



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Υπερμικροσκοπική μελέτη κυττάρων της σειράς Saos2
ύστερα από επαγωγή έκφρασης του γονιδίου $p21^{cip1/waf1}$**

ΓΕΩΡΓΙΑ ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Υπερμικροσκοπική μελέτη κυττάρων της σειράς Saos2, ύστερα από επαγωγή έκφρασης του γονιδίου p21^{Cip1/waf1}

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΓΕΩΡΓΙΑ ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΗ

A.M.: 61301

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ.

B. Γοργούλης, Καθηγητής, Διευθυντής του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

Σ. Χαβάκη, Λέκτορας, Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

26/2/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπερμικροσκοπική μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία της καρκινικής κυτταρικής σειράς Saos2, που αποτελείται από κύτταρα οστεοσαρκώματος με μη-λειτουργική πρωτεΐνη p53, μετά από επαγωγή έκφρασης του γονιδίου $p21^{CIP1/WAF1}$. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το επαγωγίμο κυτταρικό σύστημα Saos2-TetON p21 σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα έκφρασης του γονιδίου $p21^{WAF1/Cip1}$. Στα διαστήματα αυτά, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη της Ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, παρατηρήθηκε σταδιακή εμφάνιση γήρανσης και τελικά διαφυγή γήρανσης σε υποπληθυσμό κυττάρων. Σύμφωνα με την προηγούμενη μελέτη, σε όγκους με μεταλλαγμένο pRb/p53 παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημικά ένας αριθμός από μεγάλα καρκινικά κύτταρα που παραδόξως παρουσίαζαν συνεντόπιση του p21 και του μιτωτικού δείκτη Ki67. Αυτό το βιολογικό παράδοξο μεταφέρθηκε για μελέτη στο κυτταρικό σύστημα Saos2-TetON p21. Η σταδιακή επαγωγή έκφρασης του γονιδίου p21 στα κύτταρα Saos2-TetON p21, που πραγματοποιήθηκε σε αυτή την εργασία, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή γήρανσης στα κύτταρα αυτά, η οποία έφτασε στο αποκορύφωμά της την 10^η ημέρα. Περαιτέρω ενεργοποίηση της p21 είχε ως αποτέλεσμα την διαφυγή γήρανσης (*κύτταρα escaped*) και την επιβίωση για υποπληθυσμό κυττάρων, των οποίων η υπερμικροσκοπική δομή έδειξε ότι έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά επιθετικών καρκινικών κυττάρων, όπως πολύλοβους πυρήνες, μικροπυρήνες και μιτοχόνδρια με ελαττωματική μορφολογία. Για την απάντηση του παραπάνω βιολογικού προβλήματος χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της κυτταροκαλλιέργειας και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Γήρανση, καρκίνος

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Γήρανση, Καρκίνος, Γενωμική αστάθεια, Κυτταρική επικοινωνία, Αυτοφαγία

ABSTRACT

In this work, ultrastructural study with electron microscope was carried out of the tumor cell line Saos2, consisting of osteosarcoma cells with non-functional p53 protein- after induction of *p21^{CIP1/WAF1}* gene expression. The inducible cell system Saos2-TetON p21 was used in four different *p21^{CIP1/WAF1}* gene expression time intervals, which, according to an earlier study by the Molecular Carcinogenesis Group of the Histology and Embryology Lab., a gradual appearance of senescence and eventually senescence escape of cell subpopulation was observed. According to the previous study, in tumors with mutated pRb/p53, a number of large cancer cells that surprisingly showed colocalization of p21 and mitotic marker Ki67 was observed immunohistochemically. This biological paradox was studied using the cellular system Saos2-TetON p21. The gradual induction of p21 gene expression in Saos2-TetON p21 cells which took place in this study, resulted in the induction of senescence in these cells, which reached its peak on the 10th day. Further activation of p21 resulted in senescence escape (***escaped cells***) and survival of cell subpopulation, whose ultrastructural study showed that have acquired characteristics of aggressive tumor cells, such as multilobular nuclei, micronuclei and mitochondria with defective morphology. In this work, we used the experimental approaches of cell culturing and electron microscopy in order to answer the above biological problem.

SUBJECT AREA: Senescence, Cancer

KEYWORDS: Senescence, Cancer, Genomic instability, Cell communication, Autophagy

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους:

Καθηγητές της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,

Στην επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, κα Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ για την υποστήριξή της κατά τη διάρκεια των μαθημάτων, αλλά και σε όλη την πορεία του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Στον Καθηγητή κ. Βασίλειο Γοργούλη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την ανάθεση του θέματος, την παρότρυνση και την καθοδήγησή του.

Στην κα Σοφία Χαβάκη, Λέκτορα του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την πολύτιμη καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, την άψογη και ποιοτική συνεργασία μας και την αμέριστη συμπαράστασή της για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ. Παναγιώτη Γαλανό, Βιολόγο, Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής για την πολύτιμη βοήθεια του στην εκμάθηση της τεχνικής των κυτταροκαλλιεργειών και τη γενικότερη υποστήριξή του.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Μαρία, Μάριο, Διονύση και Σπύρο για την συνεργασία μας κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την ηθική και ψυχολογική τους στήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	16
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.1 Γενικά περί γήρανσης.....	17
1.2 Τα είδη της γήρανσης.....	21
1.2.1 Κυτταρική (αντιγραφική) γήρανση.....	22
1.2.2 Υποθέσεις για την κυτταρική γήρανση	23
1.3 Φαινοτυπικά γνωρίσματα των κυττάρων σε κατάσταση γήρανσης.....	23
1.4 Χαρακτηριστικά λειτουργίας των κυττάρων σε γήρανση.....	25
1.5 Αιτίες της κυτταρικής γήρανσης.....	30
1.6 Δείκτες της γήρανσης	37
1.7 Κύτταρα σε γήρανση και καρκίνος.....	38
1.7.1 Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην ογκοκαταστολή.....	40
1.7.2 Ο ρόλος του SASP στην ογκοκαταστολή.....	41
1.8 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της γήρανσης.....	42
1.9 Γενωμική αστάθεια	45
1.9.1 Τα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια	46
1.9.2 Μοντέλο αντιγραφικού στρες του DNA επαγόμενο από ογκογονίδια.....	47
1.10 Η πρωτεΐνη p21	47
1.10.1 Επιδράσεις της p21 τόσο στην μετάβαση G1/S όσο και στην G2/M του κυτταρικού κύκλου.....	50
1.10.2 Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό κύκλο.....	51
1.10.3 Η φωσφορυλίωση της p21	52
1.10.4 Απορρύθμιση της p21 στον καρκίνο.....	52
1.10.5 Ογκογόνες δραστηριότητες της p21.....	53
1.11 Σκοπός.....	54

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1	Κυτταροκαλλιέργειες.....	55
2.1.1	Συλλογή του υλικού	55
2.2	Το σύστημα Tet-ON.....	56
2.2.1	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των επαγωγίμων συστημάτων Tet.....	59
2.3	Η κυτταρική σειρά Saos-2.....	59
2.4	Χώρος καλλιιεργειών.....	60
2.5	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία.....	62
2.6	Πειραματική πορεία.....	63

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1	Παρατήρηση σε πεδίο αντίθεσης φάσης της μορφολογίας των κυττάρων Saos2-TetON p21.....	70
3.2	Παρατήρηση της υπερμικροσκοπικής δομής των κυττάρων Saos2-TetON p21.....	73
3.3	Εικόνες των κυττάρων Saos2-TetON p21 από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης.....	76
3.4	Υπερμικροσκοπική δομή των κυττάρων Saos2-TetON p21.....	84

