων $p16^{INK4A}$, $p21^{WAF1/Cip1}$ και Ki-67 (καφέ χρώμα), ενώ στο κυτταρόπλασμα τα κοκκία της λιποφουσκίνης των γηρασμένων κυττάρων (μωβ χρώμα). Τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Ki-67 -και επομένως έχουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό- δεν έχουν κοκκία λιποφουσκίνης και δεν είναι γηρασμένα. Το βέλος με λευκό χρώμα δείχνει τα κοκκία της λιποφουσκίνης, ενώ το κίτρινο την έκφραση των παραγόντων στον πυρήνα.

3.1.1.5 Σύγκριση του χημικού αντιδραστηρίου GL13 με το αντιδραστήριο SBB και τη χρώση SA-β-gal.

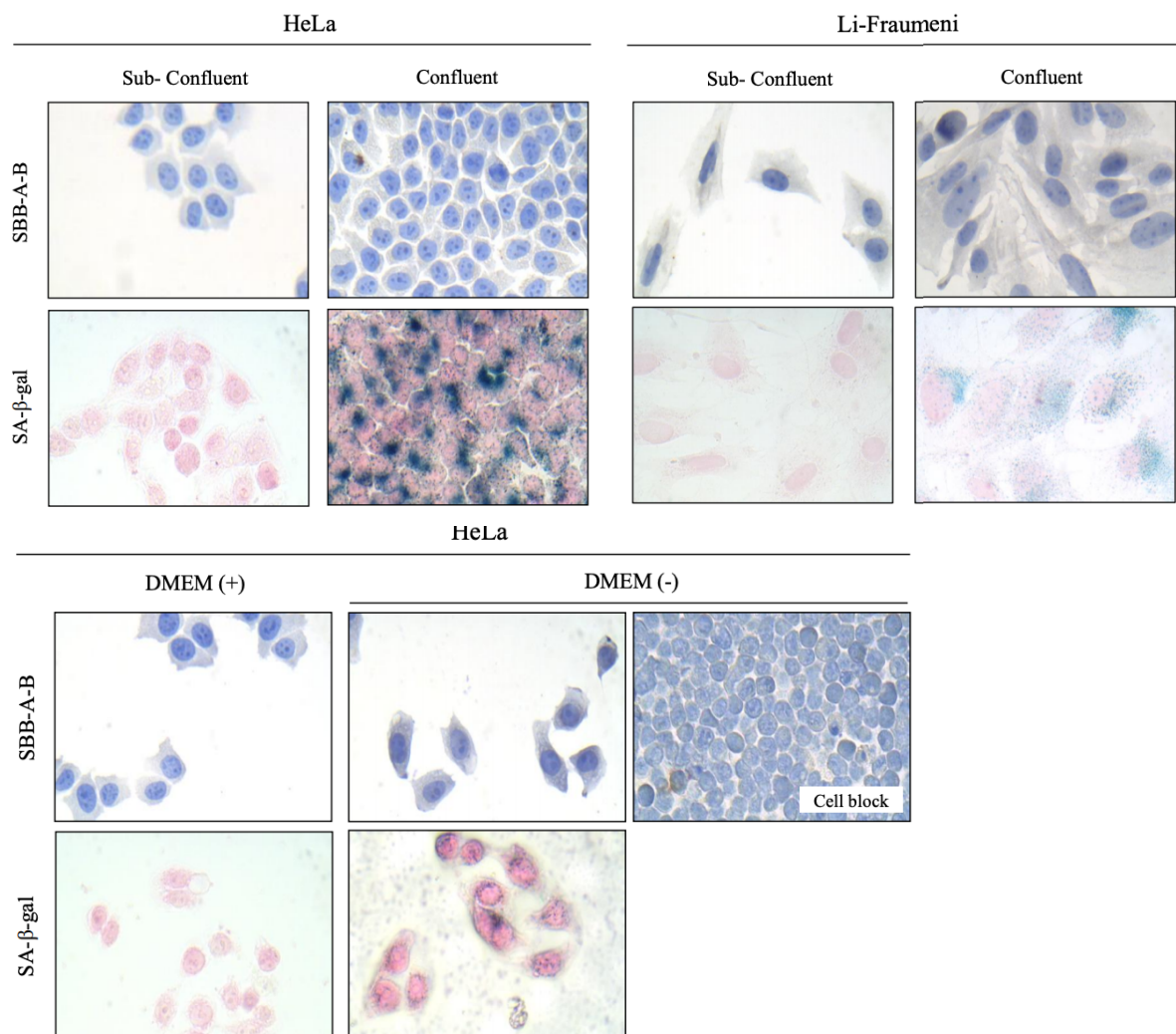
Ποσοτική εκτίμηση δεδομένων από προηγούμενη δημοσίευση (Georgakopoulou *et al.*, 2013) σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της τρέχουσας ανάλυσης στις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα ιστού (Παράγραφος 3.1.1.2, 3.1.1.3), έδειξε κοινό πρότυπο έκφρασης μεταξύ της χρώσης SA-b-gal και των αντιδραστηρίων SBB και GL13 σε μια σειρά βιολογικών υλικών, παρουσία του φαινομένου της γήρανσης. Από τα δείγματα των ιστών, στη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ιστός πνεύμονα από ζωικό μοντέλο όπου έχει γίνει επαγωγή τοπικά της έκφρασης του ογκογονιδίου *K-rasV12* (Collado *et al.*, 2005). Σε σειριακές τομές παραφίνης αυτού του δείγματος, όπως και στις κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα τα οποία ήταν θετικά για τη χρώση SBB, παρουσίαζαν θετικότητα και για τη χρώση GL13. Επίσης, καθιερώθηκε μια σαφής αντίστροφη σχέση με τους δείκτες πολλαπλασιασμού (Ki-67, BrdU). Αυτό συμβαίνει καθώς τα κύτταρα τα οποία έχουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό δεν μπορούν ταυτόχρονα να υπόκεινται σε γήρανση, αφού η τελευταία χαρακτηρίζεται εξ ορισμού από διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 : Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων από τις χρώσεις σε βιολογικά συστήματα παρουσία του φαινομένου της γήρανσης. Παρατηρήθηκε αντιστοιχία της ειδικότητας μεταξύ της χρώσης SA-β-gal και των χημικών αντιδραστηρίων SBB και GL13. Αντίστροφη σχέση της χρώσης με το GL13 και δεικτών πολλαπλασιασμού (ενσωμάτωση Ki67 και BrdU) απεικονίζεται σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες πνευμόνων (DLFs) και ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (HBEC-Cdc6 Tet-ON) σε συνθήκες επαγωγής ή μη της γήρανσης.

Η βιοτινυλιωμένη ένωση του αντιδραστηρίου GL13 δοκιμάστηκε σε διάφορα βιολογικά δείγματα ελέγχου και η απόδοση της χρώσης συγκρίθηκε με εκείνη του εμπορικού διαθέσιμου SSB. Χρησιμοποιώντας τις κυτταρικές σειρές HeLa και Li-Fraumeni η ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντιδραστήριο GL13 συγκρίθηκε με τη χρώση του SA-b-gal. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι η χρώση το GL13 δεν παρουσιάζει ψευδώς θετικά

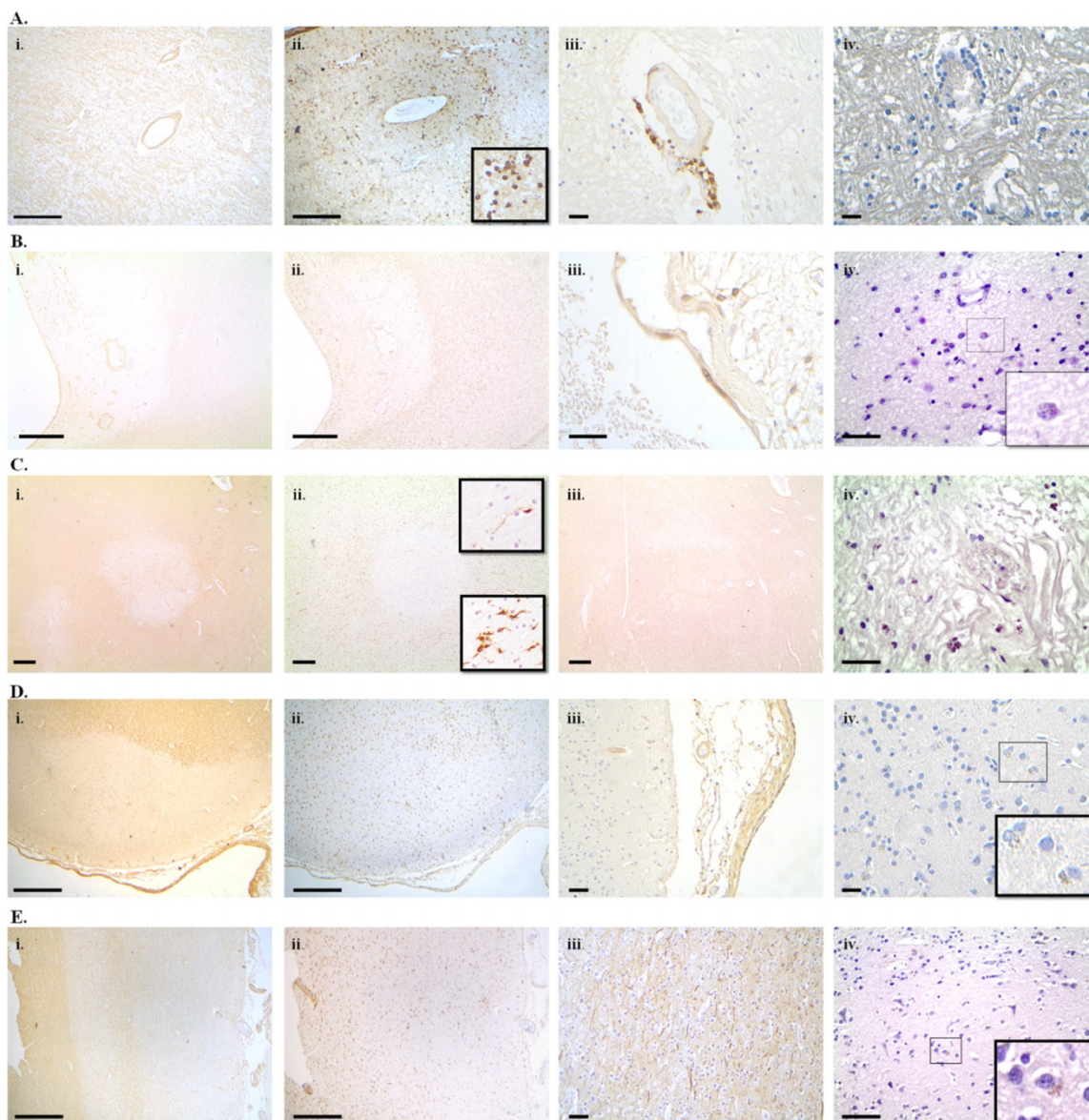
και αρνητικά αποτελέσματα σε σχέση με τη χρώση SA-β-gal. Οι συνθήκες που εξετάστηκαν είναι συσσώρευση/συρροή κυττάρων και απουσίας ορού από το θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Ειδικότερα η έλλειψη ορού από το θρεπτικό υλικό αναφέρεται στην προσομοίωση συνθηκών ασιτίας, ενώ με τον μεγάλο αριθμό των κυττάρων προκύπτει έλλειψη χώρου ανάπτυξης (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Χρώσεις με SA-β-gal και το αντιδραστήριο GL13 στις κυτταρικές σειρές HeLa και Li-Fraumeni. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν είναι η συσσώρευση κυττάρων και η απουσία ορού στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, όπου το ποσοτό των γηρασμένων κυττάρων είναι ελάχιστο. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντιδραστήριο GL13 δεν έδωσε ψευδώς θετικά αποτελέσματα συγκριτικά με τη χρώση SA-β-gal.

3.2. Μελέτη του φαινομένου της γήρανσης και άλλων παραγόντων σε δείγματα εγκεφάλου με τη νόσο Σκλήρυνση κατά πλάκας.

Σε ζωικό μοντέλο μελέτης της Σκλήρυνσης κατά πλάκας, η απομυελίνωση προκαλείται με τη χρήση του τοξικού παράγοντα cuprizone. Σε αυτό το μοντέλο, το φαινόμενο της γήρανσης έχει ήδη μελετηθεί χρησιμοποιώντας τη χρώση SA-β-gal και έχουν εντοπιστεί γηρασμένα κύτταρα στην περιοχή του χρόνια απομυελινωμένου μεσολόβιου (Karamita *et al.*, 2018). Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε με χρώση με το αντιδραστήριο GL13 σε δείγματα από ανθρώπινο νεκροψικό υλικό, ανιχνεύοντας τη λιποφουσκίνη σε γλοιακά κύτταρα σε περιοχές αλλοιώσεων οξείας ενεργής και χρόνιας ενεργής απομυελίνωσης. Ο αριθμός των γηρασμένων κυττάρων είναι μικρότερος σε χρόνιες ανενεργές απομυελινωμένες βλάβες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η απομυελίνωση του φλοιού του εγκεφάλου είναι κοινή και εκτεταμένη, ιδιαίτερα στα προοδευτικά στάδια της Σκλήρυνσης κατά πλάκας (Bø *et al.*, 2003). Η χρώση με το αντιδραστήριο GL13 σε περιοχές του φλοιού με απομυελινωμένες βλάβες και με φυσιολογική δομή ανίχνευσε κοκκώδεις εναποθέσεις λιποφουσκίνης σε πολυάριθμους νευρώνες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των γηρασμένων κυττάρων και της έκτασης της απομυελίνωσης, υποδεικνύοντας μια σχέση μεταξύ της χρόνιας απομυελίνωσης και της γήρανσης.



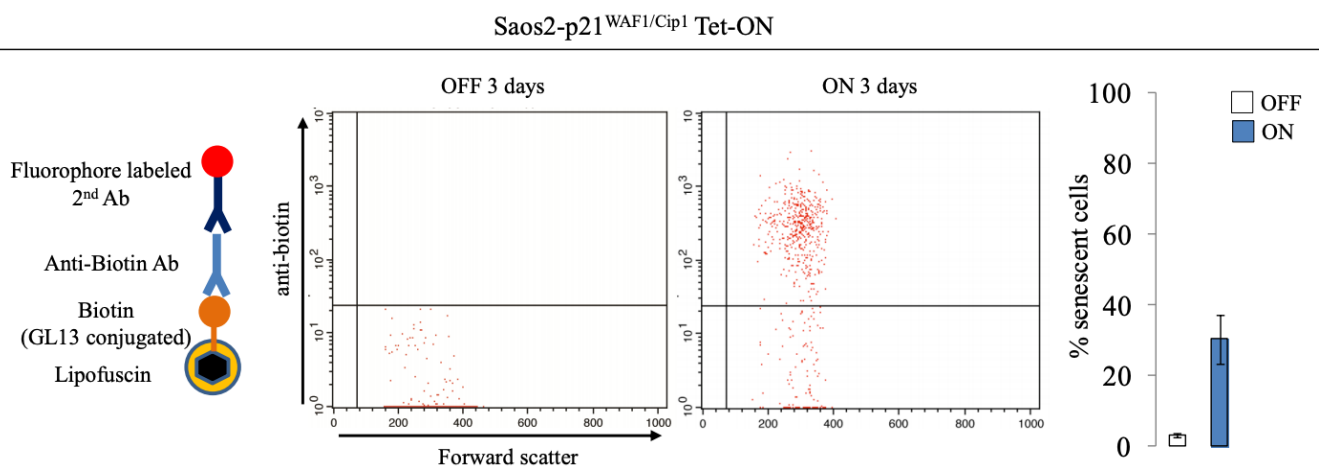
Εικόνα 3.7: Η συσσώρευση της λιποφουσκίνης ως δείκτης της κυτταρικής γήρανσης σε δείγματα ανθρώπινων ιστών εγκεφάλου με σκλήρυνση κατά πλάκας. Οι απομυελινωμένες αλλοιώσεις ταυτοποιήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της βασικής πρωτεΐνης μυελίνης (MBP) και ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες με κατάλληλο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης HLA-DR σε σειριακές τομές παραφίνης. Οι κατηγορίες αυτές είναι οξεία ενεργή, χρόνια ενεργή και χρόνια ανενεργή απομυελίνωση (Trapp *et al.*, 1998). Στην κατηγορία (iv) εντοπίζουμε την ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντιδραστήριο GL13. Ειδικότερα, στα θετικά-γηρασμένα κύτταρα, στις εικόνες D (iv) και E(iv), εντοπίζονται κυτταροπλασματικά κοκκία λιποφουσκίνης με χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Διαπιστώθηκαν αυξημένα ποσοστά γηρασμένων νευρώνων στην περιοχές με απομυελίνωση και ειδικότερα στις περιπτώσεις όπου πρόκειται για χρόνια απομυελίνωση.

Στην κατηγορία (i) οι εικόνες αποτελούν ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης MBP, ενώ η κατηγορία (ii) δείχνει τα HLA-DR⁺ μακροφάγα σε κάθε δείγμα. Τέλος, οι εικόνες της κατηγορίας (iii) δείχνουν τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα.

Γραμμή κλίμακας: **A(i),A(ii),B(i),B(ii),C(i),C(ii),C(iii),D(i),D(ii),E(i),E(ii)**, 50 μ m **D(iii),E(iii)** ή 25 μ m **(A(iii),A(iv), B(iii), B(iv), C(iv), D(iv), E(iv))**.

3.3 Κυτταρομετρία ροής με το χημικό αντιδραστήριο GL13

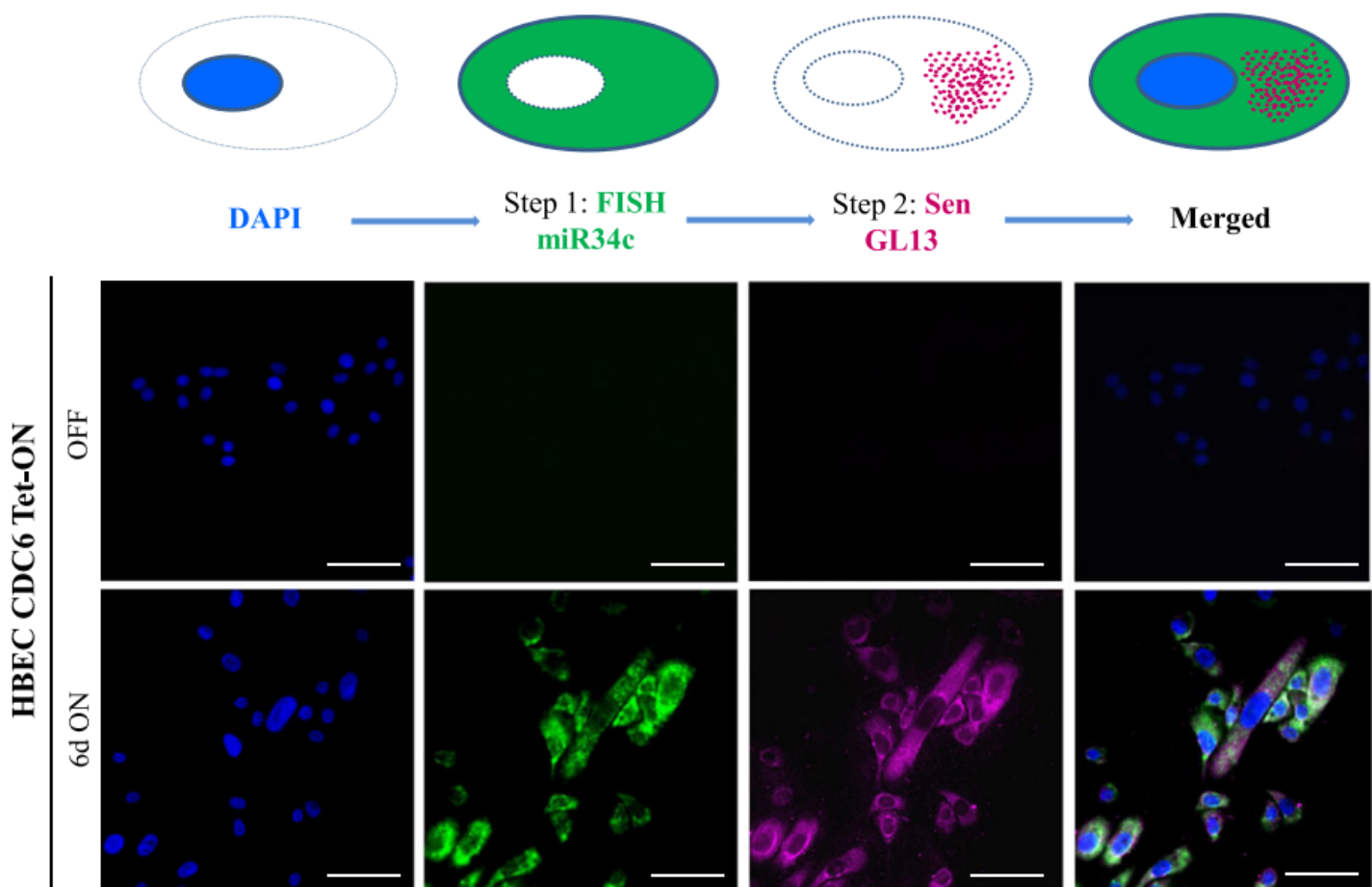
Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική Saos p21^{WAF1/Cip1}. Η ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου p21^{WAF1/Cip1} έγινε για 3 ημέρες ώστε να γίνει επαγωγή της γήρανσης (Galanos et al., 2016) και ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει ενεργοποίηση του γονιδίου (κύτταρα OFF). Στη μέθοδο της κυτταρομετρίας έχει προστεθεί το βήμα χρώσης με το χημικό αντιδραστήριο GL13 για τον εντοπισμό των γηρασμένων κυττάρων του πληθυσμού. Πράγματι, στα κύτταρα Saos p21^{WAF1/Cip1} μετά από επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου για 3 μέρες, ο πληθυσμός των γηρασμένων κυττάρων ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν στα κύτταρα OFF, όπως βρέθηκε με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8: Αποτελέσματα από το πείραμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής σε συνδυασμό με το αντιδραστήριο GL13. Με την κυτταρομετρία ροής εντοπίστηκε αυξημένος αριθμός γηρασμένων κυττάρων στα κύτταρα Saos p21^{WAF1/Cip1} Tet-ON για 3 μέρες σε σχέση με τα κύτταρα OFF.