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....103

5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....115

6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....118

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....121

8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....127

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Η δύναμη της φυσικής επιλογής.	18
Σχήμα 2: Προβλεπόμενη αύξηση του καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες.....	20
Σχήμα 3: Η βράχυνση των τελομερών καθορίζει την πολλαπλασιαστική διάρκεια ζωής των ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών.....	22
Σχήμα 4: Μορφολογική απεικόνιση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών.....	24
Σχήμα 5: Οι εκατοντάδες δραστηριότητες του (SASP).....	29
Σχήμα 6: Δομή ανθρώπινου τελομερούς.....	30
Σχήμα 7: Το αποτέλεσμα της λανθασμένης λειτουργίας του τελομερούς.....	32
Σχήμα 8: Η απόκριση βλάβης του DNA.....	33
Σχήμα 9: Δυο διαφορετικά μοντέλα με τα οποία οι ενεργές ελεύθερες ρίζες μπορούν να επιδράσουν στην κυτταρική γήρανση.....	34
Σχήμα 10: Οι συνθήκες που οδηγούν στη γήρανση σε κύτταρα και ιστούς.....	36
Σχήμα 11: Ο SASP και η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση.....	39
Σχήμα 12: Δυο επιπλέον χαρακτηριστικά του καρκίνου.....	46
Σχήμα 13: Η απόκριση της p21 σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα.....	50
Σχήμα 14: Αρχές λειτουργίας του συστήματος Tet-ON.....	58
Σχήμα 15: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας.....	63
Σχήμα 16: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αναερόβιας γλυκόλυσης και της αερόβιας γλυκόλυσης (φαινόμενο Warburg).....	110

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Εικόνα από το χώρο καλλιέργειών.....61
- Εικόνα 2: Aclar disc.....63
- Εικόνα 3: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21 πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (OFF).....76
- Εικόνα 4: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).....77
- Εικόνα 5: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....78
- Εικόνα 6: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).....79
- Εικόνα 7: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21 πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (OFF). Καλλιέργεια σε Aclar disc.....80
- Εικόνα 8: Εικόνα από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες). Καλλιέργεια σε Aclar disc.....81
- Εικόνα 9: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες). Καλλιέργεια σε Aclar disc.....82
- Εικόνα 10: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped). Καλλιέργεια σε Aclar

disc.....	83
Εικόνα 11: Κύτταρα OFF. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21 πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (OFF).....	84
Εικόνα 12: Κυτταρικές επαφές. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).....	86
Εικόνα 13: Κυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).....	87
Εικόνα 14: Αυτοφαγία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).....	88
Εικόνα 15: Μιτοχόνδρια. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).....	89
Εικόνα 16: Κύτταρα σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	90
Εικόνα 17: Επαφές των κυττάρων σε γήρανση με τα κύτταρα escaped. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	91
Εικόνα 18: Διακυτταρικές επαφές κυττάρων σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	92
Εικόνα 19: Κύτταρα escaped που γεινιάζουν με κύτταρα σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	93
Εικόνα 20: Κύτταρα σε γήρανση-Κυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	94
Εικόνα 21: Αυτοφαγία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	95

Εικόνα 22: Μιτοχόνδρια των κυττάρων σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	96
Εικόνα 23: Πολύλοβοι πυρήνες. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).....	97
Εικόνα 24: Κυτταρικές επαφές. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2 TetON-p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).....	98
Εικόνα 25: Διακυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).....	99
Εικόνα 26: Διακυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).....	100
Εικόνα 27: Ενδοκυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).....	101
Εικόνα 28: Μιτοχόνδρια. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).....	102

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.....	49
Πίνακας 2: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	115
Πίνακας 3: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	118
Πίνακας 4: Παρασκευή μίγματος ρητινών.....	124

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ειδίκευσης με τίτλο ΥΠΕΡΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ SAOS2 ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *P21^{CIP1/WAF1}* εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), όπως ορίζεται από τους κανονισμούς του Τμήματος για τη λήψη Διπλώματος Ειδίκευσης στην Βιοχημεία, με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια κα Ντία Γαλανοπούλου. Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, διάρκειας δύο ακαδημαϊκών εξαμήνων, εκτελέστηκε εξολοκλήρου στο εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών με υπεύθυνο τον Διευθυντή Καθηγητή κ. Βασίλειο Γοργούλη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

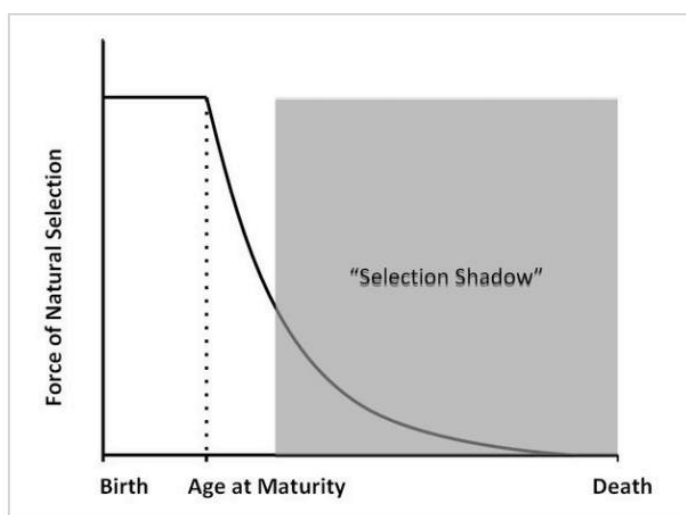
1.1 Γενικά περί γήρανσης

Μια από τις θεμελιώδεις αρχές της εξέλιξης είναι η παραδοχή ότι τα άτομα ζουν για το διάστημα εκείνο στο οποίο μπορούν να αναπαραχθούν και να μεγαλώσουν τα νεογνά τους. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της **γήρανσης (ageing)**. Η διαδικασία της γήρανσης περιλαμβάνει μια αργή μείωση των φυσιολογικών ρυθμών ανάπτυξης με προοδευτική απώλεια της λειτουργικότητας του οργανισμού που έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη γονιμότητα και αυξημένη ευπάθεια σχεδόν στο σύνολο των ασθενειών.¹ Με την πιο στενή έννοια, ο όρος γήρανση αναφέρεται στην βιολογική γήρανση του ανθρώπου, των ζώων και γενικά όλων των οργανισμών. Με την ευρύτερη έννοια η γήρανση μπορεί να αναφέρεται σε μεμονωμένα κύτταρα ενός οργανισμού. Στους ανθρώπους η γήρανση αντιπροσωπεύει τη συσσώρευση των αλλαγών στον οργανισμό με το πέρασμα του χρόνου η οποία συνοδεύεται από σωματικές, ψυχολογικές και κοινωνικές μεταβολές.² Υπολογίζεται ότι σχεδόν 100.000 άνθρωποι παγκοσμίως πεθαίνουν ημερησίως από ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Η βιολογική γήρανση επηρεάζει όλα τα ανθρώπινα κύτταρα εκτός από τα βλαστικά γεννητικά κύτταρα και κάποια αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα.³

Οι δυο κύριοι κλάδοι της έρευνας που ασχολούνται με τη μελέτη της γήρανσης είναι ο κλάδος για το γήρας (βιογεροντολογία) και ο κλάδος για τις ασθένειες (καρκίνος, καρδιαγγειακές νόσοι) που συνδέονται με το γήρας (γηριατρική). Η γήρανση θα μπορούσε να θεωρηθεί μια τεχνητή κατάσταση αφού τα ζώα σε άγρια κατάσταση και ο άνθρωπος στο 99,9% της εξέλιξης του δεν αντιμετώπιζαν το γήρας διότι σχεδόν ποτέ δεν έφταναν σε ηλικία γήρατος. Η γήρανση είναι αποτέλεσμα της αλματώδους ανάπτυξης των βιοϊατρικών επιστημών.¹

Η αναπόφευκτη σταδιακή έκπτωση των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού, η θνησιμότητα και η μείωση της γονιμότητας που παρατηρείται στην γήρανση δημιουργεί ένα εξελικτικό παράδοξο: η φυσική επιλογή σχεδιάζει οργανισμούς για τη βέλτιστη επιβίωση και την αναπαραγωγική επιτυχία (Δαρβινική φυσική κατάσταση), οπότε γιατί άραγε η εξέλιξη δεν εμποδίζει τη γήρανση; Αυτό έγινε κατανοητό στη δεκαετία του 1940 και του 1950 από τρεις εξελικτικούς

βιολόγους, Haldane, Medawar και Williams, οι οποίοι συνειδητοποίησαν ότι η γήρανση δεν εξελίσσεται για το «καλό του είδους». Αντ' αυτού, όπως ισχυρίστηκαν, η γήρανση εξελίσσεται γιατί η φυσική επιλογή γίνεται αναποτελεσματική σε μεγάλη ηλικία (Σχήμα 1). Οι ιδέες τους αργότερα τεκμηριώθηκαν μαθηματικά από τον Hamilton και τον Charlesworth στη δεκαετία του 1960 και του 1970, και σήμερα υποστηρίζονται εμπειρικά.⁴