3.4 Μελέτη της έκφρασης του miR34c σε γηρασμένα κύτταρα.

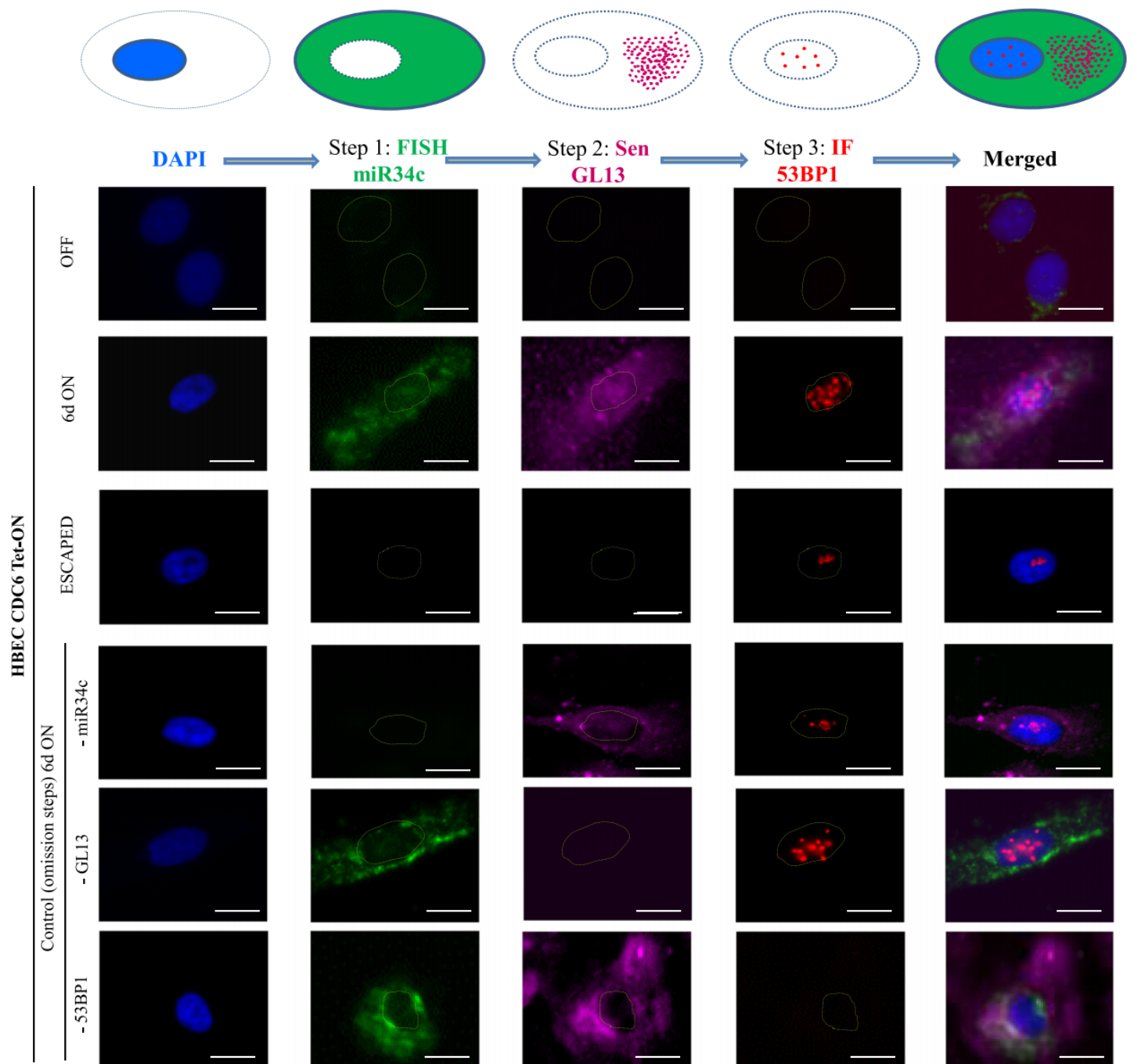
Το φαινόμενο της γήρανσης αποτελεί θεμελιώδης βιολογική διαδικασία που εμπλέκεται σε διάφορες παθολογίες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Όσον αφορά την καρκινογένεση, η γήρανση σημαίνει, τουλάχιστον στις αρχικές της φάσεις, μια αντικαρκινική απόκριση που παρακάμπτεται κατά την πρόοδο του καρκίνου. Τα micro-RNAs, αποτελούν μια υποκατηγορία ρυθμιστικών RNAs, που συμμετέχουν στη ρύθμιση του φαινομένου της γήρανσης. Με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία παρακάμπτονται τεχνικοί περιορισμοί, επιτυγχάνοντας για πρώτη φορά ταυτόχρονη ανίχνευση τόσο ενός micro-RNA όσο και της πρωτεΐνης 53BP1 στο βιολογικό πλαίσιο της κυτταρικής γήρανσης, αξιοποιώντας το χημικό αντιδραστήριο GL13. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε έναν πρωτότυπο ανθρώπινο μη κακοήγη επιθηλιακό μοντέλο γήρανσης, στο οποίο η γήρανση προκαλείται από ογκογονίδιο και δημιουργήθηκε για τους σκοπούς της μελέτης. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι η HBEC (Human bronchial epithelial cells), στην οποία πραγματοποιείται επαγωγή του γονιδίου *Cdc6* (Komseli *et al.*, 2018). Για την *in situ* ταυτόχρονη ανίχνευση ακολουθήσαμε μια διαδικασία ανοσοφθορισμού τριών σταδίων: i) Υβριδοποίηση *in situ* φθορισμού (FISH) για το miR34c, ακολουθούμενη από ii) χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13 για να εντοπίσουμε τα γηρασμένα κύτταρα, και τέλος iii) ανίχνευση εστιών της πρωτεΐνης 53BP1 στον πυρήνα των κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του miR34a στο κυτταρόπλασμα, καθώς και οι εστίες της πρωτεΐνης 53PB1 στον πυρήνα είναι αισθητά αυξημένα στα γηρασμένα κύτταρα, σε σχέση με τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες (Εικόνα 3.9 και 3.10).



Εικόνα 3.9: *In situ* ανίχνευση του miR34c σε γηρασμένα HBEC Cdc6 Tet-ON κύτταρα.

Διπλή χρώση πραγματοποιήθηκε σε δύο διαδοχικές καταστάσεις: στην κατάσταση OFF όπου ο πολλαπλασιασμός των HBEC είναι εμφανής ("OFF") και 6 ημέρες μετά την επαγωγή της έκφρασης του *Cdc6* όπου τα κύτταρα υπόκεινται στο φαινόμενο της γήρανσης ("6D ON").

Βήμα 1: Φθορισμός με *in situ* υβριδοποίηση του miR34c χρησιμοποιώντας ανιχνευτή LNA διπλής σήμανσης με το μόριο DIG. Η έκφραση του συγκεκριμένου miR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα με πράσινο χρώμα (εκπομπή στα 518 nm). **Βήμα 2:** Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13, το οποίο απεικονίζεται στο κυτταρόπλασμα με μωβ χρώμα, χρησιμοποιώντας δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor (647 nm). , ενώ με μπλε χαρακτηριστικό χρώμα ο πυρήνας του κυττάρου λόγω του της φθορίζουσας χρωστικής DAPI. Γραμμή κλίμακας: 50 μ m



Εικόνα 3.10: Ταυτόχρονη *in situ* μελέτη την έκφραση του miR34c και πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της γήρανσης που προκαλείται από την ενεργοποίηση ογκογονιδίου (**oncogene-induced senescence-OIS**). Διαπιστώθηκε συνεντοπισμός του miR34c και της πρωτεΐνης 53BP1 σε γηρασμένα κύτταρα, χρησιμοποιώντας το σύστημα HBEC Cdc6 Tet-ON. Πραγματοποιήθηκε πολλαπλή χρώση σε τρεις διαδοχικές καταστάσεις: στην κατάσταση "OFF" (μη επαγωγή του γονιδίου *Cdc6*) όπου είναι εμφανής ο πολλαπλασιασμός των HBECs ("OFF"), 6 ημέρες μετά την επαγωγή του *Cdc6* όταν τα κύτταρα είναι γηρασμένα ("6d ON") και στην κατάσταση "απόδραση από τη γήρανση" που ονομάζεται "ESCAPED". **Βήμα 1:**

Φθορισμός με *in situ* υβριδοποίηση του miR34c χρησιμοποιώντας ανιχνευτή LNA διπλής σήμανσης με το μόριο DIG. Η έκφραση του συγκεκριμένου miR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα με πράσινο χρώμα (εκπομπή στα 518 nm). **Βήμα 2:** Χρώση με το χημικό αντιδραστήριο GL13, το οποίο απεικονίζεται στο κυτταρόπλασμα με μωβ χρώμα, χρησιμοποιώντας δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor (647 nm) (εκπομπή στα 668 nm). **Βήμα 3:** Ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης 53BP1, που απεικονίζεται ως κόκκινες εστίες στον πυρήνα, χρησιμοποιώντας δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor (568 nm) (εκπομπή στα 618 nm). Η ειδικότητα κάθε μεμονωμένου ανιχνευτή/αντισώματος δοκιμάστηκε παραλείποντας διαδοχικά τα ακόλουθα αντιδραστήρια: ανιχνευτής miR34c, αντιδραστήριο GL13 και πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης 53BP1 σε γηρασμένα κύτταρα (6d ON). Γραμμή κλίμακας: 20 μ m

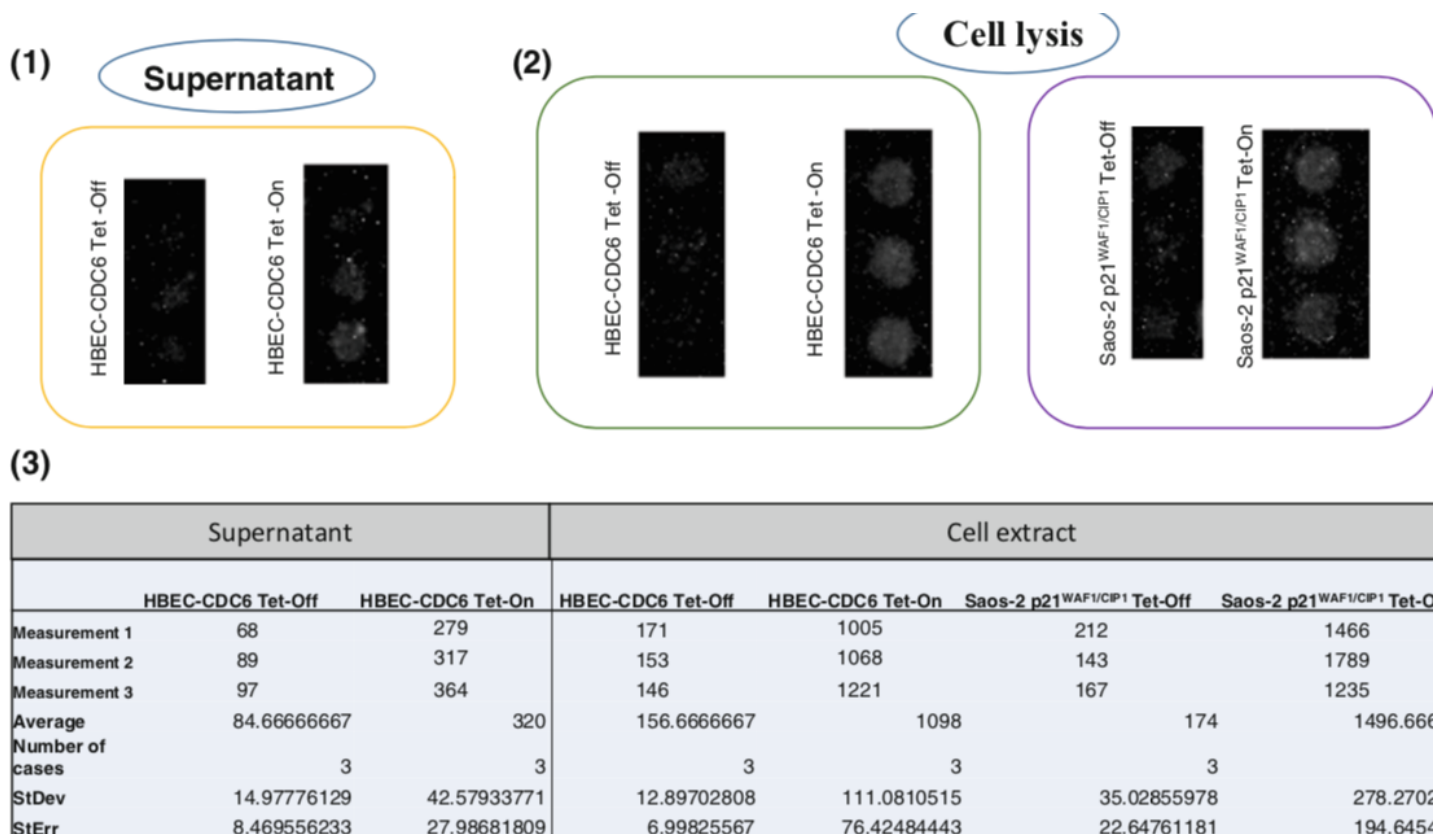
3.5 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε βιολογικά δείγματα

Βασική ιδέα αυτών των πειραμάτων είναι να ερευνήσουμε αν τα επίπεδα της ελεύθερης λιποφουσκίνης σε βιολογικά υγρά, ιστούς και εκχύλισμα κυττάρων διαφοροποιούνται ανάλογα με την ηλικία και σε τι ποσοστό, καθώς επίσης, αν αλλάζουν σε κάποιες ασθένειες, αποτελώντας, ίσως, μελλοντικό προγνωστικό δείκτη.

3.5.1 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε κύτταρα

Με βάση την εξαιρετική εξειδίκευση του αντιδραστηρίου GL13, σχεδιάσαμε ένα γρήγορο, πολύ εξειδικευμένο και ακριβές πρωτόκολλο για την ανίχνευση και τη μέτρηση των επιπέδων της διαλυτής λιποφουσκίνης σε υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας και εκχύλισμα κυττάρων. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HBEC Cdc6 Tet-ON και τα αντίστοιχα κύτταρα OFF (όπου δεν έχει γίνει επαγωγή έκφρασης του γονιδίου) και πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις σε κάθε συνθήκη. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της λιποφουσκίνης είναι 8 φορές μεγαλύτερα στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα OFF) κάθε κυτταρικής σειράς. Όσον αφορά τη μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης στο υπερκείμενο των κυττάρων, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα γηρασμένα κύτταρα τα

επίπεδα είναι 4 φορές υψηλότερα σε σχέση με τα μη γηρασμένα (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Ανίχνευση απομονωμένης λιποφουσκίνης με το αντιδραστήριο GL13 και τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας από υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας και κυτταρική λύση. (1) Εικόνες που δείχνουν ένταση φωτός χημειοφωταύγειας από υπερκείμενο των κυτταρικών σειρών HBEC-CDC6 Tet-OFF και Tet-ON. **(2)** Εικόνες που δείχνουν ένταση φωτός χημειοφωταύγειας από εκχύλισμα κυττάρων που προέρχονται από κυτταρικά μοντέλα (HBEC-Cdc6 Tet-ON και Saos-2 p21^{WAF-1/Cip1} Tet-ON) με καθιερωμένη γήρανση (μετά από επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *Cdc6* και *p21* αντίστοιχα) σε σύγκριση με τους αντίστοιχους, αρνητικούς μάρτυρες (HBEC-Cdc6 κύτταρα OFF και Saos-2 p21^{WAF-1/Cip1} κύτταρα OFF). **(3)** Πίνακας που δείχνει τις τιμές και τα στατιστικά δεδομένα των μετρήσεων έντασης φωτός με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας σε κάθε ομάδα και δείγμα.

3.5.2 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε ορούς αίματος

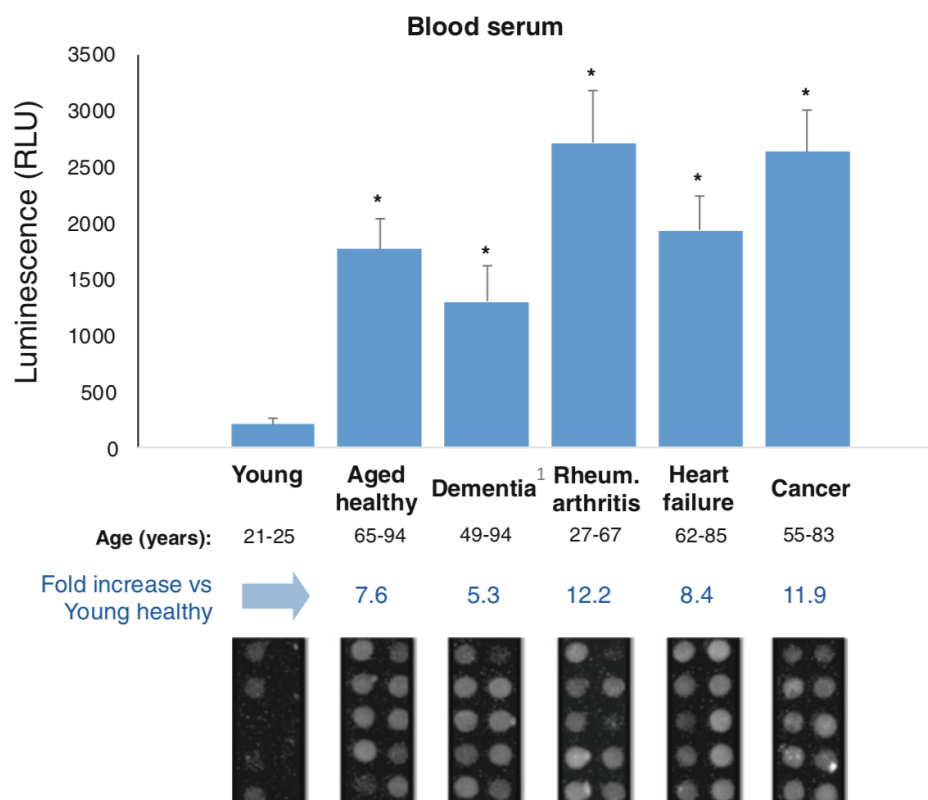
Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα των πειραμάτων ανίχνευσης και μέτρησης των επιπέδων της διαλυτής λιποφουσκίνης σε υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας και εκχύλισμα κυττάρων, σχεδιάσαμε ένα πρωτόκολλο εντοπισμού της λιποφουσκίνης στον ορό του αίματος. Συγκεκριμένα το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης μελετήθηκε σε δείγματα υγιών και ασθενών ατόμων, μετρώντας τα επίπεδα της λιποφουσκίνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου GL13. Οι υγιείς ταξινομήθηκαν σε δύο υποκατηγορίες με βάση την ηλικία, ενώ οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με την ασθένεια από την οποία πάσχουν. Οι ασθένειες που εξετάστηκαν είναι η καρδιακή ανεπάρκεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Πίνακας 3.1). Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις λόγω βιβλιογραφικών αναφορών που τις συσχετίζουν με την αυξημένη εμφάνιση γηρασμένων κυττάρων. Από τον ορό του αίματος απομονώθηκε η λιποφουσκίνη και η ανίχνευση της έγινε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το χημικό αντιδραστήριο GL13 (Παράγραφος 2.6).

Πίνακας 3.1 Δείγματα ορών αίματος που μελετήθηκαν για τη μέτρηση των διαλυτών επιπέδων λιποφουσκίνης ανάλογα με την κατάσταση της υγείας των δοτών και της ηλικίας τους.