Σχήμα 1: Η δύναμη της φυσικής επιλογής, ένα μέτρο του πόσο ισχυρά η επιλογή επηρεάζει την επιβίωση ή/και την αναπαραγωγή, μειώνεται ως συνάρτηση της ηλικίας, μια σημαντική θεωρητική προσέγγιση που αναπτύχθηκε από τους Haldane και Medawar που αργότερα επισημοποιήθηκε μαθηματικά με τον Hamilton. Στη σκιασμένη περιοχή («σκιά επιλογής»), η επιλογή δεν μπορεί να "δει" επιβλαβείς μεταλλάξεις των οποίων τα αποτελέσματα περιορίζονται στις μεγάλες ηλικίες. Μια επιβλαβής μετάλλαξη που έχει αρνητικό αποτέλεσμα που περιορίζεται έως τα τέλη της ζωής είναι πιθανό να έχει ήδη περάσει στους απογόνους που φέρουν τη μετάλλαξη αυτή και ως εκ τούτου η επιλογή θα είναι αναποτελεσματική στην εξάλειψη μιας τέτοιας μετάλλαξης από τον πληθυσμό. Η έννοια της φθίνουσας ισχύος της επιλογής είναι η θεμελιώδης βάση για τις εξελικτικές θεωρίες της γήρανσης του πληθυσμού.⁵

Οι εξωγενείς κίνδυνοι, η θήρευση, η μόλυνση, η πείνα κ.α. περιορίζουν τη διάρκεια ζωής των περισσότερων ειδών, εξαντλώντας έτσι φυσικούς πληθυσμούς ηλικιωμένων ατόμων. Κατά συνέπεια, υπάρχουν γενικά λίγοι παλιοί επιζώντες στους οποίους η φυσική επιλογή μπορεί να ενεργήσει για την εξάλειψη αλληλόμορφων ή γονιδίων που έχουν επιβλαβή αποτελέσματα αργής δράσης. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα γονίδια που προσδίδουν οφέλη στα πρώτα στάδια της ζωής. Δηλαδή, η φυσική επιλογή δεν μπορεί να εξαλείψει γονίδια που προάγουν την επιβίωση στα αρχικά στάδια της ζωής, αλλά επίσης μπορεί να προωθήσει αδυναμία σε προχωρημένη ηλικία, μια έννοια που ονομάζεται ανταγωνιστική πλειοτροπία. Η ανταγωνιστική πλειοτροπία είναι το κλειδί για την κατανόηση

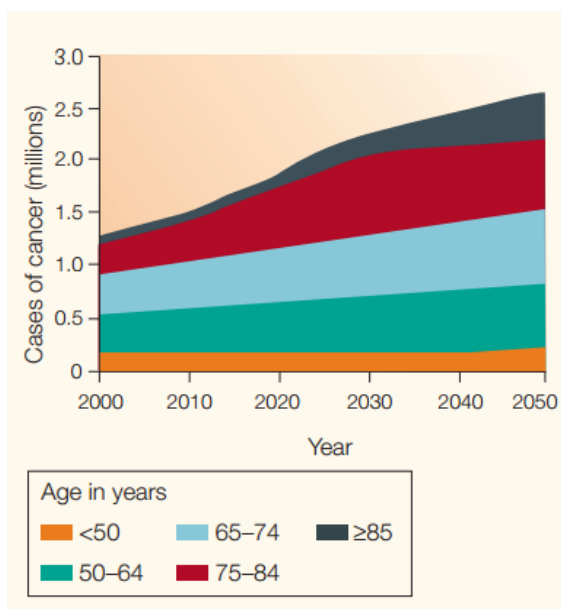
πολλών πτυχών της γήρανσης και ιδιαίτερα της σχέσης μεταξύ της γήρανσης και του καρκίνου.^{6,7}

Θεωρητικά η γήρανση δε θα πρέπει να κατευθύνεται άμεσα και απόλυτα από συγκεκριμένα γονίδια, όπως η διαδικασία της ανάπτυξης. Η ανάπτυξη στους ανθρώπους είναι παρόμοια και το γονιδίωμα περιέχει ακριβείς οδηγίες για αυτή τη διαδικασία, ενώ το γήρας αποτελεί μια στοχαστική διαδικασία η οποία εμφανίζει σημαντική ετερογένεια. Η χρονική εξέλιξη του φαινοτύπου του γήρατος εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου, τη συσσώρευση επιγενετικών επιδράσεων από το περιβάλλον σε συνδυασμό με τη συσσώρευση γενωμικής αστάθειας καθώς και από το στρες.¹

Ο ορισμός της γήρανσης περιλαμβάνει όχι μόνο τις αλλαγές που συνδέονται με «ελαττωματική λειτουργικότητα» (loss-of-function) αλλά επίσης και τις αλλαγές που σχετίζονται με «επικερδή λειτουργικότητα» (gain-of-function).² Μεταξύ των πολυκύτταρων οργανισμών με ανανεώσιμους ιστούς, η γήρανση έχει ως επακόλουθο αλλαγές «επικερδούς λειτουργικότητας» που επιτρέπουν στα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα (υπερπλασία) αποτέλεσμα των οποίων είναι ο καρκίνος. Στα θηλαστικά, ο σχετιζόμενος με την ηλικία εκφυλισμός δημιουργεί παθολογίες, όπως σαρκοπενία, αθηροσκλήρωση και καρδιακή ανεπάρκεια, οστεοπόρωση, εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας, πνευμονική ανεπάρκεια, νεφρική ανεπάρκεια ή νευροεκφυλισμό (συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και η νόσος Πάρκινσον).⁷ Επιπλέον, μέσω της γενωμικής αστάθειας, οι αλλαγές αυτές επιτρέπουν στα κύτταρα να αποκτήσουν φαινότυπους που αυξάνουν τις ικανότητές τους να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν και να αποικίζουν σε έκτοπες θέσεις ώστε να επιβιώσουν στο εχθρικό περιβάλλον του ιστού και να αποφύγουν την επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτοί οι φαινότυποι είναι, φυσικά, χαρακτηριστικά θανατηφόρων καρκίνων.⁸

Ο καρκίνος, όπως οι σχετιζόμενες με την ηλικία εκφυλιστικές ασθένειες, αυξάνει σε συχνότητα με σχεδόν εκθετική κινητική (Σχήμα 2) αρχίζοντας περίπου στη μέση ηλικία (σε είδη που είναι επιρρεπή σε αυτή την ασθένεια).⁹ Από αυτή την άποψη, ο καρκίνος δεν είναι διαφορετική από τις άλλες ασθένειες της γήρανσης, παρά τις πολύ διαφορετικές εκδηλώσεις του. Είναι άραγε τυχαίο, λοιπόν, ότι αυτοί οι τύποι των ανόμοιων παθολογιών που σχετίζονται με την ηλικία αυξάνουν με την ίδια

κινητική; Ή, υπάρχει μια κοινή διαδικασία που συνδέει τη γήρανση, τον εκφυλισμό και τον καρκίνο; Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι τουλάχιστον μία διαδικασία η οποία είναι απόκριση στο στρες η οποία ονομάζεται **κυτταρική γήρανση (cellular senescence)** συνδέει πολλαπλές παθολογίες της γήρανσης, τόσο εκφυλιστικές όσο και υπερπλασίες.⁷



Σχήμα 2: Προβλεπόμενη αύξηση του καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο αριθμός των ασθενών με καρκίνο αναμένεται να διπλασιαστεί από 1,3 εκατομμύρια κατά το έτος 2000 στα 2,6 εκατομμύρια μέχρι το 2050, με τους ηλικιωμένους ασθενείς να αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της αύξησης αυτής. Ο απόλυτος αριθμός των κρουσμάτων καρκίνου σε άτομα ηλικίας κάτω των 50 ετών δεν προβλέπεται να αυξηθεί σημαντικά κατά τα επόμενα 50 χρόνια, αν και ο απόλυτος αριθμός των κρουσμάτων σε άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω αναμένεται να διπλασιαστεί μεταξύ 2000 και 2030. Το ποσοστό των περιπτώσεων σε άτομα ηλικίας 75 ετών και άνω προβλέπεται να αυξηθεί από 30% το 2000 σε 42% το 2050.⁹

1.2 Τα είδη της γήρανσης

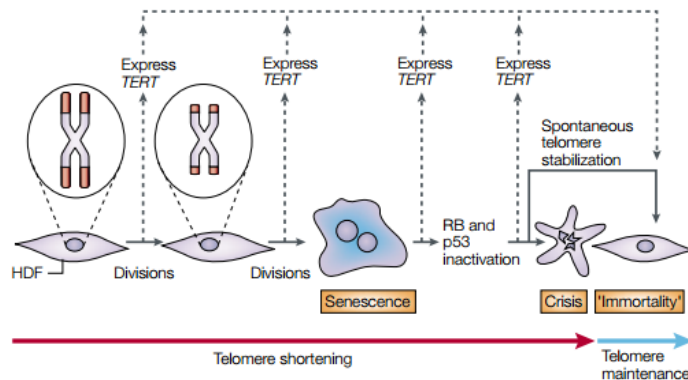
Η γήρανση (senescence) προέρχεται από τη λέξη *senex*, μια λατινική λέξη που σημαίνει γέρος ή γήρας.¹⁰ Υπάρχουν διάφορες μορφές γήρανσης. Η κυτταρική (αντιγραφική) γήρανση είναι η μορφή που προκαλείται από τα ατελή τελομερή. Δεύτερη μορφή της γήρανσης προκαλείται από παράγοντες που προκαλούν δικλωνικές θραύσεις στο DNA (double-strand breaks, DSBs). Επιπλέον, η γήρανση που προκαλείται από ογκογονίδιο, είναι η μορφή της γήρανσης που είναι πιο πιθανό να σχετίζεται με τις ανθρώπινες προκαρκινικές βλάβες.¹¹ Το στρες είναι ένας επιπλέον παράγοντας που επάγει γήρανση. Η παρατεταμένη σηματοδότηση από ορισμένες αντι-πολλαπλασιαστικές κυτοκίνες, όπως η ιντερφερόνη-β, προκαλεί επίσης γήρανση.¹⁰ Συνοπτικά,

1. **Αντιγραφική γήρανση** – Τελομερο-εξαρτώμενη γήρανση, προκαλείται από αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων εξαιτίας βράχυνσης των τελομερών - φάση θνησιμότητας 1 (mortality phase 1, M1).
 2. Γήρανση που επάγεται από **βλάβη του DNA**.
 3. **Επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση** (stress-induced premature senescence, SIPS) - στάση (stasis) ή φάση θνησιμότητας 0 (mortality phase 0, M0) - οξύ φαινόμενο στο οποίο τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται κάτω από ποικίλες συνθήκες στρες.
- Γήρανση που επάγεται από **ογκογονίδιο** – επάγεται από μιτογόνα ογκογονίδια ή απώλεια αντι-μιτογόνων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

1.2.1 Κυτταρική (αντιγραφική) γήρανση

Η διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης περιγράφηκε αρχικά από τους Hayflick και Moorhead το 1961. Οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν ότι οι φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες είχαν περιορισμένη ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια και εισέρχονταν σε μια κατάσταση μη αντιστρεπτής διακοπής της ανάπτυξης. Αρχικά διατυπώθηκε η άποψη ότι τα κύτταρα αυτά είχαν μια πεπερασμένη αντιγραφική διάρκεια ζωής και, αργότερα, διατυπώθηκε ο όρος **αντιγραφική ή κυτταρική γήρανση**. Ο αριθμός των διαιρέσεων που ολοκληρώνουν τα κύτταρα μέχρι να φτάσουν στο τέλος της αντιγραφικής διάρκειας ζωής τους έχει ονομαστεί **όριο Hayflick**. Αργότερα αποδείχθηκε ότι αυτή η διαδικασία προέρχεται από τη μείωση του μήκους των τελομερών (Σχήμα 3). Τα καρκινικά κύτταρα δεν εισέρχονταν σε αυτή την κατάσταση και εξακολουθούσαν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον.¹⁰

Το γηρασμένο κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος και παραμένει μεταβολικά ενεργό, αλλά δε μπορεί να περάσει το σημείο ελέγχου G1/S και να συνεχίσει την κυτταρική διαίρεση παρά την ύπαρξη ισχυρών μιτογόνων ερεθισμάτων.¹²



Σχήμα 3: Η βράχυνση των τελομερών καθορίζει την πολλαπλασιαστική διάρκεια ζωής των ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών. Μετά από 60-80 διπλασιασμούς πληθυσμού στην καλλιέργεια, τα βραχεία τελομερή σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες (human dermal fibroblasts, HDFs) πυροδοτούν μια απόκριση βλάβης που οδηγεί σε γήρανση. Αν τα κύτταρα ξεπεράσουν τη γήρανση, λόγω της κατάργησης των μονοπατιών του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma, Rb) και της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, τότε συνεχίζουν να διαιρούνται μέχρι τα οριακά μικρά τελομερή να προκαλέσουν κρίση. Σπάνια τα κύτταρα αναδύονται από την κρίση με την ενεργοποίηση των μηχανισμών για τη σταθεροποίηση των τελομερών. Εξωγενής έκφραση της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης, (telomerase reverse transcriptase, TERT) σε οποιοδήποτε στάδιο της αντιγραφικής διαδικασίας επιτρέπει αθανάτοποίηση των κυττάρων αυτών.¹³

1.2.2 Υποθέσεις για την κυτταρική γήρανση

1η υπόθεση: Προέκυψε από το γεγονός ότι πολλά καρκινικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα σε καλλιέργεια. Η κυτταρική γήρανση προτάθηκε να είναι ένας αντικαρκινικός και ογκοκατασταλτικός μηχανισμός. Σ' αυτό το πλαίσιο η απόκριση της γήρανσης θεωρήθηκε ωφέλιμη διότι προστάτευε τον οργανισμό από τον καρκίνο.

2η υπόθεση: Προέκυψε από το γεγονός ότι η αναγέννηση και επιδιόρθωση των ιστών γίνονται σε πολύ μικρότερο βαθμό όσο αυξάνεται η ηλικία. Η κυτταρική (αντιγραφική) γήρανση προτάθηκε να συνοψίζει τα χαρακτηριστικά της γήρανσης ή την απώλεια της αναγεννητικής ικανότητας των κυττάρων *in vivo*. Σ' αυτό το πλαίσιο, η κυτταρική γήρανση θεωρήθηκε επιβλαβής διότι συνέβαλε στη μείωση της ανανέωσης και λειτουργίας του ιστού.¹⁰

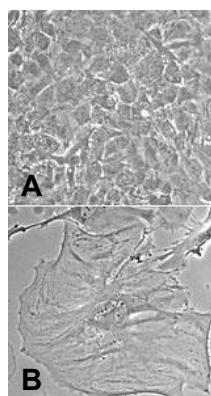
1.3 Φαινοτυπικά γνωρίσματα των κυττάρων σε κατάσταση γήρανσης

Η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται από αλλαγή στη μορφολογία, τη γονιδιακή έκφραση, τη δομή της χρωματίνης και ενεργοποιημένη απόκριση στη βλάβη του DNA (DNA Damage Response, DDR).¹⁴ Πιο συγκεκριμένα, το σχήμα τους από ατρακτοειδές μεταβάλλεται σε πεπλατυσμένο και χάνουν τη δυνατότητα σύνθεσης DNA, αν και είναι μεταβολικά ενεργά, με μόνιμη αναστολή κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η τελευταία αυτή ιδιότητα τα διακρίνει από τα κύτταρα που βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας G0 του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων οξειδωσης, μειωμένη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, αλλαγές στη σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας, αντοχή στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου, αλλαγές στην έκφραση αρκετών γονιδίων και τέλος μείωση του μήκους των τελομερών.¹ Ενδοκυτταρικά οργανίδια, όπως τα λυσοσώματα, μιτοχόνδρια, πυρήνας και κυτταροσκελετός, αλλάζουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφικής γήρανσης. Οι αλλαγές που σχετίζονται με τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια δεν εντοπίζονται μόνο σε κύτταρα που υφίστανται αντιγραφική ή επαγόμενη γήρανση αλλά και σε μετα-μιτωτικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί από γηρασμένους οργανισμούς. Αντιθέτως, άλλες αλλαγές συμβαίνουν σε κύτταρα που υφίστανται γήρανση *in vitro*. Αυτές οι διαφορές περιλαμβάνουν αυξημένη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και τη συσσώρευση των