Βιολογικό υλικό	Συνθήκη/ασθένεια	ηλικία	αριθμός δειγμάτων
Ορός αίματος	νέοι υγιείς	21-25	10
Ορός αίματος	ηλικιωμένοι υγιείς	65-94	10
Ορός αίματος	καρδιακή ανεπάρκεια	62-85	10
Ορός αίματος	νευροεκφυλιστικές νόσοι	49-94	10
Ορός αίματος	ρευματοειδής αρθρίτιδα	27-67	10
Ορός αίματος	καρκίνος	55-83	10

Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της λιποφουσκίνης σε ορούς αίματος από νέους (δείγματα ελέγχου) και ηλικιωμένους. Επίσης έγινε έλεγχος των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε «υγιή» άτομα, οι οποίοι δεν φέρουν υποκείμενα νοσήματα, καθώς και σε ασθενείς που πάσχουν από διαφορετικά είδη παθολογικών ασθενειών, όπως καρδιακή ανεπάρκεια, νευροεκφυλιστικές παθήσεις (άνοια),

ρευματοειδή αρθρίτιδα και καρκίνο. Από κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα και το ηλικιακό εύρος κάθε κατηγορίας αναφέρεται στον Πίνακα 3.1. Παρατηρήσαμε ότι στα δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο οι τιμές ήταν 11.9 φορές πιο υψηλές σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς. Αντίστοιχα σε δείγματα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα τα επίπεδα της λιποφουσκίνης ήταν 12.2 φορές μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά των δειγμάτων αναφοράς (Εικόνα 3.12). Αυτό μας δείχνει ότι τα επίπεδα της λιποφουσκίνης αυξάνονται σε παθολογικές καταστάσεις σε σχέση με τις φυσιολογικές. Παρατηρήσαμε, μάλιστα, πως αυτή η αύξηση δεν είναι αποτέλεσμα του γήρατος αλλά της παθογένειας. Συγκεκριμένα στις ομάδες που αφορούν το γήρας, μελετήθηκαν ασθενείς χωρίς υποκείμενα νοσήματα, ώστε να υπάρχει μόνο μία παράμετρος.

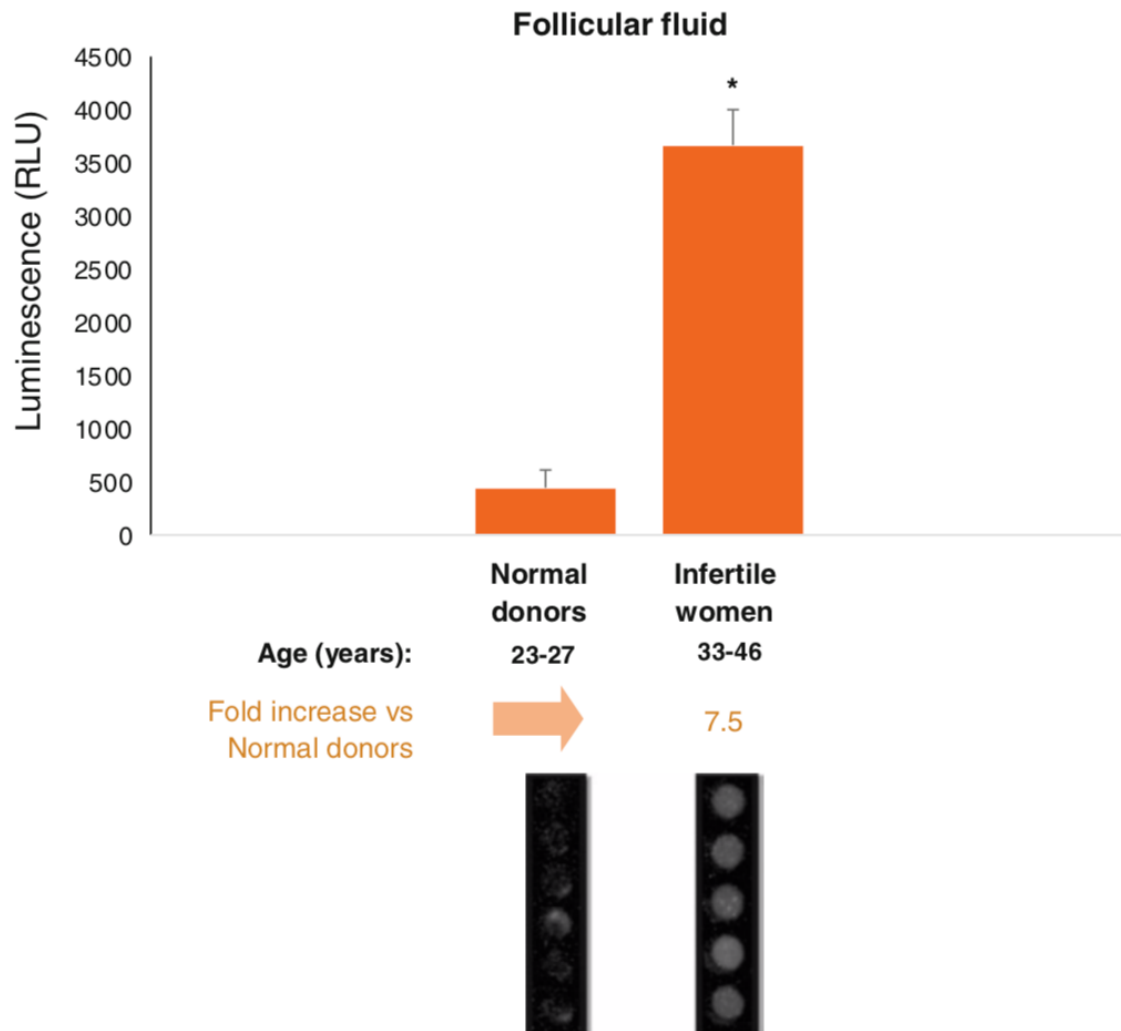


Εικόνα 3.12: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η ένταση της χημειοφωταύγειας ύστερα από επώαση με το αντιδραστήριο GL13. Τα δείγματα ορού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από διαφορετικές ομάδες ατόμων (ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα είναι 10). Υπάρχουν στατιστικά σημαντικές

διαφορές στις τιμές των επιπέδων της λιποφουσκίνης μεταξύ των δειγμάτων από νέους και ηλικιωμένους δότες, καθώς επίσης και μεταξύ νέων υγιών ατόμων και ατόμων με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

3.5.3 Μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε ωοθυλακικό υγρό

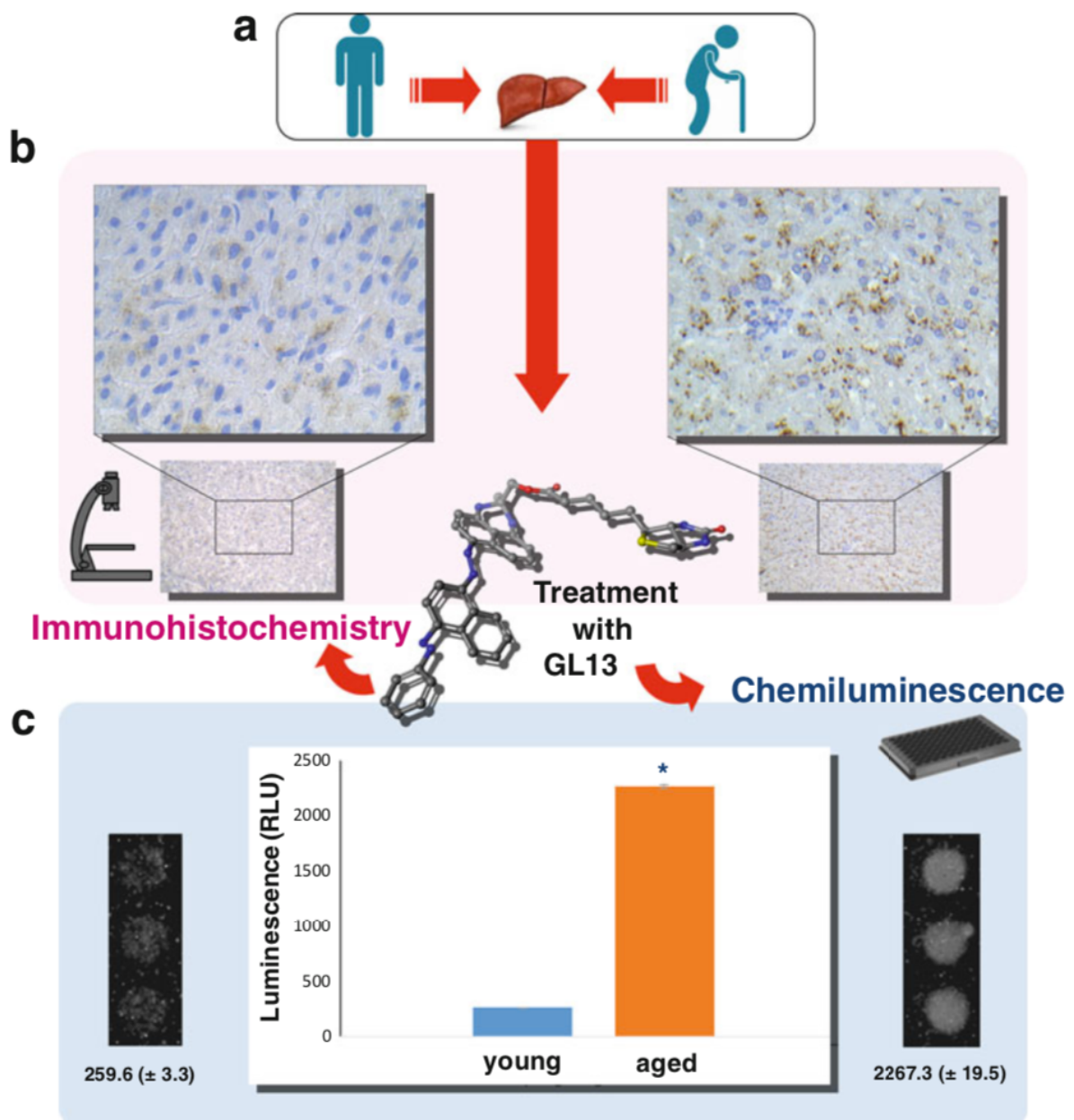
Για το συγκεκριμένο πείραμα απομονώθηκε ωοθυλακικό υγρό από γυναίκες, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Οι φυσιολογικές δότριες ωρίων ανήκουν στο εύρος ηλικίας 23-27 έτη και οι γυναίκες οι οποίες είναι στείρες ανήκουν στο ηλικιακό εύρος 33-46 έτη. Από κάθε ομάδα εξετάστηκαν 5 άτομα-δότριες ωοθυλακικού υγρού. Τα επίπεδα της λιποφουσκίνης στείρων γυναικών είναι 8 περίπου φορές υψηλότερα συγκριτικά με τις φυσιολογικές δότριες. Τα αποτελέσματα ενισχύουν την βιβλιογραφική αναφορά της παρουσίας της λιποφουσκίνης στο ωοθυλακικό υγρό.



Εικόνα 3.13: Γράφημα που δείχνει την ένταση φωτός της χημειοφωταύγειας των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού που προέρχονται από δύο διαφορετικές ομάδες ατόμων (n=5 σε κάθε ομάδα) με τη χρήση του αντιδραστηρίου GL13. Παρατηρούνται σαφείς διαφορές στα επίπεδα λιποφουσκίνης μεταξύ δειγμάτων από φυσιολογικές δότριες ωαρίων και στείρων γυναικών. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν την παρουσία λιποφουσκίνης στο ωοθυλακικό υγρό, δείχνοντας οκταπλάσια περίπου αύξηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε στείρες γυναίκες σε σύγκριση με τις φυσιολογικές δότριες. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις από αυτά τα δείγματα αντιστοιχούν σε 7,5 φορές αύξηση των επιπέδων λιποφουσκίνης.

3.5.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της λιποφουσκίνης σε ομογενοποιημένο ανθρώπινο ιστό ήπατος.

Ως ένα επιπρόσθετο επίπεδο επικύρωσης των προηγούμενων αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ηπατικού ανθρώπινου ιστού χωρισμένα σε δύο κατηγορίες, με κριτήριο το ηλικιακό εύρος. Ένα κομμάτι του ιστού μονιμοποιήθηκε σε φορμόλη και εγκλείστηκε σε παραφίνη, ενώ το υπόλοιπο ομογενοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6. Κοινός παρανομαστής και των δύο πειραμάτων ήταν η χρήση του αντιδραστηρίου GL13 με διαφορετικές τεχνικές, ανοσοϊστοχημική μέθοδο και χημειοφωταύγεια. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, καθώς αναδείχθηκε και στις δύο περιπτώσεις η ευαισθησία και η ακρίβεια του αντιδραστηρίου. και αξιολογήθηκε το ποσοστό των γηρασμένων κυττάρων, το οποίο εμφάνιζε κοινό πρότυπο και στις δύο περιπτώσεις.

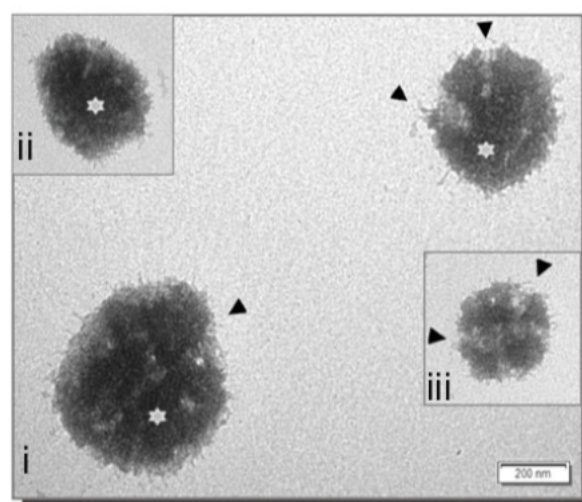


Εικόνα 3.15: Σχηματική απεικόνιση η οποία συνοψίζει δύο εναλλακτικές διαδικασίες που μπορούν να απεικονίσουν τη συσσώρευση λιποφουσκίνης στον ανθρώπινο ηπατικό ιστό με τη χρήση του βιοτινυλιωμένου SBB αναλόγου GL13. **(a)** Δείγματα ανθρώπινων ηπατικών ιστών απομονώθηκαν από νεαρά (αριστερά) και ηλικιωμένα (δεξιά) άτομα. **(b)** Μέρος του ιστού μονιμοποιήθηκε με φορμαλδεΰδη, εγκλείστηκε σε παραφίνη (FFPE) και μελετήθηκε με οπτική μικροσκοπία. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η ιστοχημική-ανοσοϊστοχημική μέθοδος σε ιστούς FFPE χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο GL13, δείχνοντας εμφανείς διαφορές στα επίπεδα λιποφουσκίνης μεταξύ των νέων και των

ηλικιωμένων δειγμάτων σε μεγεθύνσεις x1000 και x4000. (c) Ένα άλλο μέρος κάθε δείγματος ανθρώπινου ηπατικού ιστού ομογενοποιήθηκε, η λιποφουσκίνη απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα χημειοφωταύγειας με το αντιδραστήριο GL13. Η προκύπτουσα φωτεινότητα μετρήθηκε όπως περιγράφεται στην πειραματική διαδικασία (Παράγραφος 2.6). Η ανάλυση δείχνει μια οκταπλάσια αύξηση των επιπέδων λιποφουσκίνης σε ιστούς ήπατος ηλικιωμένων σε σύγκριση με τα δείγματα των νέων ατόμων. Τα αποτελέσματα συνάδουν με τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις. Τυπικό σφάλμα, $n=3$, $P < 0,05$.

3.6 Απεικόνιση της λιποφουσκίνης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Για να επαληθευτεί ότι το εκχυλισμένο υλικό που απομονώθηκε μέσω της διαδικασίας (η οποία περιγράφεται στην Παράγραφο 2.6) αποτελεί λιποφουσκίνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (Παράγραφος 2.8). Παρατηρήθηκε ότι το εκχυλισμένο υλικό παρουσιάζει μορφολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της απομονωμένης λιποφουσκίνης (Siakotos *et al.*, 1970, 1973), καθώς αποτελεί ένα συσσωμάτωμα οξειδωμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι σχηματισμοί λιποφουσκίνης χαρακτηρίζονται από μικρές ηλεκτρονιοδιαυγείς περιοχές, οι οποίες υποδηλώνουν τον εντοπισμό των συστατικών των λιπιδίων και ευρείες ηλεκτρονιόπυκνες περιοχές που εμφανίζουν πολύ λεπτούς κυστιδιακούς σχηματισμούς (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16: Παρατήρηση εκχυλίσματος λιποφουσκίνης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Παρατηρείται ότι οι σχηματισμοί λιποφουσκίνης εμφανίζουν την ίδια μορφολογία είτε εξάγονται από ανθρώπινο ηπατικό ιστό (i) είτε από ορό αίματος (ii, iii). Οι σχηματισμοί λιποφουσκίνης χαρακτηρίζονται από μικρές ηλεκτρονιοδιαυγείς περιοχές (κεφαλές βελών) που δείχνουν την παρουσία λιπιδίων και μεγαλύτερες ηλεκτρονιόπυκνες περιοχές (αστερίσκοι). Γραμμή κλίμακας: 200 nm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής μελετάται ο καθοριστικός ρόλος του φαινομένου της γήρανσης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, με τη χρήση του χημικού αντιδραστηρίου GL13.

Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου πέντε δεκαετίες όταν ο Hayflick και ο συνάδελφός του (Hayflick and Moorhead, 1961; Hayflick, 1965) έδειξαν ότι τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα (στην προκειμένη περίπτωση ινοβλάστες) δεν πολλαπλασιάζονταν επ' αόριστον στην καλλιέργεια. Αυτά τα κύτταρα διαπιστώθηκε ότι είχαν πεπερασμένη αναπαραγωγική διάρκεια ζωής και στη συνέχεια υποβάλλονταν σε αναδιπλασιαστική ή κυτταρική γήρανση. Ο αριθμός των διαιρέσεων που ολοκληρώνουν τα κύτταρα όταν φτάσουν στο τέλος της αναπαραγωγικής διάρκειας ζωής τους έχει χαρακτηριστεί ως το όριο Hayflick. Ο σύνδεσμος μεταξύ του ορίου Hayflick και της γήρανσης ήταν, για πολλά χρόνια, αδύναμος – κυρίως γιατί φαινόταν ότι τα γηρασμένα κύτταρα εκφυλίζονται, αν και παρέμεναν βιώσιμα και μεταβολικά ενεργά. Η σχέση με τον καρκίνο ήταν πιο εμφανής. Ακόμα και πριν από 50 χρόνια, ήταν προφανές ότι τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν πεπερασμένη αναπαραγωγική διάρκεια ζωής (Sager, 1991). Τις επόμενες δεκαετίες οι μελέτες πάνω στην κυτταρική γήρανση, τον καρκίνο και το γήρας έχουν ενισχυθεί.

Ο ρόλος της γήρανσης στις ανθρώπινες ασθένειες είναι σαφής από τις κυτταρικές μελέτες, ενώ υπάρχουν αρκετά *in vivo* δεδομένα (Muñoz-Espín and Serrano, 2014; Childs *et al.*, 2015). Επιπλέον, στοιχεία που συνδέουν τη γήρανση με ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία έχουν προκύψει πρόσφατα. Αυτές οι ασθένειες περιλαμβάνουν τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα, τον διαβήτη, τον καταρράκτη, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και την ίνωση του ήπατος (Muñoz-Espín and Serrano, 2014; Childs *et al.*, 2015; He and Sharpless, 2017). Στις περισσότερες μελέτες η ανίχνευση της γήρανσης γίνεται σε *ex vivo* καλλιέργειες κυττάρων ή σε νωπό ιστό χρησιμοποιώντας την χρώση SA-β-gal ή έμμεσους δείκτες που χρησιμοποιούνται σε ιστολογικά δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμαδεΰδη δείγματα (Serrano *et al.*, 1997; Haugstetter *et al.*, 2010; Muñoz-Espín and Serrano, 2014; He and Sharpless, 2017). Παρόλα αυτά, η χρώση που στηρίζεται στην ενζυμική δραστηριότητα SA-β-gal δεν είναι κατάλληλη για μονιμοποιημένους ιστούς, με αποτέλεσμα η μελέτη της γήρανσης σε ανθρώπινα δείγματα να αποτελεί πρόκληση. Η ανίχνευση των γηρασμένων κυττάρων

μπορεί, επίσης, να πραγματοποιηθεί με την ιστοχημική χρώση Sudan Black B (SBB), η οποία συνδέεται με τη λιποφουσκίνη, έναν ακόμα δείκτη της γήρανσης (Georgakopoulou *et al.*, 2013). Η λιποφουσκίνη αποτελεί συσσωμάτωμα οξειδωμένων μακρομορίων, διατηρείται σε μονιμοποιημένα δείγματα και έχει βρεθεί ότι είναι αρκετά ανθεκτική, καθώς απομονώθηκε από ανθρώπινο απολίθωμα ηλικίας 210.000 ετών (Harvati *et al.*, 2019; Myrianthopoulos *et al.*, 2019).

Στηριζόμενοι στη χημική δομή του αντιδραστήριου Sudan Black B, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός χημικού αναλόγου που ονομάζεται GL13. Για να μπορεί να γίνει εύκολα και ειδικά η ανίχνευση του αντιδραστήριου GL13 έχει συνδεθεί με ένα μόριο βιοτίνης, η οποία πειραματικά εντοπίζεται εύκολα. Με αυτό τον τρόπο το αντιδραστήριο GL13 είναι κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί σε πολλές τεχνικές, όπως η ανοσοϊστοχημεία, η κυτταρομετρία ροής, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η χημειοφωταύγεια, ώστε να εντοπίσει τα κοκκία της λιποφουσκίνης των γηρασμένων κυττάρων.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αρχικά το αντιδραστήριο δοκιμάστηκε, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού, σε κυτταρικά μοντέλα στα οποία είχε γίνει επαγωγή του φαινομένου της γήρανσης. Τα είδη της κυτταρικής γήρανσης που μελετήθηκαν ήταν η αναδιπλασιαστική και η πρόωγη γήρανση (με επαγωγή έκφρασης ογκογονιδίου ή έκθεση σε ακτινοβολία). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες κυτταρικές σειρές χωρίς την επαγωγή του φαινομένου. Σε αυτά τα δείγματα παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά γηρασμένων κυττάρων σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, ενδεικνύοντας την ακρίβεια και την εύκολη χρήση του αντιδραστήριου.