επακόλουθων προϊόντων βλάβης λόγω των ριζών ROS όπως: 1) λιποφουσκίνες και κοκκιώδη μόρια 2) τροποποιημένη μάζα και λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων και των λυσοσωμάτων και 3) διάφορους κυτσοσολικούς και πυρηνικούς δείκτες όπως β-γαλακτοσιδάση σχετιζόμενη με τη γήρανση (senescence-associated β-galactosidase, SA-β-Gal) και εστίες-σημεία ετεροχρωματίνης σχετιζόμενες με τη γήρανση (senescence associated heterochromatin foci, SAHF).¹⁵ Επιπλέον τα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης περιέχουν πολλά κενοτόπια και κυτταροπλασματικά νημάτια, μεγαλύτερο πυρήνα και πυρηνίσκους, ενώ μερικές φορές είναι πολυπύρηνα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν μια αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων και των συστημάτων Golgi.¹⁶

Μορφολογικός μετασχηματισμός των κυτάρων σε γήρανση

Η κυτταρική γήρανση γενικά συνοδεύεται από μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες μπορεί να είναι αρκετά εντυπωσιακές. Ανάλογα με την αιτία πρόκλησης της γήρανσης, τα κύτταρα μπορούν να γίνουν μεγάλα, επίπεδα και πολυπύρηνα (Σχήμα 4). Ένας επίπεδος κυτταρικός φαινότυπος εμφανίζεται συνήθως σε κύτταρα που υφίστανται H-RAS^{V12} επαγόμενη γήρανση, επαγόμενη από στρες γήρανση ή επαγόμενη από βλάβες στο DNA γήρανση.¹⁷



Σχήμα 4: Μορφολογική απεικόνιση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών

A: πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα B: κύτταρο σε γήρανση.¹⁶

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η ανάπτυξη του φαινοτύπου της κυτταρικής γήρανσης επηρεάζεται θετικά και από τους διάφορους παράγοντες οξειδωσης αφού η διαβίωση σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο απαιτεί την εξέλιξη αποτελεσματικών κυτταρικών στρατηγικών για τον εντοπισμό και την αποτοξίνωση των μεταβολιτών του μοριακού οξυγόνου που είναι γνωστοί ως ROS. Τα

μιτοχόνδρια κατέχουν μια κεντρική θέση στη μάχη του κυττάρου ενάντια στις ROS αφού αποτελούν τη κύρια θέση κατανάλωσης οξυγόνου στο κύτταρο μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας.¹ Η αύξηση στη μιτοχονδριακή μάζα και στο μιτοχονδριακό DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) προτάθηκε να είναι μια απάντηση ανατροφοδότησης για να αντισταθμιστεί η λειτουργική πτώση των μιτοχονδρίων που προκαλείται από βλάβη ROS.¹⁵ Πράγματι, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο θεωρείται ως η κύρια πηγή ROS εντός του κυττάρου, είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της κυτταρικής γήρανσης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Ενώ εξωγενής επώαση με H₂O₂ μπορεί να προωθήσει την κυτταρική γήρανση, ενδογενείς ROS (όπως υπεροξειδία και ρίζες υδροξυλίου) εμπλέκονται επίσης στην εγκατάσταση και τη συντήρηση της μη αναστρέψιμης διακοπής της ανάπτυξης. Η υπερβολική παραγωγή των ROS συνδέεται με την αντιγραφική γήρανση, τη γήρανση που επάγεται από ογκογονίδιο και την επαγόμενη από το *p16^{INK4a}* γήρανση.¹⁸

1.4 Χαρακτηριστικά λειτουργίας των κυττάρων σε γήρανση

A. Αναστολή της ανάπτυξης

Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω της γήρανσης θεωρείται μη αναστρέψιμη διότι κανένα φυσιολογικό ερέθισμα δε μπορεί να διεγείρει τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης ώστε να επανενταχθούν στο κυτταρικό κύκλο.⁷ Αυτή η μονιμότητα της αναστολής της ανάπτυξης λόγω γήρανσης ενισχύει την ιδέα ότι η απόκριση της γήρανσης εξελίχθηκε τουλάχιστον εν μέρει για να καταστείλει την ανάπτυξη του καρκίνου. Ωστόσο, μοριακοί βιολογικοί χειρισμοί, όπως για παράδειγμα, η διαδοχική απενεργοποίηση ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης.¹⁴

Οι πολύπλοκοι οργανισμοί, όπως τα θηλαστικά, περιέχουν τόσο μιτωτικά όσο και μετα-μιτωτικά κύτταρα. Η κυτταρική γήρανση περιορίζεται στα μιτωτικά κύτταρα, από τα οποία μπορεί να αναπτυχθεί καρκίνος. Παρά το γεγονός ότι τα μιτωτικά κύτταρα, μπορούν να πολλαπλασιαστούν, μπορούν επίσης να βρίσκονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε μια αντιστρεπτή κατάσταση αναστολής που ονομάζεται ηρεμία ή G0. Τα αδρανή κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται

λόγω απόκρισης σε κατάλληλα σήματα, συμπεριλαμβανομένης της ανάγκης για επιδιόρθωση ή αναγέννησης ιστού. Αντιθέτως, τα μετα-μιτωτικά κύτταρα χάνουν μόνιμα την ικανότητα να διαιρούνται λόγω της διαφοροποίησης.¹⁰

B. Αντίσταση στην απόπτωση

Η ζωή και ο θάνατος των κυττάρων πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία, ώστε να μπορεί να διατηρηθεί η ομοιόσταση του ιστού. Υπερβολική ανάπτυξη και μειωμένος θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε μια σοβαρή διαταραχή που θα μπορούσε, τελικά, να οδηγήσει σε καρκίνο. Τα κύτταρα έχουν έναν εγγενή μηχανισμό αυτοκαταστροφής που ονομάζεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Σε πολυκύτταρους οργανισμούς, πολλοί από τους μηχανισμούς που ελέγχουν την ομοιόσταση των ιστών συνδέονται με την απόπτωση.⁵ Όπως η γήρανση έτσι και η απόπτωση είναι απόκριση σε κυτταρικό στρες και είναι σημαντικός ογκοκατασταλτικός μηχανισμός.²⁰ Ενώ, η γήρανση εμποδίζει την ανάπτυξη κατεστραμμένων κυττάρων ή κυττάρων που έχουν υποστεί στρες, η απόπτωση τα εξαλείφει. Πολλοί (αν όχι όλοι) κυτταρικοί τύποι αποκτούν αντίσταση σε διάφορα αποπτωτικά σήματα όταν εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης. Για παράδειγμα, οι ανθρώπινες ινοβλάστες που βρίσκονται σε γήρανση αντιστέκονται στην απόπτωση που επάγεται από κηραμίδια αλλά τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν αντιστέκονται. Η αντίσταση στην απόπτωση μπορεί εν μέρει να εξηγήσει γιατί τα κύτταρα σε γήρανση είναι τόσο σταθερά σε καλλιέργεια. Επίσης, θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί ο αριθμός των κυττάρων σε κατάσταση γήρανσης αυξάνεται με την ηλικία.¹⁰ Τα κύτταρα σε γήρανση καταστέλλουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διεγείρουν ή διευκολύνουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου όπως είναι για παράδειγμα οι αντίγραφο-εξαρτώμενες ιστόνες, c-FOS, κυκλίνη A, κυκλίνη B και το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). Κάποια από αυτά τα γονίδια καταστέλλονται επειδή ο E2F, ο μεταγραφικός παράγοντας που τα επάγει απενεργοποιείται από την pRB. Σε κάποια κύτταρα σε γήρανση, τα γονίδια που έχει ως στόχο ο E2F αποσιωπούνται από pRB-εξαρτώμενη αναδιοργάνωση της χρωματίνης σε διακριτές εστίες-σημεία που ονομάζονται SAHFs.²¹