Παράλληλα, η χρώση του GL13 συγκρίθηκε με άλλους βιοδείκτες, όπως η ενζυμική δραστηριότητα SA-β-gal και η χρώση SBB, στις κυτταρικές σειρές HeLa και Li-Fraumeni. Οι στρεσογόνες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των χρώσεων ήταν έλλειψη θρεπτικών υλικών (συνθήκες ασιτίας) και μεγάλος αριθμός κυττάρων (έλλειψη χώρου ανάπτυξης). Συγκρίνοντας εικόνες οπτικού μικροσκοπίου και ποσοτικοποιώντας τον αριθμό των γηρασμένων κυττάρων σε κάθε χρώση, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η μέθοδος εντόπισης της γήρανσης με το αντιδραστήριο GL13, σε αντίθεση με τις άλλες δύο χρώσεις, χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και ευαισθησία. Αυτό συμβαίνει, καθώς η ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντιδραστήριο

GL13 δεν έδωσε ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα, όπως οι άλλες δύο χρώσεις.

Όσον αφορά τα δείγματα των ιστών που αποτελούν αρχειακό υλικό, με τη μέθοδο εντόπισης γηρασμένων κυττάρων με το αντιδραστήριο GL13, υπήρχε η δυνατότητα σάρωσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων με προκαρκινικές ή καρκινικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα για την αύξηση του αριθμού των γηρασμένων κυττάρων μετά από ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία ή έκθεση σε UV ακτινοβολία. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, παράλληλη μελέτη της έκφρασης παραγόντων όπως οι πρωτεΐνες p53, 53BP1, καθώς και η έκφραση mi-RNAs (miR-34a) σε σχέση με το φαινόμενο της γήρανσης σε δείγματα ιστών και κυτταρικά μοντέλα.

Μελέτες έχουν αναφέρει την ύπαρξη ελεύθερης λιποφουσκίνης στον ορό του αίματος, η οποία μπορεί να συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις ή με το γήρας (Brunk and Terman, 2002a; Jung, Höhn and Grune, 2010; Feng *et al.*, 2015). Σχεδιάστηκε, λοιπόν, ένα πρωτόκολλο το οποίο στηρίζεται στην ειδική σύνδεση αντιδραστηρίου GL13-λιποφουσκίνης και η ανίχνευση του σήματος γίνεται μέσω της τεχνικής της χημειοφωταύγειας. Τα δείγματα μελέτης χωρίστηκαν σε 3 μεγάλες κατηγορίες, υγιείς σε νεαρή ηλικία (21-25 ετών), ηλικιωμένοι (>65 ετών) χωρίς υποκείμενα νοσήματα και ασθενείς. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν περιελάμβαναν την καρδιακή ανεπάρκεια, τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις (άνοια), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον καρκίνο. Παρατηρήσαμε ότι στα δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο οι τιμές ήταν 11.9 φορές πιο υψηλές σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς, τα οποία δεν είναι άλλα από τα δείγματα των υγιών ατόμων σε νεαρή ηλικία. Αντίστοιχα σε δείγματα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα τα επίπεδα της λιποφουσκίνης ήταν 12.2 φορές μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά των δειγμάτων αναφοράς. Αυτό μας δείχνει ότι τα επίπεδα της λιποφουσκίνης αυξάνονται σε παθολογικές καταστάσεις σε σχέση με τις φυσιολογικές. Παρατηρήσαμε, μάλιστα, πως αυτή η αύξηση δεν είναι αποτέλεσμα του γήρατος αλλά της παθογένειας.

Συμπερασματικά, ο ρόλος της γήρανσης είναι καθοριστικός σε ποικίλες συνθήκες. Γι' αυτό τον λόγο, η εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των γηρασμένων κυττάρων και τη ευρύτερη μελέτη του ρόλου του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης. Τα αποτελέσματα των

πειραμάτων στους ορούς αίματος είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, καθώς αν η τεχνική εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα δειγμάτων, τότε μία απλή μέτρηση των επιπέδων της λιποφουσκίνης στον ορό με το αντιδραστήριο GL13 θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο διαγνωστικό δείκτη.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω,, στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται ένα σύνολο πειραματικών προσεγγίσεων εντοπισμού γηρασμένων κυττάρων μέσω του αντιδραστηρίου GL13 ή μέτρησης των επιπέδων της λιποφουσκίνης με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα αποτελώντας ένα σημαντικό και καινοτόμο επιστημονικό εργαλείο στη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης. Το αντιδραστήριο λόγω της φύσης του και της σύνδεση του με ένα μόριο βιοτίνης μπορεί να εντοπιστεί εύκολα και να προστεθεί σε ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα *in situ* και μη τεχνικών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μεθοδολογίες και τα είδη των βιολογικών δειγμάτων μελέτης της κυτταρικής γήρανσης με το GL13, που μελετήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής και οι αντίστοιχες δημοσιεύσεις όπου περιγράφονται.

Κυτταρικές σειρές/ Βιολογικό δείγμα	Κατηγορία δείγματος	Μέθοδος εφαρμογής του GL13	Δημοσίευση
U2OS Cdt1 Tet-ON	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	Ανοσοϊστοχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
U2OS E2F1- ER	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	Ανοσοκυτταροχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
HBEC Cdc6 Tet-ON	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	Ανοσοκυτταροχημεία, Ανοσοφθορισμός, ISH	Evangelou <i>et al.</i> , 2016; Komseli <i>et al.</i> , 2018
DLFs	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	Ανοσοκυτταροχημεία, Διπλή ανοσοκυτταροχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Saos p53 Tet- ON	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	Ανοσοκυτταροχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Saos p21 Tet- ON	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	Ανοσοκυτταροχημεία, Κυτταρομετρία ροής, Διπλή ανοσοκυτταροχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
HeLa	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	SA-β-gal, SBB, ανοσοϊστοχημική χρώση	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Li-Fraumeni	Ανθρώπινη κυτταρική σειρά	SA-β-gal, SBB, ανοσοϊστοχημική χρώση	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Ωοθυλακικό υγρό	Ανθρώπινα δείγματα	Χημειοφωταύγεια	Rizou <i>et al.</i> , 2019
Ορός αίματος	Ανθρώπινα δείγματα	Χημειοφωταύγεια	Rizou <i>et al.</i> , 2019
Ιστός εγκεφάλου	Ανθρώπινα δείγματα	Ανοσοϊστοχημεία	Kritsilis <i>et al.</i> , 2018
Ξενομόσχευμα μελανοκυττάρ ων	ζωικό μοντέλο (ποντίκι)	Ανοσοϊστοχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Πνεύμονας	ζωικό μοντέλο (ποντίκι)	Ανοσοϊστοχημεία, Διπλή ανοσοϊστοχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Βιοψία ακτινοβολημέν ου ιστού λάρυγγα	Ανθρώπινα δείγματα	Ανοσοϊστοχημεία, Διπλή ανοσοϊστοχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016
Βιοψία δέρματος/μελά νωμα	Ανθρώπινα δείγματα	Ανοσοϊστοχημεία	Evangelou <i>et al.</i> , 2016

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acosta, J. C. *et al.* (2008) 'Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.038.
- Bartkova, J. *et al.* (2006) 'Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints', *Nature*. doi: 10.1038/nature05268.
- Bauer, J. *et al.* (1991) 'Interleukin-6 and α -2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/0014-5793(91)80737-N.
- Bavik, C. *et al.* (2006) 'The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1716.
- Beauséjour, C. M. *et al.* (2003) 'Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways', *EMBO Journal*. doi: 10.1093/emboj/cdg417.
- Beregi, E. and Regius, O. (1983) 'Lipofuscin in lymphocytes and plasma cells in aging', *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2(3), pp. 229–235. doi: 10.1016/0167-4943(83)90026-2.
- Besancenot, R. *et al.* (2010) 'A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: Implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation', *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.1000476.
- Bluhm, B. A. and Brey, T. (2001) 'Age determination in the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus* (Crustacea: Decapoda), using the autofluorescent pigment lipofuscin', *Marine Biology*. doi: 10.1007/s002270000458.
- Bluhm, B. A., Brey, T. and Klages, M. (2001) 'The autofluorescent age pigment lipofuscin: Key to age, growth and productivity of the antarctic amphipod *Waldeckia obesa* (Chevreux, 1905)', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. doi:

10.1016/S0022-0981(01)00214-3.

Bø, L. *et al.* (2003) 'Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. doi: 10.1093/jnen/62.7.723.

Boumendil, C. *et al.* (2019) 'Nuclear pore density controls heterochromatin reorganization during senescence', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.321117.118.

Brunk, U. T. and Terman, A. (2002a) 'Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00959-0.

Brunk, U. T. and Terman, A. (2002b) 'The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis', *European Journal of Biochemistry*. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x.

Campbell, I. L. *et al.* (1993) 'Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.90.21.10061.

Campisi, J. and D'Adda Di Fagagna, F. (2007) 'Cellular senescence: When bad things happen to good cells', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2233.

Castro, P. *et al.* (2003) 'Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia', *Prostate*. doi: 10.1002/pros.10204.

Chen, Z. *et al.* (2005) 'Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis', *Nature*. doi: 10.1038/nature03918.

Childs, B. G. *et al.* (2015) 'Cellular senescence in aging and age-related disease: From

mechanisms to therapy', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm.4000.

Chmátalová, Z. *et al.* (2016) 'Analysis of lipophilic fluorescent products in blood of Alzheimer's disease patients', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. doi: 10.1111/jcmm.12824.

Chuprin, A. *et al.* (2013) 'Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.227512.113.

Collado, M. *et al.* (2005) 'Tumour biology: Senescence in premalignant tumours', *Nature*. doi: 10.1038/436642a.

Collado, M. and Serrano, M. (2010) 'Senescence in tumours: Evidence from mice and humans', *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc2772.

Coppé, J.-P. *et al.* (2010) 'The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Coppé, J. P. *et al.* (2008) 'Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor.', *PLoS biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.

Coppé, J. P. *et al.* (2011) 'Tumor suppressor and aging biomarker p16 INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M111.257071.

Croce, A. C. and Bottioli, G. (2014) 'Autofluorescence spectroscopy and imaging: A tool for biomedical research and diagnosis', *European Journal of Histochemistry*. doi: 10.4081/ejh.2014.2461.

Cruickshanks, H. A. *et al.* (2013) 'Senescent Cells Harbour Features of the Cancer Epigenome', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2879.

D'Adda Di Fagagna, F. *et al.* (2003) 'A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence', *Nature*. doi: 10.1038/nature02118.

D'Adda Di Fagagna, F., Teo, S. H. and Jackson, S. P. (2004) 'Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.1214504.

Debacq-Chainiaux, F. *et al.* (2009) 'Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo', *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2009.191.

Demaria, M. *et al.* (2014) 'An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.

Deschênes-Simard, X. *et al.* (2013) 'Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation', *Genes and Development*, 27(8), pp. 900–915. doi: 10.1101/gad.203984.112.

Dickson, M. A. *et al.* (2000) 'Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16INK4a-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.20.4.1436-1447.2000.

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*, 92(20), pp. 9363–9367. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.

Evangelou, K. *et al.* (2017) 'Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens', *Aging Cell*, 16(1). doi: 10.1111/acel.12545.

Feng, F. K. *et al.* (2015) 'Lipofuscin in saliva and plasma and its association with age

in healthy adults', *Aging Clinical and Experimental Research*. doi: 10.1007/s40520-015-0326-3.

Fischer, B. M. *et al.* (2013) 'Increased expression of senescence markers in cystic fibrosis airways', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. doi: 10.1152/ajplung.00091.2012.

Franceschi, C. and Campisi, J. (2014) 'Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. doi: 10.1093/gerona/glu057.

Galanos, P. *et al.* (2016) 'Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3378.

Galanos, P. *et al.* (2019) 'Europe PMC Funders Group genomic instability by deregulating the replication licensing machinery', 18(7), pp. 777–789. doi: 10.1038/ncb3378.Protracted.

Gaspar, J., Mathieu, J. and Alvarez, P. J. J. (2016) 'A rapid platform to generate lipofuscin and screen therapeutic drugs for efficacy in lipofuscin removal.', *Materials, Methods & Technologies*, 10, pp. 1–9.

Gatenby, J. B. and Moussa, T. A. A. (1949) 'The Sudan Black B Technique in Cytology', *Journal of the Royal Microscopical Society*. doi: 10.1111/j.1365-2818.1949.tb00965.x.

Georgakopoulou, E. A. *et al.* (2013) 'Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues', *Aging*. doi: 10.18632/aging.100527.

Geraghty, R. J. *et al.* (2014) 'Guidelines for the use of cell lines in biomedical

research.', *British journal of cancer*. doi: 10.1038/bjc.2014.166.

Gorgoulis, V. *et al.* (2019) 'Cellular Senescence: Defining a Path Forward', *Cell*, 179(4), pp. 813–827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.

Gorgoulis, V. G. *et al.* (2018) 'Integrating the DNA damage and protein stress responses during cancer development and treatment', *Journal of Pathology*. doi: 10.1002/path.5097.

Gorgoulis, V. G. and Halazonetis, T. D. (2010) 'Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ceb.2010.07.013.

Di Guardo, G. (2015) 'Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence', *European Journal of Histochemistry*. doi: 10.4081/ejh.2015.2485.

Hampel, B. *et al.* (2006) 'Increased expression of extracellular proteins as a hallmark of human endothelial cell in vitro senescence', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/j.exger.2006.03.001.

Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990) 'Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts', *Nature*. doi: 10.1038/345458a0.

Harvati, K. *et al.* (2019) 'Apidima Cave fossils provide earliest evidence of Homo sapiens in Eurasia', *Nature*. doi: 10.1038/s41586-019-1376-z.

Haugstetter, A. M. *et al.* (2010) 'Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer', *British Journal of Cancer*. doi: 10.1038/sj.bjc.6605784.

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*, 25(3), pp. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

He, S. and Sharpless, N. E. (2017) 'Senescence in Health and Disease', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015.

Hernandez-Segura, A. *et al.* (2017) 'Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2017.07.033.

Höhn, A. *et al.* (2017) 'Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence', *Redox Biology*. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.001.

Höhn, A. and Grune, T. (2013) 'Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy', *Redox Biology*. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.006.

Höhn, T. J. A. and Grune, T. (2014) 'The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation', *Redox Biology*. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.008.

Huell, M. *et al.* (1995) 'Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to the brains of Alzheimer's disease patients', *Acta Neuropathologica*. doi: 10.1007/BF00571510.

Ito, Y., Hoare, M. and Narita, M. (2017) 'Spatial and Temporal Control of Senescence', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2017.07.004.

Ivy, G. O. *et al.* (1990) 'Lipofuscin-like substances accumulate rapidly in brain, retina and internal organs with cysteine protease inhibition', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-1-4899-5339-1_3.

Jun, J. II and Lau, L. F. (2010) 'Cellular senescence controls fibrosis in wound healing', *Aging*. doi: 10.18632/aging.100201.

Jung, T., Bader, N. and Grune, T. (2007) 'Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1196/annals.1404.008.

Jung, T., Höhn, A. and Grune, T. (2010) 'Lipofuscin: Detection and quantification by microscopic techniques', *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_13.

Kang, M. K. *et al.* (2003) 'Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/S0014-4827(03)00061-2.

Kang, T. W. *et al.* (2011) 'Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development', *Nature*. doi: 10.1038/nature10599.

Karamita, M. *et al.* (2018) 'Cellular Senescence Correlates with Demyelination, Brain Atrophy and Motor Impairment in a Model of Multiple Sclerosis (P2.405)', *Neurology*.

Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2015) 'Proteostasis and aging', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm.4001.

Kiecolt-Glaser, J. K. *et al.* (2003) 'Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1531903100.

Komseli, E.-S. *et al.* (2018) 'A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence', *BMC Genomics*, 19(1). doi: 10.1186/s12864-017-4375-1.

König, J. *et al.* (2017) 'Mitochondrial contribution to lipofuscin formation', *Redox Biology*. doi: 10.1016/j.redox.2017.01.017.

Koutsami, M. *et al.* (2008) 'Is exclusive Skp2 targeting always beneficial in cancer

therapy?', *Blood*. doi: 10.1182/blood-2008-06-161802.

Kritsilis, M. *et al.* (2018) 'Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). doi: 10.3390/ijms19102937.

Kuilman, T. *et al.* (2010) 'The essence of senescence', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.1971610.

Kuilman, T. and Peeper, D. S. (2009) 'Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress', *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc2560.

Kumar, G. L. and Kiernan, J. a (2010) 'Special Stains and H & E Second Edition Education Guide | Special Stains and H & E', *Dako North America, Carpinteria, California*.

Kuznetsov, A. *et al.* (2015) 'Visible auto-fluorescence in biological fluids as biomarker of pathological processes and new monitoring tool', in *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. doi: 10.1142/S1793545815410035.

Lee, B. Y. *et al.* (2006) 'Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase', *Aging Cell*. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.

Lin, A. W. *et al.* (1998) 'Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.12.19.3008.

Llanos, S. *et al.* (2019) 'Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications', *Oncogene*. doi: 10.1038/s41388-019-0695-8.

Madhuri, S. *et al.* (2003) 'Native Fluorescence Spectroscopy of Blood Plasma in the Characterization of Oral Malignancy', *Photochemistry and Photobiology*. doi: 10.1562/0031-8655(2003)078<0197:nfsobp>2.0.co;2.

Masako, T. *et al.* (1985) 'Fluorescent substances in mouse and human sera as a

parameter of in vivo lipid peroxidation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*. doi: 10.1016/0005-2760(85)90156-0.

Meredith, G. E. *et al.* (2002) 'Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease', *Brain Research*. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03514-X.

Michaloglou, C. *et al.* (2005) 'BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi', *Nature*. doi: 10.1038/nature03890.

Mochizuki, Y. *et al.* (1995) 'The Difference in Autofluorescence Features of Lipofuscin between Brain and Adrenal', *Zoological Science*. doi: 10.2108/zsj.12.283.

Mosteiro, L. *et al.* (2016) 'Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo', *Science*. doi: 10.1126/science.aaf4445.

Muñoz-Espín, D. *et al.* (2013) 'XProgrammed cell senescence during mammalian embryonic development', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019.

Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014) 'Cellular senescence: From physiology to pathology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3823.

Muñoz-Espín, D. *et al.* (2018) 'A versatile drug delivery system targeting senescent cells', *EMBO Molecular Medicine*. doi: 10.15252/emmm.201809355.

Myrianthopoulos, V. *et al.* (2019) 'Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy', *Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.08.006.

Nacher, V. *et al.* (2006) 'The quail mesonephros: A new model for renal senescence?', *Journal of Vascular Research*. doi: 10.1159/000096076.

Novakova, Z. *et al.* (2010) 'Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence', *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2009.318.

- Nozynski, J. *et al.* (2013) 'Advanced glycation end products and lipofuscin deposits share the same location in cardiocytes of the failing heart', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/j.exger.2012.09.002.
- Nyström, T. (2005) 'Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/sj.emboj.7600599.
- Ogrodnik, M. *et al.* (2017) 'Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms15691.
- Ogrodnik, M., Salmonowicz, H. and Gladyshev, V. N. (2019) 'Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells', *Aging Cell*. doi: 10.1111/acer.12841.
- Olivieri, F. *et al.* (2018) 'Cellular senescence and inflammaging in age-Related diseases', *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2018/9076485.
- Otsuki, J. *et al.* (2012) 'The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes', *Systems Biology in Reproductive Medicine*. doi: 10.3109/19396368.2012.675004.
- Otsuki, J., Nagai, Y. and Chiba, K. (2007) 'Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. doi: 10.1007/s10815-007-9130-0.
- Pazolli, E. *et al.* (2012) 'Chromatin remodeling underlies the senescence- associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3386.
- Pfüller, U., Franz, H. and Preiß, A. (1977) 'Sudan Black B: Chemical structure and histochemistry of the blue main components', *Histochemistry*. doi: 10.1007/BF00492246.

- Puckett, B. J., Secor, D. H. and Ju, S.-J. (2008) 'Validation and Application of Lipofuscin-Based Age Determination for Chesapeake Bay Blue Crabs *Callinectes sapidus*', *Transactions of the American Fisheries Society*. doi: 10.1577/t07-278.1.
- Rando, T. A. and Chang, H. Y. (2012) 'Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.003.
- Rasmussen, G. L. (1961) 'A method of staining the statoacoustic nerve in bulk with Sudan black B', *The Anatomical Record*. doi: 10.1002/ar.1091390403.
- Rizou, S. V. *et al.* (2019) 'Erratum: Correction to: A Novel Quantitative Method for the Detection of Lipofuscin, the Main By-Product of Cellular Senescence, in Fluids (Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) (2019) 1896 (119-138))', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1896. doi: 10.1007/978-1-4939-8931-7_19.
- Roberson, R. S. *et al.* (2005) 'Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1270.
- Rodier, F. *et al.* (2009) 'Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1909.
- Rodier, F. and Campisi, J. (2011) 'Four faces of cellular senescence', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201009094.
- Romijn, H. J. *et al.* (1999) 'Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. doi: 10.1177/002215549904700211.
- Roumen, R. M. H. *et al.* (1994) 'Serum lipofuscin as a prognostic indicator of adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure', *British Journal of Surgery*.

doi: 10.1002/bjs.1800810913.

Sager, R. (1991) 'Senescence as a mode of tumor suppression', in *Environmental Health Perspectives*. doi: 10.1289/ehp.919359.

Salama, R. *et al.* (2014) 'Cellular senescence and its effector programs', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.235184.113.

Saleh, T. *et al.* (2019) 'Tumor cell escape from therapy-induced senescence', *Biochemical Pharmacology*. doi: 10.1016/j.bcp.2018.12.013.