Γ. Αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση

Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν εντυπωσιακές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολών σε γνωστούς αναστολείς ή ενεργοποιητές του κυτταρικού κύκλου. Αναστολείς του κυτταρικού κύκλου που συχνά εκφράζονται από τα γηρασμένα κύτταρα είναι οι αναστολείς κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνη (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs) p21 (ονομάζεται επίσης CDKN1a, p21Cip1, WAF1 ή Sd11) και p16 (ονομάζεται επίσης CDKN2A ή p16INK4a). Αυτοί οι CDKIs είναι συστατικά ογκοκατασταλτικών οδών που διέπονται από την p53 και την πρωτεΐνη pRB, αντίστοιχα. Οι p53 και pRB είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές και τα μονοπάτια που ρυθμίζουν διακόπτονται συχνά στον καρκίνο.²²

Δ. Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση, SASP

Εκτός από την αναστολή της ανάπτυξης, τα κύτταρα σε γήρανση εμφανίζουν αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης και στη γονιδιακή έκφραση. Το γηρασμένο κύτταρο είναι ένα μεταβολικά ενεργό κύτταρο που έχει υποστεί εκτεταμένες αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση.²³ Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν έκκριση πολυάριθμων φλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεασών, χαρακτηριστικό που ονομάζεται **εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση** (senescence-associated secretory phenotype, **SASP**).²⁴ Ο SASP έχει ισχυρές παρακρινικές δυνατότητες, η φύση των οποίων υποδηλώνει ότι η απόκριση της γήρανσης δεν εξελίχθηκε μόνο ως μηχανισμός πρόληψης του καρκίνου, αλλά τόσο η κυτταρική γήρανση όσο και ο SASP εξελίχθηκαν επίσης για την επιδιόρθωση και αναγέννηση των ιστών σε περίπτωση τραυματισμού. Οι παρακρινικές δραστηριότητες των κυττάρων σε γήρανση μπορεί να είναι είτε ωφέλιμες είτε καταστρεπτικές.⁷

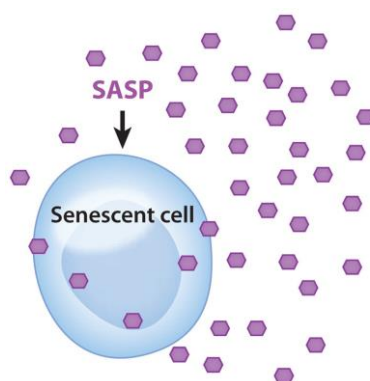
Οι βιολογικές δραστηριότητες του SASP είναι χιλιάδες. Ο SASP μπορεί να διεγείρει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, λόγω έκκρισης πρωτεϊνών όπως ογκογονίδια σχετιζόμενα με την ανάπτυξη (growth regulated oncogenes, GROs) και αμφιρεγουλίνη. Επίσης μπορεί να τονώσει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, λόγω έκκρισης πρωτεϊνών όπως αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF). Ωστόσο, ο SASP επίσης περιλαμβάνει πρωτεΐνες που έχουν πολύπλοκες επιδράσεις στα κύτταρα – π.χ ο

διφασικός ρυθμιστής του WNT (Wingless-type), η πρωτεΐνη SFRP1 (secreted frizzled related protein 1, SFRP1) και οι ιντερλευκίνες IL-6 και IL-8 που μπορούν να διεγείρουν ή να αναστέλλουν τη σηματοδότηση WNT και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αντίστοιχα, ανάλογα με το φυσιολογικό πλαίσιο. Χρόνια σηματοδότηση WNT μπορεί να οδηγήσει τόσο τα διαφοροποιημένα όσο και τα βλαστικά κύτταρα σε γήρανση. Επιπλέον, ορισμένοι παράγοντες SASP επάγουν μια επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (epithelial-mesenchymal transition, EMT) σε ευπαθή κύτταρα. Άλλοι (για παράδειγμα οι, SFRP1, GRO α και IL-6) μπορεί να αλλάξουν τον πολλαπλασιασμό αρχέγονων κυττάρων ή τη διαφοροποίηση.^{7,25}

Πολλά στοιχεία του SASP άμεσα ή έμμεσα προωθούν τη φλεγμονή. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τις IL-6 και IL-8 και μια ποικιλία από πρωτεΐνες χημειοελκτικών μονοκυττάρων (methyl-accepting chemotaxis protein, MCPs), φλεγμονώδεις πρωτεΐνες μακροφάγων (macrophage inflammatory proteins, MIPs) και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν πολλαπλές πτυχές της φλεγμονής, όπως ο παράγοντας διεγέρσεως αποικιών κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GM-CSF).^{7,24} Η έκκριση αυτών και παρόμοιων πρωτεϊνών από τα κύτταρα σε γήρανση αναμένεται να προκαλέσει χρόνια φλεγμονή, τουλάχιστον σε τοπικό επίπεδο και ενδεχομένως συστηματικά. Χρόνια φλεγμονή, βέβαια, είναι μια αιτία, ή συμβάλλει σημαντικά σε σχεδόν κάθε σοβαρή ασθένεια σχετιζόμενη με την ηλικία, τόσο εκφυλιστική όσο και ασθένεια που προκαλεί υπερπλασία.⁷

Αιτίες του SASP

Ο SASP είναι πρωτίστως μια ιδιότητα των κυττάρων που εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης, λόγω γενωμικής βλάβης ή γενετικής διαταραχής. Έτσι, τα φυσιολογικά κύτταρα που εισέρχονται σε γήρανση λόγω της έκτοπης υπερέκφρασης της p21 ή p16INK4a δεν εκφράζουν τον SASP, παρόλο που παρουσίασαν μια διακοπή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης και εμφάνισαν πολλά άλλα χαρακτηριστικά κυττάρων που βρίσκονται σε γήρανση. Σε αντίθεση, τα κύτταρα που εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης λόγω βλάβης του DNA, δυσλειτουργικών τελομερών, γενετικής διαταραχής, μιτογόνων σημάτων, οξειδωτικού στρες και άλλων ερεθισμάτων επαγωγής γήρανσης αναπτύσσουν ένα SASP διαφορετικής ποιότητας και ευρωστίας (Σχήμα 5).⁷

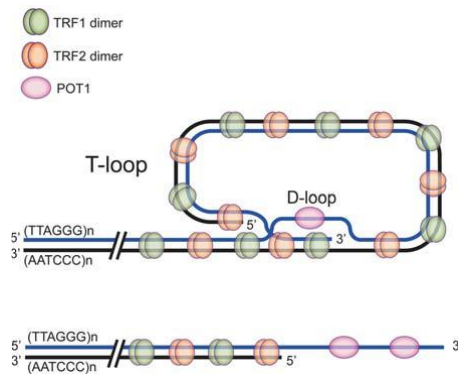


Σχήμα 5: Οι εκατοντάδες δραστηριότητες του (SASP). Οι πολλοί παράγοντες που συνθέτουν τον SASP έχουν πολλές βιολογικές δραστηριότητες, όλοι εξαρτώμενοι σε μεγάλο βαθμό από το φυσιολογικό πλαίσιο. Οι δραστηριότητες αυτές περιλαμβάνουν την διέγερση της αγγειογένεσης, την διέγερση και αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τη δημιουργία χημειοαντίστασης κατά την διάρκεια χημειοθεραπείας του καρκίνου, διέγερση μιας επιθηλιομεσεγχυματικής μετάβασης, χρόνιας φλεγμονής, μεταβολές στην ανανέωση ή/και διαφοροποίηση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων, και τη βελτιστοποίηση της επισκευής των ιστών. Τα εξάγωνα αποτελούν παράγοντες του SASP που δρουν εντός και εκτός του γηρασμένου κυττάρου.⁷

1.5 Αιτίες της κυτταρικής γήρανσης

A. Μείωση του μήκους των τελομερών

Ο μηχανισμός πίσω από τον πεπερασμένο αντιγραφικό χρόνο ζωής των φυσιολογικών κυττάρων είναι πλέον κατανοητός. Οι DNA πολυμεράσες είναι μιας κατεύθυνσης και απαιτούν έναν ασταθή εκκινητή για να ξεκινήσουν την 5'-3' σύνθεση, έτσι τα 3' άκρα των μορίων γραμμικού DNA δεν μπορούν να αντιγραφούν εντελώς, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «πρόβλημα αντιγραφής των τελομερικών άκρων»²⁶ - τα κύτταρα χάνουν 50–200 ζεύγη βάσεων τελομερικού DNA κατά τη διάρκεια της φάσης S. Έτσι, τα τελομερή (Σχήμα 6), οι DNA-πρωτεϊνικές δομές που καλύπτουν τα άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων και τα προστατεύουν από την αποικοδόμηση και τη σύντηξη με διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA, μειώνονται σε μήκος σε κάθε κυτταρική διαίρεση.⁷



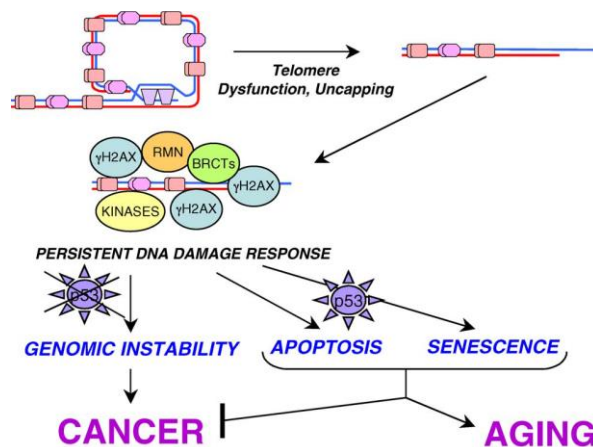
Σχήμα 6: Δομή ανθρώπινου τελομερούς.²⁷

Μείωση του μήκους των τελομερών δε συμβαίνει σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν τελομεράση, την αντίστροφη μεταγραφάση που μπορεί να αναπληρώσει το επαναληπτικό τελομερικό DNA *de novo*. Η τελομεράση περιέχει μια καταλυτική πρωτεΐνη, την **TERT**, και αντιγράφει μία αλληλουχία-εκμαγείο που φέρεται εντός του αναπόσπαστου RNA της και προσθέτει μονόκλωνες τελομερικές επαναλήψεις στο 3' άκρο του χρωμοσώματος γεγονός που επιτρέπει την διατήρηση της ομοιόστασης στο μήκος των τελομερών.²⁸ Τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα δεν εκφράζουν την TERT, ή την εκφράζουν σε επίπεδα τόσο χαμηλά ώστε να εμποδίσουν τη μείωση του μήκους των τελομερών. Αντιθέτως, τα βλαστικά γεννητικά κύτταρα και κάποια καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την TERT. Επίσης, έκτοπη έκφραση της TERT σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα εμποδίζει

ταυτόχρονα τη μείωση του μήκους των τελομερών και τη γήρανση που προκαλείται από το πρόβλημα αντιγραφής των τελομερικών άκρων. Ωστόσο, η τελομεράση δε μπορεί να εμποδίσει τη γήρανση που προκαλείται από άλλους επαγωγείς γήρανσης.^{10,29}

Τα λειτουργικά τελομερή εμποδίζουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA από το να αναγνωρίσουν τα χρωμοσωμικά άκρα ως δικλωνικές θραύσεις του DNA, στις οποίες τα κύτταρα ανταποκρίνονται άμεσα ώστε να επιτευχθεί επιδιόρθωση. Στην περίπτωση των τελομερών, η επιδιόρθωση ακολουθούμενη από την κυτταρική διαίρεση θα προκαλέσει ανεξέλεγκτη γενωμική αστάθεια μέσω κύκλων σύντηξης του χρωμοσώματος και θραύσης – σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου.^{7,30} Έτσι, η επαναλαμβανόμενη κυτταρική διαίρεση απουσία τελομεράσης τελικά προκαλεί ένα ή περισσότερα τελομερή να μειώνουν σε μήκος ή να γίνουν μη λειτουργικά. Τα μη λειτουργικά τελομερή προκαλούν DDR, αλλά καταστέλλουν την επιδιόρθωσή του DNA. Η απόκριση στη βλάβη του DNA αναστέλλει τη κυτταρική διαίρεση κυρίως λόγω της δράσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και έτσι αποφεύγεται η γενωμική αστάθεια.⁷ Στα κύτταρα με μη λειτουργικά τελομερή η σηματοδότηση για απόκριση στη βλάβη του DNA και η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 είναι συνεχής, γεγονός που ενισχύει την αναστολή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης.¹⁰

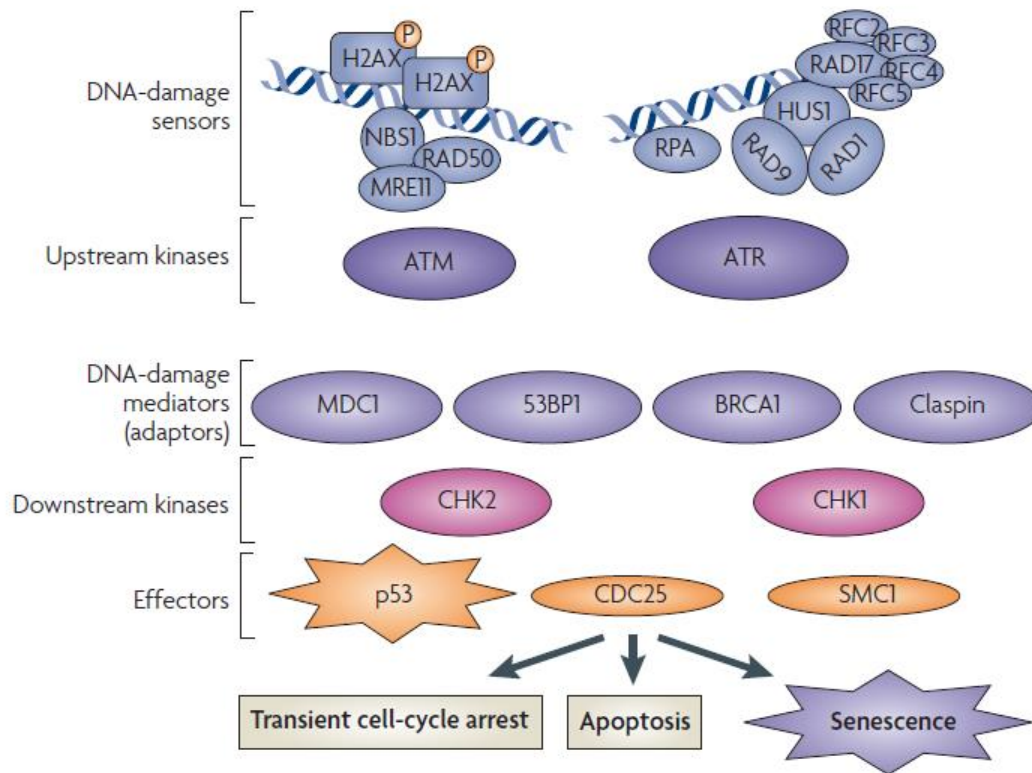
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μη λειτουργικά τελομερή φαίνεται να ανιχνεύονται από τα κύτταρα ως κατεστραμμένο DNA και ειδικότερα ως DNA που έχει υποστεί δικλωνικές θραύσεις, DSBs. Έτσι, τα μη λειτουργικά τελομερή, επάγουν μια κλασική απόκριση βλάβης του DNA. Αυτές οι εστίες-foci βλάβης του τελομερικού DNA περιέχουν φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2AX (γ -H2AX) και μια ποικιλία από άλλες πρωτεΐνες όπως επαγόμενες από βλάβη του DNA κινάσες (ATM, ATR, DNA-PK, CHK1 και CHK2), το σύμπλεγμα RMN και BRCT και την 53BP1(Σχήμα 7).³⁰



Σχήμα 7: Το αποτέλεσμα της λανθασμένης λειτουργίας του τελομερούς περιλαμβάνει την παραγωγή συνεχούς σήματος βλάβης του DNA. Η τύχη των κυττάρων που «βιώνουν» αυτό το σήμα, γενωμική αστάθεια, γήρανση ή απόπτωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτεΐνη p53. Η τύχη του κυττάρου επηρεάζει, τους φαινοτύπους του καρκίνου και της γήρανσης.³⁰