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.

Severino, J. *et al.* (2000) 'Is β -galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1006/excr.2000.4875.

Sharpless, N. E. and Sherr, C. J. (2015) 'Forging a signature of in vivo senescence', *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc3960.

Shay, J. W. and Wright, W. E. (2019) 'Telomeres and telomerase: three decades of progress', *Nature Reviews Genetics*. Springer US, 20(5), pp. 299–309. doi: 10.1038/s41576-019-0099-1.

Sheehy, M. R. J. (2002) 'A flow-cytometric method for quantification of neurolipofuscin and comparison with existing histological and biochemical approaches', in *Archives of Gerontology and Geriatrics*. doi: 10.1016/S0167-4943(01)00217-5.

Sheehy, M. R. J. and Roberts, B. E. (1991) 'An alternative explanation for anomalies in "soluble lipofuscin" fluorescence data from insects, crustaceans, and other aquatic species', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/0531-5565(91)90038-N.

Siakotos, A. N. *et al.* (1970) 'Procedures for the isolation of two distinct lipopigments

from human brain: Lipofuscin and ceroid', *Biochemical medicine*. doi: 10.1016/0006-2944(70)90064-5.

Siakotos, A. N. *et al.* (1973) 'Procedures for the mass isolation of pure lipofuscins from normal human heart and liver', *Biochemical medicine*. doi: 10.1016/0006-2944(73)90096-3.

Sidler, C., Kovalchuk, O. and Kovalchuk, I. (2017) 'Epigenetic regulation of cellular senescence and aging', *Frontiers in Genetics*. doi: 10.3389/fgene.2017.00138.

Sikora, E. *et al.* (2011) 'Impact of cellular senescence signature on ageing research', *Ageing Research Reviews*. doi: 10.1016/j.arr.2010.10.002.

Skoumalová, A. *et al.* (2011) 'The lipid peroxidation products as possible markers of Alzheimer's disease in blood', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/j.exger.2010.09.015.

Skoumalová, A., Mádllová, P. and Topinková, E. (2012) 'End products of lipid peroxidation in erythrocyte membranes in Alzheimer's disease', *Cell Biochemistry and Function*. doi: 10.1002/cbf.1836.

Sparrow, J. R., Nakanishi, K. and Parish, C. A. (2000) 'The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Storer, M. *et al.* (2013) 'XSenescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.041.

Sutherland, W. H., Williams, M. J. and de Jong, S. A. (2007) 'Plasma Protein Lipofuscin-like Fluorophores in Men with Coronary Artery Disease Treated with Statins', *Archives of Medical Research*. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.04.004.

Takahashi, A. *et al.* (2006) 'Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway

cooperate to enforce irreversible cellular senescence', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1491.

Terman, A., Gustafsson, B. and Brunk, U. T. (2006) 'The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death', *Chemico-Biological Interactions*. doi: 10.1016/j.cbi.2006.04.013.

Trapp, B. D. *et al.* (1998) 'Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis', *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJM199801293380502.

Viegas, M. *et al.* (2007) 'An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues', *European Journal of Histochemistry*. doi: 10.4081/1013.

Wajapeyee, N. *et al.* (2008) 'Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.032.

Xie, W. *et al.* (2018) 'DNA Methylation Patterns Separate Senescence from Transformation Potential and Indicate Cancer Risk', *Cancer Cell*. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.008.

Xue, W. *et al.* (2007) 'Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas', *Nature*. doi: 10.1038/nature05529.

Yang, N. C. and Hu, M. L. (2005) 'The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/j.exger.2005.07.011.

Yin, D. (1996) 'Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/0891-5849(96)00175-X.

Young, A. R. J. and Narita, M. (2009) 'SASP reflects senescence', *EMBO Reports*.

doi: 10.1038/embor.2009.22.

Zhu, J. *et al.* (1998) 'Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf',

Genes and Development. doi: 10.1101/gad.12.19.2997.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συντομογραφίες

53PB1: p53-binding protein 1

AER: Atypical Ectodermal Ridge

CDC6: Cell Division Control protein 6

CDKs: Cyclin Dependent Kinases

CDK4: Cyclin Dependent Kinase 4

CDK6: Cyclin Dependent Kinase 6

CDT1: Chromatin Licensing And DNA Replication factor 1

DDR: DNA Damage Response

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DSBs: Double Strand Breaks

ERK: Extracellular-signal-Regulated Kinase

FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded

FGF4: Fibroblast Growth Factor 4

FGF8: Fibroblast Growth Factor 8

FOXO: Forkhead box transcription factors, members of the class O

HBEC: Human Bronchial Epithelial Cells

miR: Micro-RNA

MMPs: Matrix Metalloproteinases

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

OIS: Oncogene Induced Senescence

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PTPs: Protein Tyrosine Phosphatases

Rb: Retinoblastoma

ROS: Reactive Oxygen Species

SA- β -gal: Senescence Associated beta-galactosidase

SASP: Senescence Associated Secretory Phenotype

SBB: Sudan Black B

SMS: Senescence Messaging Secretome

TGF β : Transforming Growth Factor beta



Chapter 12

A Novel Quantitative Method for the Detection of Lipofuscin, the Main By-Product of Cellular Senescence, in Fluids

Sophia V. Rizou, Konstantinos Evangelou, Vassilios Myrianthopoulos, Iordanis Mourouzis, Sophia Havaki, Aikaterini Athanasiou, Panagiotis V. S. Vasileiou, Aggelos Margetis, Athanassios Kotsinas, Nikolaos G. Kastrinakis, Petros Sfikakis, Paul Townsend, Emmanuel Mikros, Constantinos Pantos, and Vassilis G. Gorgoulis

Abstract

Lipofuscin accumulation is a hallmark of senescence. This nondegradable material aggregates in the cytoplasm of stressed or damaged cells due to metabolic imbalance associated with aging and age-related diseases. Indications of a soluble state of lipofuscin have also been provided, rendering the perspective of monitoring such processes via lipofuscin quantification in liquids intriguing. Therefore, the development of an accurate and reliable method is of paramount importance. Currently available assays are characterized by inherent pitfalls which demote their credibility. We herein describe a simple, highly specific and sensitive protocol for measuring lipofuscin levels in any type of liquid. The current method represents an evolution of a previously described assay, developed for in vitro and in vivo senescent cell recognition that exploits a newly synthesized Sudan Black-B analog (GL13). Analysis of human clinical samples with the modified protocol provided strong evidence of its usefulness for the exposure and surveillance of age-related conditions.

Key words Lipofuscin, GL13 (SenTraGor™), Senescence, Biological fluids, Aging, Age-related diseases

1 Introduction

We have recently shown that cytoplasmic lipofuscin aggregation is a landmark of senescence [1, 2]. The latter represents a cellular response mechanism against stress or damage [3–7]. Subsequently, we developed a novel reagent (GL13) and a hybrid histochemical-immunohistochemical method that allows for recognition of

Sophia V. Rizou, Konstantinos Evangelou, Vassilios Myrianthopoulos, and Iordanis Mourouzis contributed equally to this work.

Marco Demaria (ed.), *Cellular Senescence: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1896, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7_12, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

senescent cells *in vitro* and *in vivo*, with high specificity and sensitivity [8]. GL13 is a biotinylated Sudan Black-B (SBB) chemical analog (commercially available as SenTraGor™ by Arriani Pharmaceuticals Greece, Catalog number: AR8850040-AR8850080). GL13 interacts potently and specifically with lipofuscin and can be detected via an antibody-mediated chromogenic or fluorescent assay [8–11]. As a result, the application of GL13 outperforms most of the available and widely used senescent cell-staining methods with respect to their technical challenges, inherent limitations and systematic errors [8]. Interestingly, unprecedented quantification capacities also emerge, as shown herein. The currently described protocol represents an advancement rendering lipofuscin levels measurable in biological fluids. More specifically, we present a novel quantitative detection method of soluble or extracted lipofuscin levels in cell culture supernatants, body fluids and tissue homogenates that utilizes an antibody-mediated chemiluminescence assay.

Lipofuscin is a nondegradable substrate of metabolism that accumulates in cells due to impaired mitochondrial/lysosome (mitochondrial-lysosomal axis theory) and proteasome function, upon stress or cellular damage [12–20]. Stressed or damaged cells have ceased to proliferate and are therefore not able to degrade this substrate by cell division [17, 20]. The bulk mass of this heterogeneous material consists of oxidized proteins/lipoproteins, oxidized lipids and metals that become resistant to hydrolysis by lysosomal enzymes [17–19]. Lipofuscin is not inactive and harmless but harbors detrimental properties. Firstly, lipofuscin accumulation is known to reduce proteostasis and, particularly, the proteasomal activity, thus inhibiting the effective turnover of modified/oxidized proteins [17, 19, 21]. Secondly, it facilitates production of reactive oxygen species (ROS) via the Fenton reaction, mediated by its integrated redox-active metals [17, 19, 21]. Together, these lead to increased formation of oxidized intracellular molecules which, in turn, further promote lipofuscin aggregation in a positive feedback loop [17, 18, 21]. Based on the above, intracellular aggregation of lipofuscin signifies an impaired cellular status and deregulated homeostasis.

The quantification of lipofuscin is regarded as being of high importance for a wide range of life sciences and related disciplines. Lipofuscin levels seem to provide a lifetime history of cumulative exposure to metabolic stress and, thus, are directly related to the aging process and bear pathophysiological relevance [19, 21–23]. Increasing evidence supports a linear correlation of lipofuscin levels with age and age-related diseases [19, 21, 24]. This is rather well anticipated given that the number of senescent cells in tissues and organs increases with age as stress and damage accumulates [3–7, 20]. Interestingly, some age determination methods of organisms based on the quantification of lipofuscin have been described

[25–29], while a broad spectrum of age-related disorders, including Alzheimer's and Parkinson's disease, age-related macular degeneration, heart failure and others, have been associated with tissue and organ lipofuscin accumulation [19, 30–33]. Of note, early studies showed increased lipofuscin levels with age in peripheral human lymphocytes and plasma cells [34]. In addition, the presence of lipofuscin pigments was reported in erythrocyte membranes of Alzheimer's patients [35].

A number of studies provide indications that lipofuscin also exists in a soluble form in different body fluids. More specifically, Feng et al. claimed that lipofuscin concentrations detected in the plasma of human cases exhibited significantly higher levels than those observed in the saliva [36]. Similarly, detectable lipofuscin levels have also been reported in the plasma of mice [37]. Indirect evidence regarding the existence of lipofuscin in the plasma or blood serum based on its autofluorescence properties (soluble lipofuscin fluorophores) have also come in light [38–45]. Some of these reports focused on the putative correlation of lipofuscin levels in body fluids (mainly plasma) with age and different pathologies, in an attempt to establish a sensitive and reliable method for detecting and monitoring both aging and disease [38, 40, 42, 43, 46].

Yet a number of inherent difficulties are related with the measurement of lipofuscin to a good precision. Lipofuscin composition varies considerably between different tissues, organs, and species, thus leading to differences in distribution, staining, solubility, and enzymatic activity [47–49]. Additionally, this complicated mixture of oxidized macromolecules exhibits autofluorescent properties that possibly rely on Schiff bases formed by reactions between carbonyls and amino residues [18]. Broad deviations in excitation and emission (wavelengths ranging from 320 to 480 nm and from 460 to 630 nm, respectively) pose serious difficulties to methods based on direct spectroscopic characterization [14, 24, 50]. As a result, both the accuracy and the credibility of the available quantification methods to date, most of which rely mainly on lipofuscin autofluorescence, have received severe criticism.

Based on the excellent specificity of GL13 reagent, we describe a rapid, highly specific and precise protocol for detecting and measuring soluble lipofuscin levels in cell culture supernatants, body fluids as well as cell and tissue homogenates. In brief, lipofuscin is initially isolated from the studied biological samples according to the modified Folch extraction method [51], resuspended and treated with GL13 to saturation. Then, a primary anti-biotin antibody is applied and after incubation, a secondary antibody is used for detecting the lipofuscin–GL13 complex via a chemiluminescence reaction. Finally, lipofuscin levels are quantified on the basis of the resulting signal intensity (*see* Fig. 1). For determining the crude lipofuscin content of analyzed samples, luminescence is measured and signal intensity is matched with the

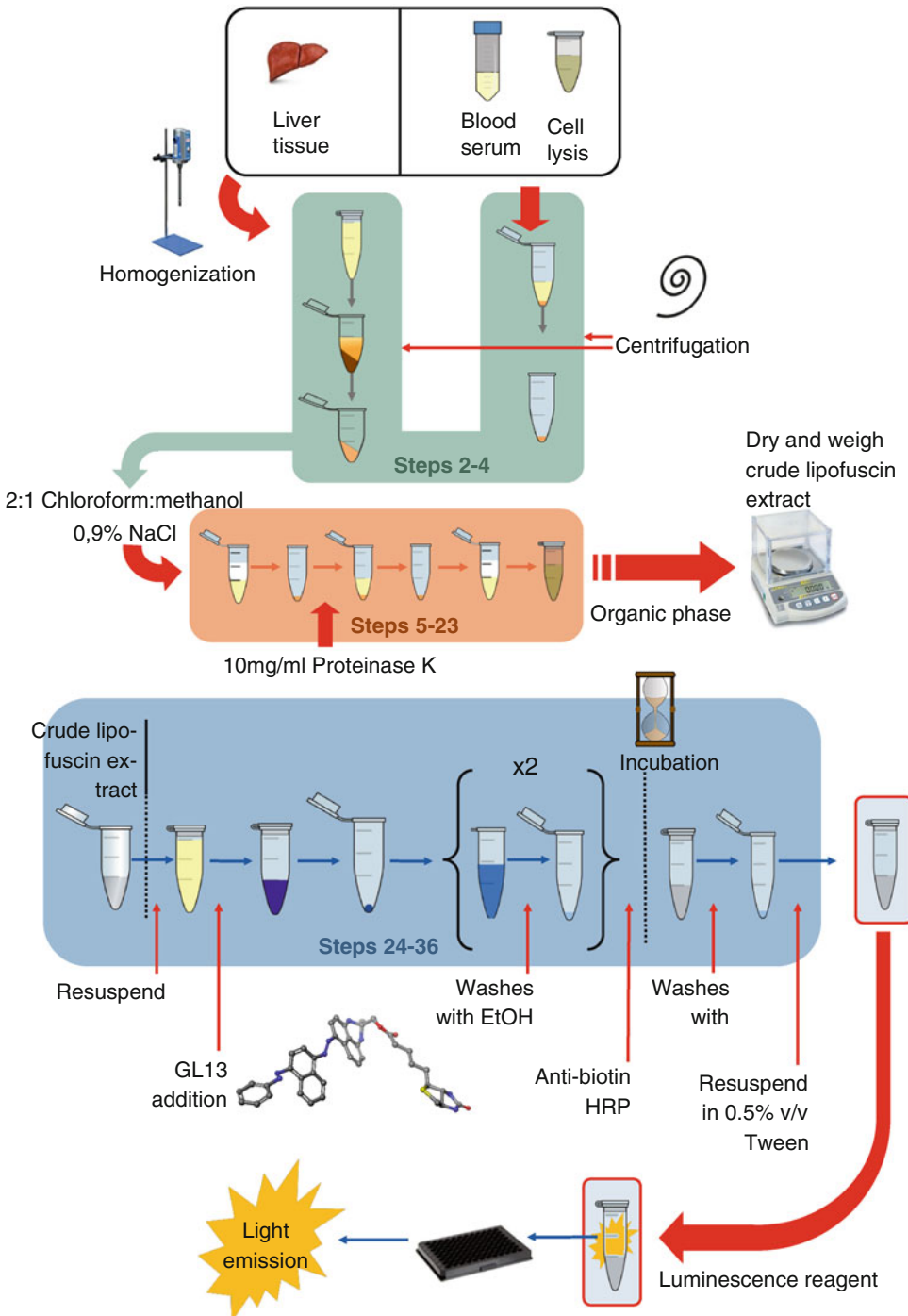


Fig. 1 Schematic workflow of lipofuscin isolation and detection procedures using different biological specimens. A diagram depicting key components of the protocol, as described in experimental procedure. Lipofuscin is isolated from homogenized human liver tissue, human blood serum, and cell lysates using chloroform–methanol and 10 mg/ml proteinase K incubation and centrifugation. Lipofuscin is dissolved in

corresponding values of a calibration curve created by following a similar protocol with the exception of lipofuscin being extracted from fresh aged human liver tissue. While in the young samples, lipofuscin levels were low [Relative Light Units (RLU): 10-471], in those obtained from aged individuals, we observed a 7.6-fold increase in measurement (RLU: 486-3.252). These findings not only provide an indication of the baseline levels of lipofuscin in humans (young cases) and of its distribution in elderly individuals, but also clearly confirm the linear correlation between lipofuscin and age, further denoting its putative role as a biomarker for monitoring the aging process (*see* Fig. 2). A stepwise scheme has been applied for validating the protocol (*see* Fig. 3). First, cell extracts from cellular models with established senescence and their corresponding, senescence-negative controls were analyzed and differences in lipofuscin levels were measured (*see* Fig. 3). Measurements showed a significant increase in soluble lipofuscin levels in the samples obtained from senescent cells in comparison to those from untreated cells [HBEC-CDC6 Tet-Off vs HBEC-CDC6 Tet-On (6 days on induction), Saos-2 p21^{WAF1/Cip1} Tet-Off vs Saos-2 p21^{WAF1/Cip1} Tet-On (10 days induction)] (*see* Figs. 1 and 3). Subsequently, we extracted intracellular lipofuscin from the same cellular models and repeated the quantification assay (*see* Fig. 1). The protocol was then implemented for determining lipofuscin in blood sera from young (controls) and aged but “healthy” individuals as well as patients suffering from different kinds of pathologies. These included heart failure, neurodegenerative disorders (dementia), rheumatoid arthritis and cancer (*see* Table 1, Fig. 4a, b). Clinical sample collection and their experimental use were approved by the Bio-Ethics Committee of Medical School of Athens, in accordance with the Declaration of Helsinki and local laws and regulations. Written consent was also obtained from the patients. As an additional level of validation, lipofuscin levels measured in human tissues by the herein presented GL13-based chemiluminescence assay were correlated with lipofuscin concentration in the same tissues as assessed by the hybrid histochemistry–immunohistochemistry method [8] (*see* Fig. 5). Further control experiments included electron microscopy in order to verify that the extracted material exhibits morphological features similar to those described for isolated lipofuscin [54] (*see* Fig. 6).

The current method allows for an accurate estimation of soluble lipofuscin levels practically in any biological material. Given that

Fig. 1 (continued) organic phase, which is evaporated and weighed. Crude lipofuscin extract is resuspended in 1% v/v Tween 20/TBS. After centrifugation, the pellet is resuspended in EtOH 50% and the biotin-conjugated SBB analog (GL13) is added. GL13 binds to lipofuscin and the anti-biotin HRP antibody binds to the biotin moiety of GL13. HRP will react upon addition of luminescent substrate (luminol and H₂O₂) and light will be emitted. Concentration of lipofuscin in each sample is linearly proportional to light intensity

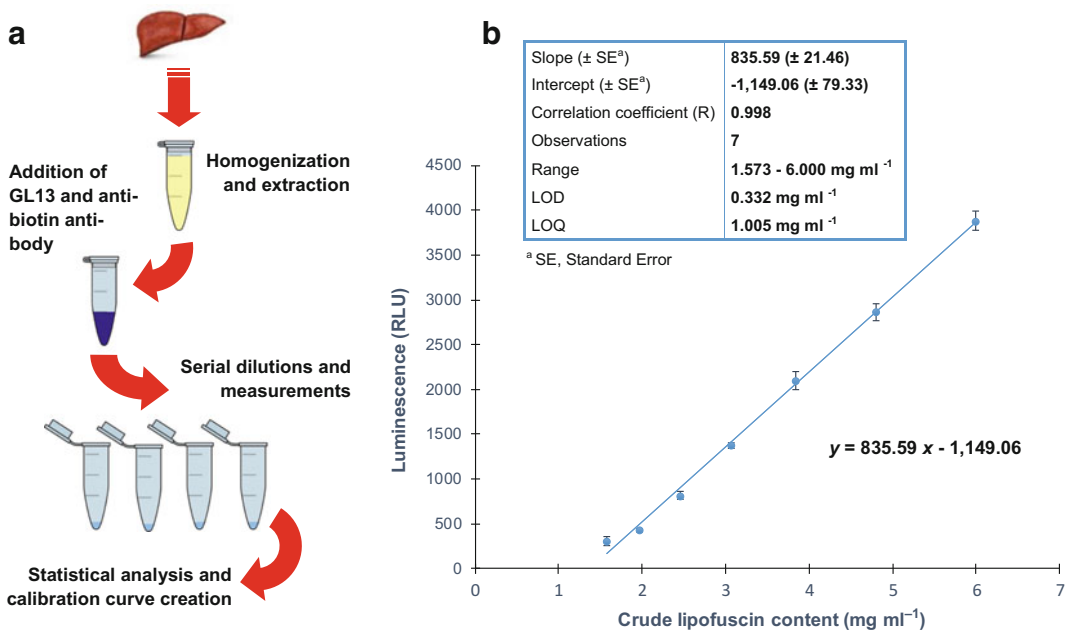


Fig. 2 (a) Schematic summary of the procedure implemented to create a calibration curve. The calibration curve is constructed by following **steps 1-III to 34** as described in experimental procedure, with the exception of preparing 5–7 serial dilutions of the sample obtained after **step 31** (dilution of each sample by 20% using 0.5% v/v Tween 20/TBS buffer). Measurements are recorded on an Excel spreadsheet and linear regression analysis is performed. Determination of back calculated values may be assisted by using the Data analysis add-in of Microsoft Excel and implementing manual functions. (b) The calibration curve for the determination of crude lipofuscin content in liver tissue samples along with related parameters and metrics. Linear regression analysis has been performed with no weighting factors, while the 0.0 point was neither included nor the curve forced through it upon fitting (Error bars, 95% confidence intervals; $n = 3$). The LOD and LOQ values are determined as $3.3 \times S_y/\text{slope}$ and $10 \times S_y/\text{slope}$, respectively, where S_y is the standard error of the response at low concentration. Back calculated values exhibited error values lower than 10.6%, demonstrating the validity of the calibration curve

lipofuscin concentration has often been associated to age and various age-related diseases [19, 25–33], the applicability domain of the protocol presented herein is particularly broad. The determination of lipofuscin distribution in human body fluids according to age, gender or any other epidemiological characteristic is now feasible in the general population. To our knowledge, this issue has not been sufficiently addressed in the past. Furthermore, the method itself may well promote biomedical and clinical investigations on whether soluble lipofuscin levels could serve as a putative biomarker of aging and/or disease. In this context, wide-scale screening of populations, as well as groups of differences in age and disease, is likely to assist in determining cases that are at “risk,” despite a “young” and/or “healthy” phenotype, hence providing a new tool for early detection. Additionally, monitoring lipofuscin in the blood serum could provide valuable information on patient

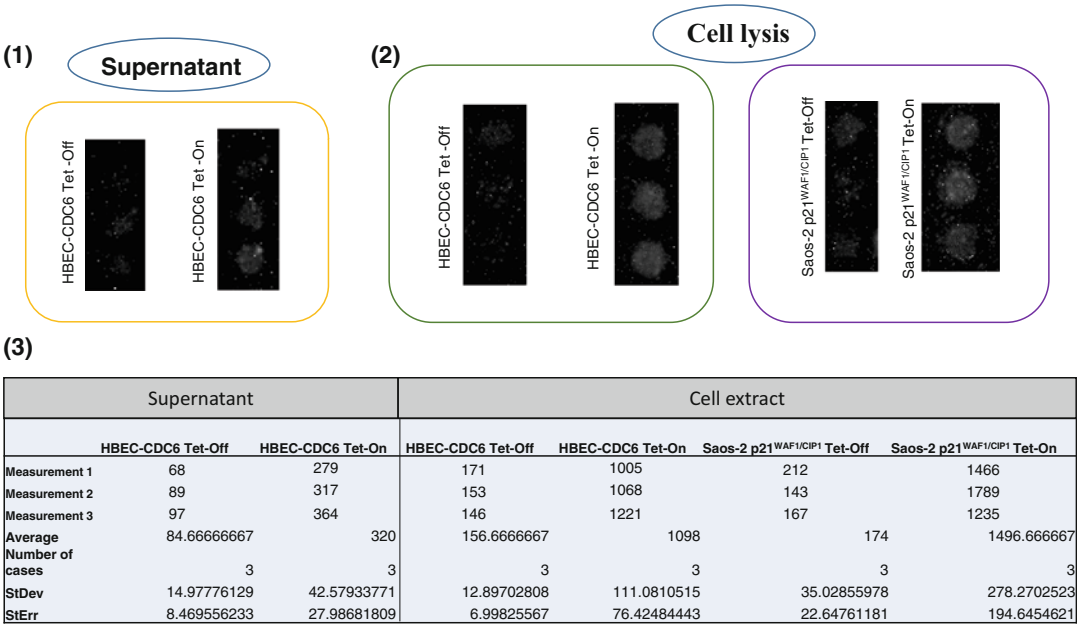


Fig. 3 Lipofuscin detection with GL13 and chemiluminescence after isolation from cell culture supernatant and cell lysis. (1) Images showing chemiluminescence intensity from supernatant of HBEC-CDC6 Tet-Off and Tet-On cell lines. (2) Images showing chemiluminescence intensity of cell extracts derived from cellular models with established senescence (HBEC-CDC6 Tet-On and Saos-2 p21^{WAF-1} Tet-On) in comparison with their corresponding, senescence-negative controls (HBEC-CDC6 Tet-Off and Saos-2 p21^{WAF-1} Tet-Off). (3) Table showing the values and the statistical data of chemiluminescence intensity measurements in each group and sample

Table 1
Groups of human specimens used for measuring soluble lipofuscin levels along with their health condition and number of individual samples

Biological specimen	Condition/disease (age, in years)	Number of samples
Blood serum	Young healthy (21–25)	10
Blood serum	Aged healthy-MRMF ^a (65–94)	10
Blood serum	Heart failure (62–85)	10
Blood serum	Neurodegenerative diseases/dementia (49–94)	10
Blood serum	Rheumatoid arthritis (27–67)	10
Blood serum	Cancer (55–83)	10
Follicular fluid	Infertile women (33–46)	5
Follicular fluid	Oocyte donors (normal) (23–27)	5

^aMedical record plus medications-free

outcome, recurrence of disease and response to therapeutic interventions toward a personalized medicine strategy. Moreover, new drug leads could be screened in a high-throughput manner for their effect on cellular senescence, thus facilitating discovery of senolytics, an emerging and highly promising class of bioactive compounds [55]. Other potential applications might involve the food industry, where monitoring superior quality properties such as

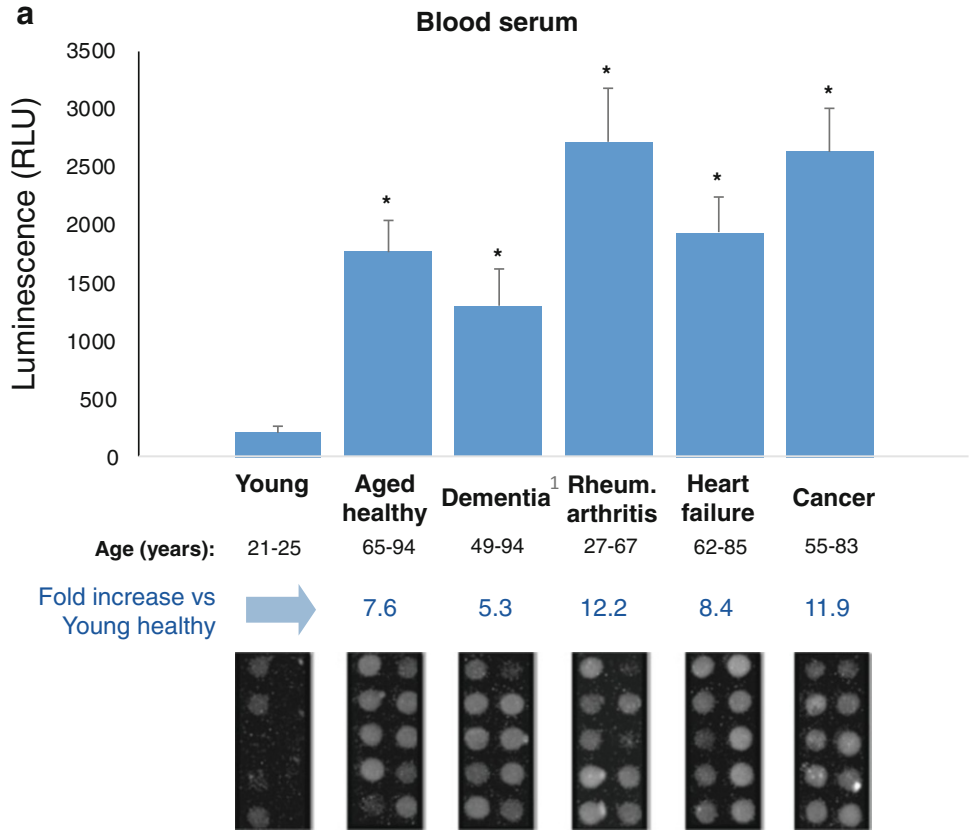


Fig. 4 (a) Graph showing luminescence intensity of serum samples derived from different groups of individuals ($n = 10$ in each group) after treatment with GL13. Clear differences in lipofuscin levels are evident between samples from young and aged “MRMF” individuals but also between young healthy individuals and others falling under various pathological entities. The measurements in aged and pathological samples correspond to increase of lipofuscin levels ranging between 5.3-fold and 12.2-fold in comparison to young healthy samples (Error bars, Standard Error; *, $P < 0.05$). **(b)** Graph showing chemiluminescence intensity of follicular fluid samples derived from different groups of individuals ($n = 5$ in each group) after treatment with GL13. It has been previously shown that an altered redox state of follicular fluid albumin influences the viability of aspirated human oocytes [52]. Lipofuscin accumulation in the form of inclusions within oocytes is associated with a significantly reduced fertilization rate and unfavorable blastocyst development [53]. Clear differences in lipofuscin levels are evident between samples from normal oocyte donors and infertile women. Our results confirmed this notion in follicular fluid, showing an eightfold increase in lipofuscin among infertile women compared to normal donors. The measurements obtained from these samples correspond to a 7.5-fold increase of lipofuscin levels in comparison to normal donor samples (Error bars, Standard Error; *, $P < 0.05$)

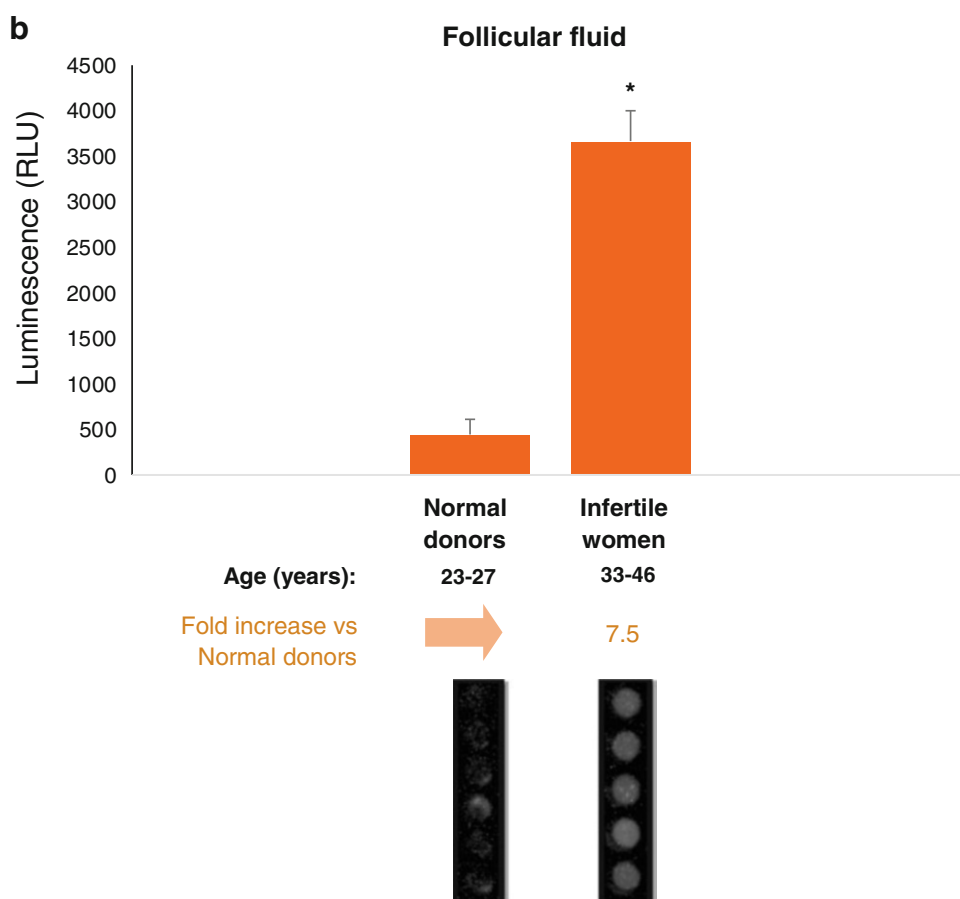


Fig. 4 (continued)

age, freshness and health of consumable organisms are of great commercial importance. A similar approach has been followed in demographic analyses of economically important species (e.g., the blue crab *Callinectes sapidus*) by measuring extracted fluorescence [29], yet with the drawbacks of conventional methodologies [28, 56, 57]. Finally, the method could be exploited by the cosmetics industry in order to monitor the efficiency and response to rejuvenation-treatments and antiaging products.

In only a limited number of available reports, soluble lipofuscin levels were measured using a spectrophotometer according to the Tsuchida method that is based on lipofuscin autofluorescence in the blood serum. The concentration of fluorophores is expressed in arbitrary units in comparison to the fluorescence of a quinine sulphate reference [29, 40, 57]. The major disadvantage of this approach is that, apart from lipofuscin, several other fluorophores exist in the blood and its derivatives, as is the case with other tissues. These fluorophores include a wide spectrum of molecules such as amino acids (tryptophan) and proteins (albumin, enzymes and

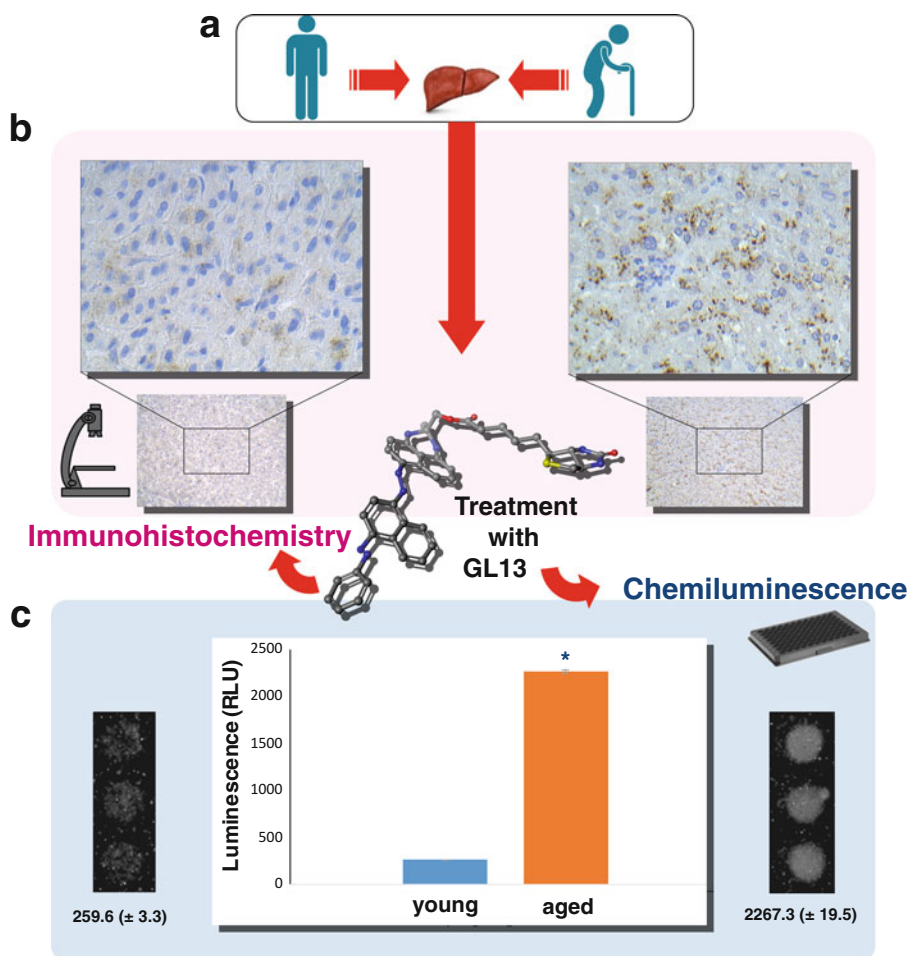


Fig. 5 Schematic illustration summarizing two alternative procedures that can depict lipofuscin accumulation in human liver tissue with the use of the biotinylated SBB analog GL13. **(a)** Human liver tissue samples were isolated from young (left) and aged (right) individuals. **(b)** Part of the tissue was formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) and used for light microscopy. The histochemical–immunohistochemical assay was performed in FFPE tissues using GL13, showing evident differences in lipofuscin levels between young and aged samples at the 100× and 400× magnifications. **(c)** Another part of each human liver tissue sample was homogenized, and lipofuscin was isolated and treated with GL13. The resulting luminescence was measured as described in experimental procedure. The analysis shows an eightfold increase of lipofuscin levels in young compared to aged liver tissue samples, in agreement with the microscopic observations (measurements in Relative Light Units ± Standard Error, $n = 3$; *, $P < 0.05$)

others), porphyrins, carotenoids, vitamins (vitamin A, riboflavin, thiamine), pyridine nucleotides (NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺), pyridoxic acid lactone, pyridoxal phosphate Schiff bases, and protein-bound bilirubin [23, 57–59]. Given that their fluorescence spectra are highly similar to those of lipofuscin, they may well interfere with measurements, thus producing serious analytical errors. Therefore, the specificity of the aforementioned method in

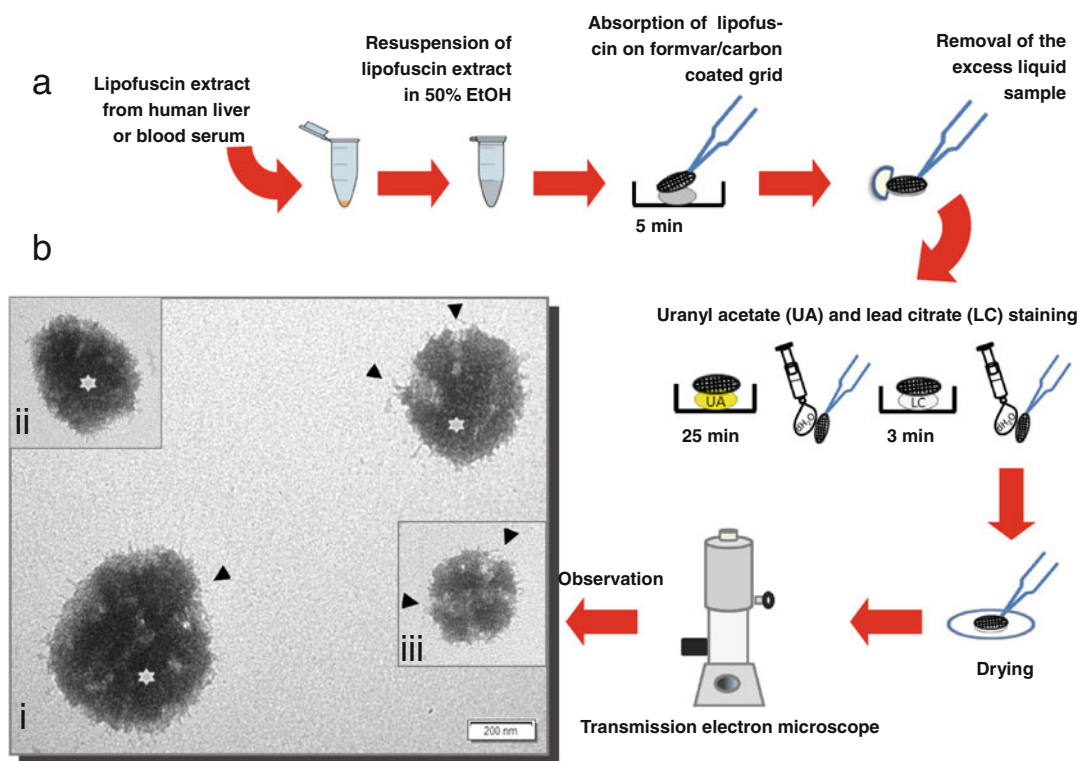


Fig. 6 Lipofuscin extract observation under a transmission electron microscope (TEM). **(a)** Diagrammatic representation of the procedure followed for the preparation and positive staining of the lipofuscin sample on a formvar/carbon coated grid. The grid with the absorbed/stained lipofuscin sample was observed under a TEM operating at 80 KV and equipped with a digital camera. **(b)** Transmission electron micrographs of lipofuscin formations exhibiting the same morphology whether extracted from human liver tissue (**i**) or from blood serum (**ii**, **iii**). Lipofuscin formations were characterized by small electron-lucent areas (arrowheads) indicating the localization of lipid components, and wide electron-dense areas exhibiting very fine vacuolization (asterisks). Scale bar: 200 nm

determining lipofuscin levels has been strongly questioned. In addition, the estimation of lipofuscin levels is rather relative and lacks accuracy when using a standard curve based on a quinine sulphate reference [29, 40, 57]. In line with the above, fluorimetry has been extensively criticized when exploited in marine biology for determining the age of aquatic organisms. The main concerns raised were the absence of specificity which is not counterbalanced by high-throughput assays, the poor correlation between extracted fluorescence and in situ lipofuscin levels, and the lack of evidence that normalization to cellular protein content actually leads to a reliable lipofuscin assay [56]. A flow-cytometric (FACS) approach for the quantification of extractable neurolipofuscin again exhibited fundamental precision pitfalls [22]. Our proposed method specifically detects lipofuscin by exploiting the unique features of GL13 in a rapid, simple and straightforward manner. Electron microscopy

analysis confirmed the morphological characteristics of lipofuscin in the extracted material [54] (*see* Fig. 6). Moreover, the calibration curve presented herein is designed to directly correlate crude lipofuscin concentration with its corresponding chemiluminescence signal, thus enabling self-consistent, precise and convenient measurements in a range of different samples (*see* Fig. 2). Lastly, a strong correlation between chemiluminescence measurements (amount of crude lipofuscin) and in situ lipofuscin concentration was observed in control experiments (*see* Fig. 5).

Another approach described by Feng et al. used an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit provided by the Shanghai Huyu Biological Technology Co. Ltd. to estimate lipofuscin levels in human saliva and plasma [36]. A comparison with our method is not feasible since no details regarding the kit or its composition (particularly which component of lipofuscin the applied primary antibody reacts against) are available in the literature. Since its publication in 2015, and to the best of our knowledge, the above method and its accompanying kit have never been used elsewhere by the same or other researchers. Similar issues exist with the Human Quantitative Competitive ELISA Lipofuscin (LPF) kit distributed by MyBioSource (catalog # MBS7230952). Since the composition of lipofuscin varies considerably among different tissues and species [47–49], particularly with respect to the protein fraction, the ELISA assay raises serious concerns about the lipofuscin module targeted by the primary antibody and, to an extent, about the specificity, sensitivity, accuracy and suitability of the overall method. No information on this matter exists in the literature.

2 Materials

2.1 Lipofuscin Isolation

1. Chloroform.
2. Methanol.
3. 0.9% sodium chloride in dH₂O.
4. 10 mg/ml proteinase K.
5. 20× TBS. Dissolve 121 g of Tris ultrapure in 800 ml of dH₂O. Adjust the pH to 7.4 with concentrated HCl.
6. 1× TBS in dH₂O.
7. 50% (vol/vol) ethanol absolute in 1× TBS.
8. Greiner Microton Black 96-well plate.
9. Centrifuge.
10. Homogenizer.
11. Rotary evaporator with vacuum controller and vacuum pump.

12. High vacuum pump.
13. Ultrasonic bath.
14. Analytical balance.
15. 50 ml round bottom flask.

2.2 Lipofuscin Detection Using GL13 and Chemiluminescence

1. 80 mg SenTraGor. Dissolve 80 mg of SenTraGor in 14.5 ml 100% ethanol and incubate for 120 min in water bath at 37 °C.
2. Chemiluminescence Reagent. Add equal volumes of Lumi-GLO Reagent A and Reagent B.
3. Anti-biotin HRP-linked antibody diluted 1:1000 in 0.1% v/v Tween 20/TBS.
4. Tween 20.
5. Fluorchem HD2 system equipped with a CCD camera.

2.3 Positive Staining of Lipofuscin for Electron Microscopy

1. Uranyl acetate.
2. Lead citrate.
3. Formvar/carbon-coated copper grids, 200 mesh.
4. Tweezers, antimagnetic stainless steel, style #5.
5. Grid-box for storage of grids.
6. Electron microscope.

3 Experimental Procedure

3.1 Lipofuscin Isolation (Timing: 4–5 h)

1. *I. Human blood serum:* Transfer 500 µl of serum in 1.5 ml Eppendorf (see **Notes 1** and **2**, Table **2**).
- II. Cell lysis:* Incubate cell pellet with Co-IP lysis buffer for 60 min at 4 °C.
- III. Liver tissue:* Homogenize tissue using PBS 1× 2–3 times for 20–30 s each, pausing for 10–15 s between each homogenization and placing samples on ice.
2. Centrifuge at 6–8 °C for 10 min at $232 \times g$.
3. Transfer supernatant in 1.5 ml eppendorf.
4. Centrifuge at 6–8 °C for 10 min at $7400 \times g$ to sediment lipofuscin (see **Note 3**).
5. Resuspend the pellet in a mixture 2:1 chloroform and methanol (see **Notes 4** and **5**).
6. Dilute sample by 20% using a solution of 0.9% NaCl in distilled water and vortex.
7. Use ultrasonication for 1 min to enhance resuspension and transfer lipofuscin to organic phase (see **Notes 6** and **7**, Table **2**).

Table 2
Troubleshooting

Step	Problem	Possible reason	Solution
1 I	Low amount of pellet	Low lipofuscin content in blood serum	Increase volume of blood serum sample
7	Large amounts of lipofuscin trapped in intermediate phase	Sonication conditions not optimal	Increase sonication time. This step is crucial to transfer chloroform-insoluble lipofuscin components in organic phase
23	Solvent is not completely evaporated under a 474 mbar vacuum	Traces of the aqueous phase have been isolated along with the organic phase	Gradually increase vacuum in rotary evaporator down to 72 mbar and extend evaporation time
24	Incomplete precipitation of lipofuscin	Speed of centrifugation	Increase centrifuge acceleration up to $7400 \times g$
25	Amount of GL13 not sufficient to saturate lipofuscin content of sample	High levels of lipofuscin in analyzed sample	Increase volumes of GL13 stock solution and EtOH 50% resuspension solution in same proportions
32	Poor resuspension of crude lipofuscin extract in 0.5% v/v Tween 20/TBS buffer	Excess amount of lipofuscin	Incubate for 5–10 min in water bath at 37 °C

8. Incubate the samples for 15 min at room temperature with gentle shaking.
9. Centrifuge at $3700 \times g$ for 10 min at 6–8 °C.
10. Remove the aqueous (upper) phase using a pipette.
11. Transfer and keep organic phase in 1.5 ml eppendorf.
12. Incubate intermediate phase with 10 mg/ml Proteinase K for 30 min at 37 °C with gentle shaking (*see Note 8*).
13. Centrifuge at $3700 \times g$ for 10 min at 6–8 °C.
14. Discard supernatant and resuspend pellet in a mixture 2:1 chloroform: methanol (*see Note 4*).
15. Dilute by 20% using 0.9% NaCl in distilled water and vortex.
16. Incubate the mixtures for 15 min at room temperature with gentle shaking.
17. Centrifuge at $3700 \times g$ for 10 min at 6–8 °C.
18. Using a pipette, remove (upper) aqueous phase (*see Note 9*).
19. Transfer and keep organic phase in 1.5 ml eppendorf.
20. Merge organic phase samples from **steps 11** and **19**, transfer into a preweighed 50 ml round bottom flask and evaporate solvent using a rotary evaporator apparatus and a heating bath at 37 °C (*see Notes 10* and **11**).

21. Connect the round bottom flask to a high vacuum pump for 10 min.
22. Use an analytical balance to weigh the spherical flask and determine the weight of the dried crude lipofuscin content.
23. Resuspend crude lipofuscin extract in 1% v/v Tween/TBS using ultrasonication for 5–10 min at 37 °C (*see* **Notes 12 and 13**, Table 2).

3.2 Lipofuscin Detection Using GL13 and Chemiluminescence (Timing: 4–5 h)

24. Centrifuge at $7400 \times g$ for 10 min at 6–8 °C (*see* **Note 14**, Table 2).
25. Resuspend pellet in 200 μ l EtOH 50% and add 7.5 μ l of the GL13 stock solution. Incubate for 8 min at room temperature with gentle shaking (*see* **Notes 15 and 16**, Table 2).
26. Centrifuge at $7400 \times g$ for 10 min at 6–8 °C.
27. Wash with 500 μ l of EtOH 50% and centrifuge at 6–8 °C for 10 min at $7400 \times g$ (*see* **Note 17**).
28. Resuspend pellet in 100 μ l of TBS 1 $\times$.
29. Add the anti-biotin HRP-linked antibody diluted 1:1000 in 0.1% v/v Tween 20/TBS to each sample. Incubate for 120 min at room temperature with gentle shaking (*see* **Note 18**).
30. Centrifuge at $7400 \times g$ for 10 min at 6–8 °C.
31. Wash with 200 μ l TBS 1 $\times$ and centrifuge at $7400 \times g$ for 10 min at 6–8 °C. Repeat this step twice.
32. Resuspend the lipofuscin pellet in 90 μ l 0.5% v/v Tween 20/TBS and transfer the solution in a 96-well plate (*see* **Note 19**, Table 2).
33. Mix equal volumes of chemiluminescence substrate Lumiglo[®] Reagent A and B in a plastic tube protected from light (*see* **Note 20**).
34. Add 10 μ l (dilution factor: 1/10) of chemiluminescence solution in every sample-containing well.
35. After 1 min approximately, measure emitted light using a multiplex chemiluminescence imaging system.
36. Quantify luminescence intensity with AlphaView software v1.3.0.7.

3.3 Positive Staining of Lipofuscin for Electron Microscopy (Timing: 1 h)

1. In samples derived from **step 19** of the experimental procedure, add 20 μ l EtOH 50% and resuspend.
2. Place drops of 5–10 μ l of liquid sample onto a sheet of Parafilm in a petri dish.
3. Place formvar/carbon-coated 200 mesh copper grids on drops of liquid sample and allow to absorb for 5 min at RT.

4. Wick away excess liquid sample from each grid applying carefully the torn edge of Whatman filter paper at the edge of the grid.
5. Immediately float the grids on filtered drops (20–30 μl) of 7% uranyl acetate (aqueous solution) onto a sheet of Parafilm in a petri dish. Stain for 25 min at room temperature in the dark.
6. Wash grids under a stream of distilled water.
7. Drain the grids.
8. Float the grids on filtered drops (20–30 μl) of 0.4% lead citrate (aqueous solution) onto a sheet of Parafilm in a petri dish. Place NaOH tablets or 10 N NaOH solution droplets around the Parafilm sheet in the petri dish to create a dry alkaline atmosphere, lacking CO_2 . Stain each grid for 3 min at room temperature (*see Note 21*).
9. Immediately apply very short (~ 2 s) washes of the grids with 0.02 N NaOH solution and then wash thoroughly under a stream of distilled water.
10. Dry the grids and store them in a grid box.
11. Observe the grids under a transmission electron microscope.

4 Notes

General: Precise and careful handlings during various steps of the protocol are required.

1. Fresh—or stored for a short period of time—biological material is preferred. It has been shown that during long term storage, blood derivatives may lose their osmotic, hemostatic, immunologic and other physiological properties, as more proteins included in the samples tend to transform into lipofuscin with time [60].
2. Low amount of pellet indicates low lipofuscin content in the sample. To overcome this, increased sample volume should be analyzed.
3. The molecular weight of lipofuscin is similar to that of mitochondria.
4. Chloroform and methanol are hazardous chemicals. Avoid contact with skin, eyes and airways.
5. The usage of chloroform when extracting lipofuscin is associated with a variety of health, security, and regulatory issues. Dichloromethane/methanol could replace the employed chloroform/methanol steps in order to bypass these issues [61].
6. Ultrasonication contributes in dissolving chloroform-insoluble lipofuscin components.

7. If large amounts of lipofuscin are trapped in intermediate phase increase the duration of sonication. This step is crucial to transfer chloroform-insoluble lipofuscin components into the organic phase.
8. Proteinase K will release lipids from lipoprotein structures in order to enable quantification of chloroform-insoluble lipofuscin.
9. It is important to remove the aqueous phase without entering the organic phase to avoid decrease in lipofuscin levels.
10. Chloroform should be totally evaporated. If possible, use a rotary evaporator connected to a vacuum controller and set the cut-off value at 474 mbar. Evaporation time depends on total solvent volume.
11. If the solvent is not completely evaporated under 474 mbar vacuum, probably due to traces of the aqueous phase that have been isolated along with the organic phase, gradually decrease vacuum in rotary evaporator down to 72 mbar and extend evaporation time.
12. It is important to ensure that lipofuscin is entirely resuspended.
13. Samples can be stored for 12 h at 4 °C.
14. Upon incomplete lipofuscin precipitation increase centrifuge acceleration up to $7400 \times g$.
15. The GL13 stock solution should be passed through a 0.22- μ m filter before use. For further details, see Evangelou et al. [8].
16. GL13 amounts should always be adjusted in a manner that ensures sufficient saturation of sample lipofuscin content.
17. Repeat this step several times (2–3 minimum). Observe color of supernatant. Washing has been sufficiently performed when supernatant is clear and transparent, without any blue haze or floating particles of SBB analog.
18. Avoid repeated freeze–thaw cycles of the anti-biotin HRP conjugate antibody which may result in reduced activation of the HRP enzyme.
19. Poor resuspension of crude lipofuscin extract in 0.5%v/v Tween 20/TBS buffer indicates excess in lipofuscin amounts. To address this issue incubate for 5–10 min in water bath at 37 °C.
20. The volume of chemiluminescence substrate depends on the number of samples.
21. Avoid breathing over the grids in order to prevent the formation of lead precipitates due to the addition of CO₂ in the atmosphere.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Alexandros Papalampros and Dr. Dimitrios Papadopoulos for providing material for this investigation. This work was financially supported by the “SYNTRAIN” ITN Horizon 2020 Grant No 722729, the NKUA SARG grants 70/3/12128, 70/3/8916, 70/3/1135 and the Welfare Foundation for Social & Cultural Sciences (KIKPE) Greece.

Conflict of interest:

The authors wish to declare no conflict of interest.

Patent pending: UK Patent Application No GB1803531.1.

References

- Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K et al (2013) Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging* (Albany NY) 5:37–50
- Evangelou K, Gorgoulis VG (2017) Sudan Black B, The specific histochemical stain for lipofuscin: a novel method to detect senescent cells. *Methods Mol Biol* 1534:111–119
- Bartkova J, Rezaei N, Lontos M et al (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444:633–637
- Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol* 22:816–827
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319:1352–1355
- Herbig U, Ferreira M, Condel L et al (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311:1257
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L et al (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194–1217
- Evangelou K, Lougiakis N, Rizou SV et al (2017) Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging Cell* 16:192–197
- Galanos P, Vougas K, Walter D et al (2016) Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat Cell Biol* 18:777–789
- Komseli ES, Pateras IS, Krejsgaard T et al (2018) A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence. *BMC Genomics* 19:37
- Barbouti A, Evangelou K, Pateras IS et al (2018) In situ evidence of cellular senescence in Thymic Epithelial Cells (TECs) during human thymic involution. *Mech Ageing Dev.* pii:S0047-6374(17)30300-7
- Ivy G, Kanai S, Ohta M et al (1988) Lipofuscin-like substances accumulate rapidly in brain, retina and internal organs with cysteine protease inhibition. *Adv Exp Med Biol* 266:31–45
- Ivy G, Roopsingh R, Kanai S et al (1996) Leupeptin causes an accumulation of lipofuscin-like substances and other signs of aging in kidneys of young rats: further evidence for the protease inhibitor model of aging. *Ann N Y Acad Sci* 786:12–23
- Brunk UT, Terman A (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33:611–619
- Terman A, Gustafsson B, Brunk UT (2006) The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact* 163:29–37
- Terman A, Kurz T, Navratil M et al (2010) Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 12(4):503–535
- Höhn A, Grune T (2013) Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 19(1):140–144

18. Jung T, Höhn A, Grune T (2014) The proteasome and the degradation of oxidized proteins: part II protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol* 2:99–104
19. König J, Ott C, Hugo M et al (2017) Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol* 11:673–681
20. Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B et al (2017) Mitochondria in cell senescence: is mitophagy the weakest link? *EBioMedicine* 21:7–13
21. Gaspar J, Mathieu J, Alvarez PJJ (2016) A rapid platform to generate lipofuscin and screen therapeutic drugs for efficacy in lipofuscin removal. *Mater Meth Technol* 10:1–9 ISSN 1314-7269
22. Sheehy MR (2002) A flow-cytometric method for quantification of neurolipofuscin and comparison with existing histological and biochemical approaches. *Arch Gerontol Geriatr* 34:233–248
23. Di Guardo G (2015) Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *Eur J Histochem* 59:2485
24. Seehafer SS, Pearce DA (2006) You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. *Neurobiol Aging* 27:576–588
25. Bluhm BA, Brey T (2001) Age determination in the Antarctic shrimp *Notocrangon antarcticus* (Crustacea: Decapoda), using the autofluorescent pigment lipofuscin. *Mar Biol* 138:247–257
26. Bluhm BA, Brey T, Klages M (2001) The autofluorescent age pigment lipofuscin: key to age, growth and productivity of the Antarctic amphipod *Waldeckia obesa* (Chevreux, 1905). *J Exp Mar Bio Ecol* 258:215–235
27. Cassidy KM (2008) Use of extractable lipofuscin as an age biomarker to determine age structure of ghost shrimp (*Neotrypaea californiensis*) populations in west coast estuaries. Dissertation. Oregon State University
28. Harvey HR, Secor DH, Ju SJ (2008) The use of extractable lipofuscin for age determination of crustaceans: reply to Sheehy. *Mar Ecol Prog Ser* 353:307–311
29. Puckett JB, Secor DH, Ju SJ (2008) Validation and application of lipofuscin-based age determination for Chesapeake Bay Blue Crabs *Callinectes sapidus*. *Trans Am Fish Soc* 137:1637–1649
30. Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA (2000) The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1981–1989
31. Meredith GE, Totterdell S, Petroske E et al (2002) Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 956:156–165
32. Moreira PI, Siedlak SL, Wang X et al (2007) Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease. *Autophagy* 3:614–615
33. Nozyski J, Zakliczynski M, Konecka-Mrowka D et al (2013) Advanced glycation end products and lipofuscin deposits share the same location in cardiocytes of the failing heart. *Exp Gerontol* 48:223–228
34. Beregi E, Regius O (1983) Lipofuscin in lymphocytes and plasma cells in aging. *Arch Gerontol Geriatr* 2:229–235
35. Skoumalová A, Mádllová P, Topinková E (2012) End products of lipid peroxidation in erythrocyte membranes in Alzheimer's disease. *Cell Biochem Funct* 30:205–210
36. Feng FK, E LL, Kong XP et al (2015) Lipofuscin in saliva and plasma and its association with age in healthy adults. *Aging Clin Exp Res* 27:573–580
37. Wu CX, Wei XB (2006) Influence of effective parts of *Zingiber officinale* on senium of rats resulting from high fat die. *J Shandong Med Coll* 3:010
38. Hegedus ZL, Frank HA, Steinman TI et al (1988) Elevated levels of plasma lipofuscins in patients with chronic renal failure. *Arch Int Physiol Biochim* 96:211–221
39. Tsuchida M, Miura T, Mizutani K et al (1985) Fluorescent substances in mouse and human sera as a parameter of in vivo lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 834:196–204
40. Roumen RM, Hendriks T, de Man BM et al (1994) Serum lipofuscin as a prognostic indicator of adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Br J Surg* 81:1300–1305
41. Sutherland WH, Williams MJ, de Jong SA (2007) Plasma protein lipofuscin-like fluorophores in men with coronary artery disease treated with statins. *Arch Med Res* 38:757–763
42. Skoumalová A, Ivica J, Šantorová P et al (2011) The lipid peroxidation products as possible markers of Alzheimer's disease in blood. *Exp Gerontol* 46:38–42
43. Kuznetsov A, Frorip A, Maiste A et al (2015) Visible auto-fluorescence in biological fluids as biomarker of pathological processes and new monitoring tool. *J Innov Opt Health Sci* 8(3):1541003–1541009

44. Tomečková V (2016) Monitoring of heart ischemia in blood serum. *Spectral Anal Rev* 4:11–22
45. Chmátalová Z, Vyháněk M, Laczó J et al (2016) Analysis of lipophilic fluorescent products in blood of Alzheimer's disease patients. *J Cell Mol Med* 20:1367–1372
46. Madhuri S, Vengadesan N, Aruna P et al (2003) Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignance. *Photochem Photobiol* 78:197–204
47. Sheehy MR, Roberts BE (1991) An alternative explanation for anomalies in "soluble lipofuscin" fluorescence data from insects, crustaceans, and other aquatic species. *Exp Gerontol* 26:495–509
48. Yin D (1996) Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med* 21:871–888
49. Mochizuki Y, Park MK, Mori T et al (1995) The difference in autofluorescence features of lipofuscin between brain and adrenal. *Zool Sci* 12:283–288
50. Croce AC, Bottiroli G (2014) Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem* 58:2461
51. Rózanowska M, Pawlak A, Rózanowski B et al (2004) Age-related changes in the photoreactivity of retinal lipofuscin granules: role of chloroform-insoluble components. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1052–1060
52. Otsuki J, Nagai Y, Matsuyama Y et al (2012) The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. *Syst Biol Reprod Med* 58:149–153
53. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K (2007) Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 24:263–270
54. Siakotos AN, Watanabe I, Pennington K et al (1973) Procedures for the mass isolation of pure lipofuscins from normal human heart and liver. *Biochem Med* 7:25–38
55. Chang J, Wang Y, Shao L et al (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22:78–83
56. Sheehy MRJ (2008) Questioning the use of biochemical extraction to measure lipofuscin for age determination of crabs: comment on Ju et al. (1999, 2001). *Mar Ecol Prog Ser* 353:303–306
57. Crowley CE, Gandy RL, Daly KL et al (2014) Problems associated with a lipofuscin extraction method used to age blue crabs *Callinectes sapidus* cultured in Florida, USA. *Aquat Biol* 21:85–92
58. Manjunath S, Bola Sadashiva SR, Satyamoorthy K, et al (2014) Nature of autofluorescence in human serum albumin under its native, unfolding and digested forms. *Proc SPIE* 8935, advanced biomedical and clinical diagnostic systems. XII, 8935:893520
59. Wolfbeis SO, Leiner M (1985) Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. *Anal Chim Acta* 167:203–215
60. Hegedus ZL, Altschule MD, Frank HA et al (1985) Increase in plasma lipofuscin levels of stored blood. *Crit Care Med* 13:155–159
61. Cequier-Sánchez E, Rodríguez C, Ravelo AG et al (2008) Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J Agric Food Chem* 56:4297–4303

ARTICLE


<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16475-3>

OPEN

Chronic expression of p16^{INK4a} in the epidermis induces Wnt-mediated hyperplasia and promotes tumor initiation

Narmen Azazmeh¹, Benjamin Assouline¹, Eitan Winter², Shmuel Rupp², Yuval Nevo², Alexander Maly³, Karen Meir³, Agnieszka K. Witkiewicz⁴, Jonathan Cohen⁵, Sophia V. Rizou⁶, Eli Pikarsky^{3,7}, Chen Luxenburg⁵, Vassilis G. Gorgoulis^{6,8,9,10} & Ittai Ben-Porath¹✉

p16^{INK4a} (CDKN2A) is a central tumor suppressor, which induces cell-cycle arrest and senescence. Cells expressing p16^{INK4a} accumulate in aging tissues and appear in pre-malignant lesions, yet their physiologic effects are poorly understood. We found that prolonged expression of transgenic p16^{INK4a} in the mouse epidermis induces hyperplasia and dysplasia, involving high proliferation rates of keratinocytes not expressing the transgene. Continuous p16^{INK4a} expression increases the number of epidermal papillomas formed after carcinogen treatment. Wnt-pathway ligands and targets are activated upon prolonged p16^{INK4a} expression, and Wnt inhibition suppresses p16^{INK4a}-induced hyperplasia. Senolytic treatment reduces p16^{INK4a}-expressing cell numbers, and inhibits Wnt activation and hyperplasia. In human actinic keratosis, a precursor of squamous cell carcinoma, p16^{INK4a}-expressing cells are found adjacent to dividing cells, consistent with paracrine interaction. These findings reveal that chronic p16^{INK4a} expression is sufficient to induce hyperplasia through Wnt-mediated paracrine stimulation, and suggest that this tumor suppressor can promote early premalignant epidermal lesion formation.

¹Department of Developmental Biology and Cancer Research, Institute for Medical Research – Israel-Canada, The Hebrew University–Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel. ²Info-CORE, Bioinformatics Unit of the I-CORE Computation Center at the Hebrew University and Hadassah, Jerusalem, Israel. ³Department of Pathology, Hadassah-Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel. ⁴Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY, USA. ⁵Department of Cell and Developmental Biology, Sackler Faculty of Medicine Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel. ⁶Department of Histology and Embryology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ⁷The Lautenberg Center for Immunology and Cancer Research, Hebrew University of Jerusalem Faculty of Medicine, Jerusalem, Israel. ⁸Faculty Institute for Cancer Sciences, Manchester Academic Health Sciences Centre, University of Manchester, Manchester, UK. ⁹Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Athens, Greece. ¹⁰Center for New Biotechnologies and Precision Medicine, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece. ✉email: ittaibp@mail.huji.ac.il

Immunohisto(cyto)chemistry: an old time classic tool driving modern oncological therapies

Tomer Cooks^{1*}, Sofia DP Theodorou^{2*}, Eleni Paparouna^{2*}, Sophia V Rizou², Vassilios Myrianthopoulos^{2,3,4}, Vassilis G Gorgoulis^{2,5,6}, Ioannis S Pateras^{2#}

¹The Shraga Segal Department of Microbiology, Immunology and Genetics, Faculty of Health Sciences, Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva, 84105, Israel.

²Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 75 Mikras Asias St. GR-11527, Athens, Greece.

³Division of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Greece.

⁴PharmaInformatics Unit, Athena Research Center, Greece.

⁵Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou St. GR-11527 Athens, Greece.

⁶Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Wilmslow Road, Manchester, M20 4QL, UK.

*: equally contributing authors

#: corresponding author

E-mail for correspondence: ispasath2004@yahoo.com; ipateras@med.uoa.gr

Running Title: *In situ* assays guiding cancer therapy

Abstract

In the era of precision medicine immunohistochemistry (IHC) and immunocytochemistry (ICC) share some of the highlights in personalized treatment. Survival data obtained from clinical trials shape the cut-offs and IHC scoring that serve as recommendations for patient selection both for targeted and conventional therapies. Assessment of Estrogen and Progesterone Receptors along with HER2 status has been among the first approved immunostaining assays revolutionizing breast cancer treatment. Similarly, ALK positivity predicts the efficacy of ALK inhibitors in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). In recent years, Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) IHC assays have been approved as companion or complimentary diagnostic tools predicting the response to checkpoint inhibitors. Anti-PD-L1 and anti-PD-1 monoclonal antibodies have inaugurated a new period in the treatment of advanced cancers, but the path to approval of these biomarkers is filled with immunohistochemical challenges. The latter brings to the fore the significance of molecular pathology as a hub between basic and clinical research. Besides, novel markers are translated into routine practice, suggesting that we are at the beginning of a new exciting period. Unraveling the molecular mechanisms involved in cellular homeostasis unfolds biomarkers with greater specificity and sensitivity. The introduction of GL13 (SenTraGor®) for the detection of senescent cells in archival material, the implementation of key players of stress response pathways and the development of compounds detecting common mutant P53 isoforms in dictating oncological treatments are paradigms for precision oncology.

Key words: biomarkers; immunohistochemistry; immunocytochemistry; oncology; therapy

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins *in situ* during oncogene-induced senescence

Eirini-Stavroula Komseli^{1†}, Ioannis S. Pateras^{1†}, Thorbjørn Krejsgaard², Konrad Stawiski³, Sophia V. Rizou¹, Alexander Polyzos⁴, Fani-Marlen Roumelioti⁴, Maria Chiourea⁴, Ioanna Mourkioti¹, Eleni Paparouna¹, Christos P. Zampetidis¹, Sentiljana Gumeni⁵, Ioannis P. Trougakos⁵, Dafni-Eleftheria Pefani⁶, Eric O'Neill⁶, Sarantis Gagos⁴, Aristides G. Eliopoulos^{7,8}, Wojciech Fendler^{3,9}, Dipanjan Chowdhury^{9,10}, Jiri Bartek^{11,12,13*} and Vassilis G. Gorgoulis^{1,4,14*}

Abstract

Background: Senescence is a fundamental biological process implicated in various pathologies, including cancer. Regarding carcinogenesis, senescence signifies, at least in its initial phases, an anti-tumor response that needs to be circumvented for cancer to progress. Micro-RNAs, a subclass of regulatory, non-coding RNAs, participate in senescence regulation. At the subcellular level micro-RNAs, similar to proteins, have been shown to traffic between organelles influencing cellular behavior. The differential function of micro-RNAs relative to their subcellular localization and their role in senescence biology raises concurrent *in situ* analysis of coding and non-coding gene products in senescent cells as a necessity. However, technical challenges have rendered *in situ* co-detection unfeasible until now.

Methods: In the present report we describe a methodology that bypasses these technical limitations achieving for the first time simultaneous detection of both a micro-RNA and a protein in the biological context of cellular senescence, utilizing the new commercially available SenTraGorTM compound. The method was applied in a prototypical human non-malignant epithelial model of oncogene-induced senescence that we generated for the purposes of the study. For the characterization of this novel system, we applied a wide range of cellular and molecular techniques, as well as high-throughput analysis of the transcriptome and micro-RNAs.

(Continued on next page)

* Correspondence: jb@cancer.dk; vgorg@med.uoa.gr

†Equal contributors

¹Genome Integrity Unit, Danish Cancer Society Research Centre, Strandboulevarden 49, DK-2100 Copenhagen, Denmark

¹Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, School of Medicine, National & Kapodistrian University of Athens, 75 Mikras Asias St, GR-11527 Athens, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Review

Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease

Marios Kritsilis, Sophia V. Rizou, Paraskevi N. Koutsoudaki, Konstantinos Evangelou, Vassilis G. Gorgoulis ^{*,†} and Dimitrios Papadopoulos ^{*,†}

Laboratory of Histology & Embryology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 75 Mikras Asias Street, Goudi, 115-27 Athens, Greece; marios.kritsilis@gmail.com (M.K.); sofiriz92@gmail.com (S.V.R.); pkoutsoudaki@med.uoa.gr (P.N.K.); cnevagel@med.uoa.gr (K.E.)

* Correspondence: vgorg@med.uoa.gr (V.G.G.); d.papadopoulos@otenet.gr (D.P.);

Tel.: +30-210-746-2352 (V.G.G.)

† These authors share equal credit for senior authorship.

Received: 31 August 2018; Accepted: 19 September 2018; Published: 27 September 2018



Abstract: Ageing is a major risk factor for developing many neurodegenerative diseases. Cellular senescence is a homeostatic biological process that has a key role in driving ageing. There is evidence that senescent cells accumulate in the nervous system with ageing and neurodegenerative disease and may predispose a person to the appearance of a neurodegenerative condition or may aggravate its course. Research into senescence has long been hindered by its variable and cell-type specific features and the lack of a universal marker to unequivocally detect senescent cells. Recent advances in senescence markers and genetically modified animal models have boosted our knowledge on the role of cellular senescence in ageing and age-related disease. The aim now is to fully elucidate its role in neurodegeneration in order to efficiently and safely exploit cellular senescence as a therapeutic target. Here, we review evidence of cellular senescence in neurons and glial cells and we discuss its putative role in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis and we provide, for the first time, evidence of senescence in neurons and glia in multiple sclerosis, using the novel GL13 lipofuscin stain as a marker of cellular senescence.

Keywords: neurodegeneration; cellular senescence; ageing; Alzheimer's disease; multiple sclerosis; Parkinson's disease; lipofuscin; SenTraGorTM (GL13); senolytics

1. Ageing and Neurodegeneration

Ageing is a universal process characterized by the accumulation of biological changes that lead to the organism's functional decline over time. Human ageing is accompanied by a gradual build-up of cognitive and physical impairment and an increased risk of developing numerous diseases including cancer, diabetes, cardiovascular, musculoskeletal and neurodegenerative conditions. Age-related disability and morbidity adversely affect the quality of life; they are ultimately associated with an increased risk of death and bear dire consequences for the individual, the family and society.

Ageing is the most important risk factor for the development of neurodegenerative disease and typically, most neurodegenerative disorders manifest in the elderly [1]. The annual incidence of Alzheimer's disease (AD) has been shown to increase exponentially with advancing age [2,3]. Notably, Down syndrome, a progeroid condition, has been associated with AD, and mouse models of premature ageing have been reported to overproduce A β and show impaired learning and memory [4–7]. Incidence of Parkinson's disease (PD), the second most common age-related neurodegenerative condition also increases with age [8,9]. The great majority of AD and PD cases are sporadic and typically manifest at a much older age than hereditary ones. Despite the differences in pathology



Brief Report

Monitoring Autophagy Immunohistochemically and Ultrastructurally during Human Head and Neck Carcinogenesis. Relationship with the DNA Damage Response Pathway [†]

Sophia Havaki ^{1,‡}, Vassiliki Vlachou ^{1,‡}, Christos P. Zampetidis ^{1,‡}, Platonas Selemenakis ¹, Athanassios Kotsinas ¹, Eleni Mavrogonatou ², Sophia V. Rizou ¹, Euthymios Kyrodimos ³, Konstantinos Evangelou ¹, Dimitris Kletsas ², Alexandra Giatromanolaki ^{4,*} and Vassilis G. Gorgoulis ^{1,5,6,*}

¹ Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 75 Mikras Asias Street, 11527 Athens, Greece; shavaki@med.uoa.gr (S.H.); v-vlachou@hotmail.com (V.V.); chzambo@yahoo.gr (C.P.Z.); pselemenakis@gmail.com (P.S.); akotsin@med.uoa.gr (A.K.); sofiriz92@gmail.com (S.V.R.); cnevagel@med.uoa.gr (K.E.)

² Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research “Demokritos”, 15310 Athens, Greece; elmavro@bio.demokritos.gr (E.M.); dkletsas@bio.demokritos.gr (D.K.)

³ Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, “Hippokration” General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, 114 Queen Sofia Avenue, 11527 Athens, Greece; ekirodin@med.uoa.gr

⁴ Department of Pathology, Democritus University of Thrace, School of Medicine, 68100 Alexandroupolis, Greece

⁵ Faculty Institute for Cancer Sciences, Manchester Academic Health Sciences Centre, University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK

⁶ Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou Street, 11527 Athens, Greece

* Correspondence: agiatrom@med.duth.gr (A.G.); vgorg@med.uoa.gr or vgorgoulis@gmail.com (V.G.G.); Tel.: +30-25-5135-2117 (A.G.); +30-21-0746-2352 (V.G.G.)

[†] This work is dedicated to the memory of Petros Karakitsos.

[‡] These authors contributed equally to this work.

Received: 11 August 2017; Accepted: 3 September 2017; Published: 7 September 2017

Abstract: Autophagy is a catabolic process that preserves cellular homeostasis. Its exact role during carcinogenesis is not completely defined. Specifically in head and neck cancer, such information from clinical settings that comprise the whole spectrum of human carcinogenesis is very limited. Towards this direction, we examined the in situ status of the autophagy-related factors, Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3, member B (LC3B) and sequestosome 1/p62 (p62) in clinical material covering all histopathological stages of human head and neck carcinogenesis. This material is unique as each panel of lesions is derived from the same patient and moreover we have previously assessed it for the DNA damage response (DDR) activation status. Since Beclin-1, LC3B and p62 reflect the nucleation, elongation and degradation stages of autophagy, respectively, their combined immunohistochemical (IHC) expression profiles could grossly mirror the autophagic flux. This experimental approach was further corroborated by ultrastructural analysis, applying transmission electron microscopy (TEM). The observed Beclin-1/LC3B/p62 IHC patterns, obtained from serial sections analysis, along with TEM findings are suggestive of a declined autophagic activity in preneoplastic lesions that was restored in full blown cancers. Correlating these findings with DDR status in the same pathological stages are indicative of: (i) an antitumor function of autophagy in support to that of DDR, possibly through energy deprivation in preneoplastic stages, thus preventing incipient cancer cells from evolving; and (ii) a tumor-supporting role in the cancerous stage.



SHORT TAKE

Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens

Konstantinos Evangelou,^{1*} Nikolaos Lougiakis,^{2*} Sophia V. Rizou,¹ Athanassios Kotsinas,¹ Dimitris Kleitsas,³ Daniel Muñoz-Espín,⁴ Nikolaos G. Kastrinakis,¹ Nicole Pouli,² Panagiotis Marakos,² Paul Townsend,⁵ Manuel Serrano,⁴ Jiri Bartek^{6,7} and Vassilis G. Gorgoulis^{1,5,8}

¹Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

³Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research 'Demokritos', Athens, Greece

⁴Tumor Suppression Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

⁵Molecular and Clinical Cancer Sciences, Manchester Cancer Research Centre, Manchester Academic Health Sciences Centre, University of Manchester, Manchester, UK

⁶Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

⁷Science For Life Laboratory, Division of Translational Medicine and Chemical Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

⁸Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Athens, Greece

Summary

Cellular senescence contributes to organismal development, aging, and diverse pathologies, yet available assays to detect senescent cells remain unsatisfactory. Here, we designed and synthesized a lipophilic, biotin-linked Sudan Black B (SBB) analogue suitable for sensitive and specific, antibody-enhanced detection of lipofuscin-containing senescent cells in any biological material. This new hybrid histo-/immunochemical method is easy to perform, reliable, and universally applicable to assess senescence in biomedicine, from cancer research to gerontology.

Abbreviations

BCIP/NBT, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate/Nitroblue tetrazolium salt; DAB, 3,3'-Diaminobenzidine; DCC, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; DMAP, 4-dimethylaminopyridine; DMF, N,N-dimethylformamide; HPLC, high-performance liquid chromatography; NMR, nuclear magnetic resonance; SA- β -gal, Senescence-associated β -galactosidase; SBB-A-B, SBB-Analogue (GL13) Biotin; SBB, Sudan Black B.

Correspondence

Professor Vassilis G. Gorgoulis, Lab Histology-Embryology Faculty of Medicine National and Kapodistrian University of Athens 75 Mikras Asias Str, Goudi Athens, GR-11527 Greece. Tel.: +30-2107462352; fax: +30-2107462340; e-mail: vgorg@med.uoa.gr and

Professor Jiri Bartek, Danish Cancer Society Research Center Copenhagen, DK-2100 Denmark. Tel.: +45-35257357; fax: +45-35257701; e-mail: jb@cancer.dk

*Equal contribution.

This work is dedicated to the memory of Solon Kostakis and Ioannis Terovitis.

Accepted for publication 27 September 2016

Key words: aging; biotin-linked compounds; immunohistochemistry; senescence; Sudan Black B.

Cellular senescence is a fundamental biological process involved in normal embryonic and adult life and implicated in various pathological conditions and therapeutic interventions (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Halazonetis *et al.*, 2008; Gorgoulis & Halazonetis, 2010; Rodier & Campisi, 2011; Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Georgakopoulou *et al.*, 2016). Therefore, detection and measurement of senescent cells in biological material, with a sensitive, precise, and easy-to-perform assay would be highly desirable and provide major benefits for research and clinical practice.

We recently reported specific recognition of senescent cells in biological material including cultured cells, fresh/frozen, and archival (formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) tissues, applying the Sudan Black B (SBB) histochemical dye (Georgakopoulou *et al.*, 2013; Galanos *et al.*, 2016; Liakou *et al.*, 2016; Petrakis *et al.*, 2016). SBB reacts with lipofuscin, a non degradable aggregate of oxidized proteins, lipids, and metals (Jung *et al.*, 2007). Lipofuscin accumulates in senescent cells, as a by-product of the senescent process, and should be considered as a new 'hallmark' of senescence (Jung *et al.*, 2007; Georgakopoulou *et al.*, 2013; Galanos *et al.*, 2016; Liakou *et al.*, 2016; Petrakis *et al.*, 2016). On the contrary, the most widely used method, measuring senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -gal; Dimri *et al.*, 1995), is applicable only in fresh samples. Additionally, SA- β -gal assay has been shown to produce false-positive results, under certain cell culture conditions (confluence and serum starvation), as well as negative ones in certain cells that fully undergo senescence, but do not exhibit SA- β -gal activity (Georgakopoulou *et al.*, 2013; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Hence, the SBB histochemical assay bypasses these weaknesses and broadens the spectrum of applications (Jung *et al.*, 2007; Georgakopoulou *et al.*, 2013; Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Galanos *et al.*, 2016; Liakou *et al.*, 2016; Petrakis *et al.*, 2016). Although the SBB-based method is easy and fast, it exhibits some technical challenges that can compromise the overall sensitivity and utilization of the assay, when performed by non pathologists (Georgakopoulou *et al.*, 2013).

First, the visualization of SBB-positive lipofuscin granules that appear as variably sized blue-black or brown cytoplasmic granules is not always straightforward and requires high magnifications (up to $\times 1000$) for light microscopy. Especially, in FFPE sections, the lipofuscin granules can be very small, due to partial lipid stripping of lipofuscin during sample preparation, thereby making the granules hard to detect. If the proportion of senescent cells within a tissue is low and these cells are widely scattered, their identification could be challenging. Second, the SBB staining requires longer experience to become familiar with the detection of positive cells, especially when evaluating the staining reaction under the light microscope without any counter stain. Equally important is to gain experience with discrimination of true SBB-positive lipofuscin granules in senescent cells from 'background dirt', reflecting nonspecific excess and precipitation of the dye that can compromise the analysis.

Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: the role of TGF- β

Eleni Liakou¹, Eleni Mavrogonatou¹, Harris Pratsinis¹, Sophia Rizou², Konstantinos Evangelou², Petros N. Panagiotou³, Nikos K. Karamanos⁴, Vassilis G. Gorgoulis^{2,5,6}, and Dimitris Kletsas¹

¹Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

²Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

³Department of Plastic Surgery and Burns Unit, KAT General Hospital of Athens, Greece

⁴Biochemistry, Biochemical Analysis & Matrix Pathobiology Research Group, Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Patras, Patras, Greece

⁵Faculty Institute for Cancer Sciences, Manchester Academic Health Sciences Centre, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

⁶Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Athens, Greece

Correspondence to: Dimitris Kletsas, PhD; E-mail: dkletsas@bio.demokritos.gr

Key words: senescence, syndecan 1, breast stroma, cancer, TGF- β , ionizing radiation

Received: April 18, 2016; **Accepted:** June 26, 2016; **Published:** July 12, 2016

ABSTRACT

The cell surface proteoglycan syndecan 1 (SDC1) is overexpressed in the malignant breast stromal fibroblasts, creating a favorable milieu for tumor cell growth. In the present study, we found that ionizing radiation, a well-established treatment in human breast cancer, provokes premature senescence of human breast stromal fibroblasts *in vitro*, as well as in the breast tissue *in vivo*. These senescent cells were found to overexpress SDC1 both *in vitro* and *in vivo*. By using a series of specific inhibitors and siRNA approaches, we showed that this SDC1 overexpression in senescent cells is the result of an autocrine action of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) through the Smad pathway and the transcription factor Sp1, while the classical senescence pathways of p53 or p38 MAPK - NF- κ B are not involved. In addition, the highly invasive human breast cancer cells MDA-MB-231 (in contrast to the low-invasive MCF-7) can also enhance SDC1 expression, both in early-passage and senescent fibroblasts via a paracrine action of TGF- β . The above suggest that radiation-mediated premature senescence and invasive tumor cells, alone or in combination, enhance SDC1 expression in breast stromal fibroblasts, a poor prognostic factor for cancer growth, and that TGF- β plays a crucial role in this process.

INTRODUCTION

While the research on cancer development and progression is focusing mainly on neoplastic cells, increasing evidence points to a decisive role of the stroma and its interactions with cancer cells in tumor growth. Indeed, numerous studies indicate that a normal microenvironment can hamper tumor development, while

an activated stroma can support tumor progression [1-7]. The stroma is composed of extracellular matrix (ECM) components (such as collagens and proteoglycans) and of many cell types. Among them, fibroblasts play a key role as they are responsible for the deposition and remodeling of ECM constituents, as well as for the release of cytokines and growth factors acting in a paracrine manner on cancer cells [8-11].