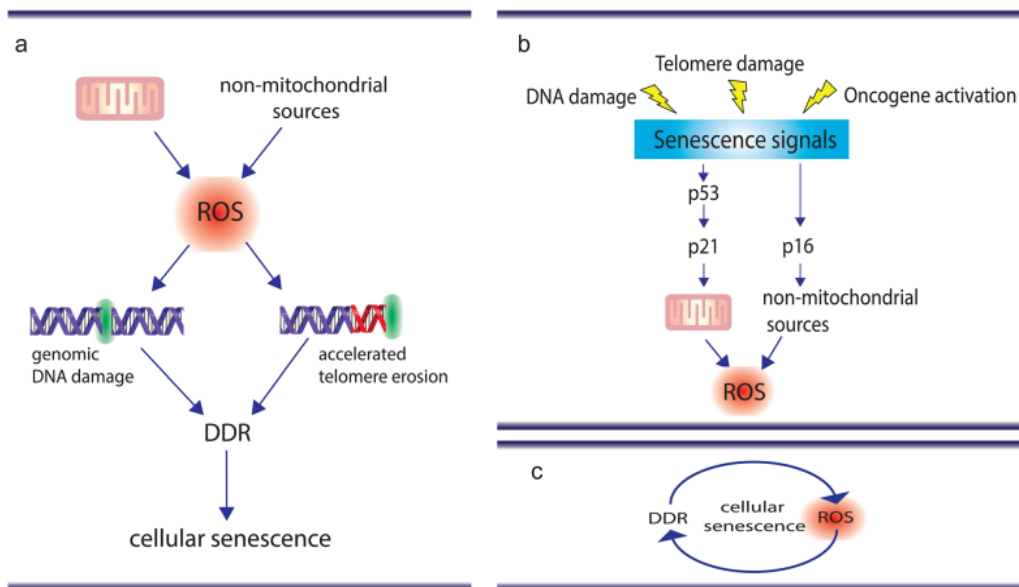
B. Γενωμική βλάβη

Η τοποθεσία επάνω στο χρωμόσωμα του γ-foci που σχετίζεται με τη γήρανση καθορίζεται από το μήκος του τελομερούς και όχι από τις διαφορές των ειδών *per se*. Πολλά κύτταρα υφίστανται γήρανση ως απόκριση σοβαρής βλάβης του DNA (Σχήμα 8), ανεξάρτητα από τη θέση της βλάβης στο γονιδίωμα.³¹ Οι δικλωνικές θραύσεις του DNA, όπως αυτές που επάγονται από ιονίζουσα ακτινοβολία, αναστολείς τοποϊσομερασών και άλλους παράγοντες είναι πιθανοί επαγωγείς γήρανσης. Πολλοί τύποι κυτταροτοξικών χημειοθεραπειών είναι σοβαροί παράγοντες βλάβης του DNA οι οποίοι μπορούν να επάγουν γήρανση τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα.¹⁰ Βλάβες στο DNA που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε γήρανση (Σχήμα 9). Οι ROS αλληλεπιδρούν με τα βιολογικά μόρια και διακόπτουν την ομαλή σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA. Αυτή η διακοπή σχετίζεται κυρίως με την αναστολή/απενεργοποίηση των βασικών αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών όπως επίσης και των επιδιορθωτικών ενζύμων του DNA. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει μηχανισμούς-κλειδιά που διασφαλίζουν την αποφυγή γενωμικής αστάθειας.³²



Σχήμα 8: Αποκρίσεις στη βλάβη του DNA.¹⁰

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες συχνά προκαλεί βλάβη στις βάσεις του DNA και/ή μονοκλωνικές θραύσεις. Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής ή της επιδιόρθωσης εκτομής βάσεων (base excision repair, BER) αυτές οι βλάβες μπορεί να μετατραπούν σε δικλωνικές θραύσεις. Τέλος, το οξειδωτικό στρες μπορεί να επιταχύνει τη βράχυνση των τελομερών, κυρίως διότι το πλούσιο σε βάσεις G τελομερικό DNA είναι ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη.⁷ Τόσο η γήρανση που επάγεται από βλάβη όσο και η γήρανση που επάγεται από βράχυνση του τελομερούς εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη p53 και συνήθως συνοδεύονται από έκφραση του p21. Παρόλα αυτά, σε πολλά κύτταρα η βλάβη του DNA και τα δυσλειτουργικά τελομερή επάγουν επίσης την p16, έστω και με καθυστερημένη κινητική. Η p16 αποτελεί ένα δεύτερο εμπόδιο ώστε να αποτρέψει την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν υποστεί σοβαρή βλάβη του DNA τους ή έχουν μη λειτουργικά τελομερή.¹⁰



Σχήμα 9: Δυο διαφορετικά μοντέλα με τα οποία οι ενεργές ελεύθερες ρίζες μπορούν να επιδράσουν στην κυτταρική γήρανση. a) ROS που παράγονται από μιτοχονδριακές και μη-μιτοχονδριακές πηγές μπορούν να επάγουν βλάβη στο DNA και να επιταχύνουν διάβρωση/βλάβη του τελομερούς και συνεπώς ενεργοποίηση του DDR. b) Οι ROS μπορούν να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια στη γήρανση: η ενεργοποίηση σημάτων γήρανσης καταλήγει σε αυξημένη παραγωγή ROS. c) Απλοποιημένο μοντέλο κυκλικής ανατροφοδότησης που περιλαμβάνει τις ROS και τη βλάβη του DNA. Η μη κάλυψη του τελομερούς ή η γενική βλάβη του DNA πυροδοτεί ένα DDR το οποίο έχει ως αποτέλεσμα παραγωγή ROS. Η παραγωγή ROS οδηγεί σε επιπρόσθετη βλάβη στο DNA, σταθεροποιώντας το DDR και οδηγώντας σε μια σταθερή αναστολή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης.³³

Γ. Διαταραχή της χρωματίνης – Επιγενετική βλάβη

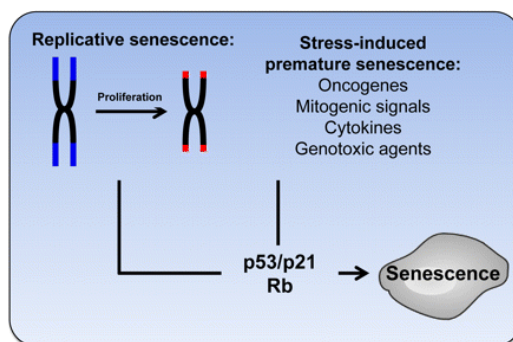
Η κυτταρική γήρανση συνεπάγεται μεγάλες αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης. Η κατάσταση της χρωματίνης καθορίζει το βαθμό κατά τον οποίο τα γονίδια είναι ενεργά (ευχρωματίνη) ή ανενεργά (ετεροχρωματίνη) και εξαρτάται κυρίως από τις τροποποιήσεις των ιστονών (π.χ ακετυλίωση και μεθυλίωση). Η χημική αναστολή της διακετυλάσης της ιστόνης HDACi (histone deacetylase inhibitors) η οποία προάγει το σχηματισμό της χρωματίνης επάγει γήρανση. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητός και μπορεί να διαφέρει ανάλογα το είδος και το κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, σε ανθρώπινες ινοβλάστες, η HDACi διαδοχικά επάγει την έκφραση των p21 και p16, και η διακοπή της ανάπτυξης λόγω γήρανση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία της pRB. Αντιθέτως, σε ινοβλάστες ποντικού, το μονοπάτι της p53 είναι σημαντικότερο για την απόκριση της γήρανσης από ότι η HDACi. Επιγενετικές διαταραχές μπορούν να προκαλέσουν DDR απουσία φυσικής βλάβης του DNA. Οι αναστολείς της HDACi μπορεί να επάγουν τη δραστικότητα της κινάσης ATM (Ataxia

telangiectasia mutated, ATM), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει γήρανση σε κάποια κύτταρα με το να ξεκινήσει p53-εξαρτώμενη απόκριση βλάβης του DNA, DDR χωρίς βλάβη του DNA.^{10,7}

Δ. Γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια

Η κυτταρική γήρανση μπορεί επίσης να προκληθεί από ισχυρά, χρόνια, ή μη ισορροπημένα μιτογόνα σήματα, σύμφωνα με το ρόλο της στην καταστολή της ογκογένεσης (Σχήμα 10).⁷ Το καλύτερα μελετημένα παραδείγματα είναι οι αποκρίσεις γήρανσης που προκαλούνται από ορισμένα ογκογονίδια.¹² Τα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένες εκδοχές των φυσιολογικών γονιδίων που έχουν το δυναμικό να μεταμορφώνουν τα κύτταρα σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις. Τα φυσιολογικά κύτταρα ανταποκρίνονται στα ογκογονίδια με το να εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης.¹⁰ Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε αρχικά όταν ένας ογκογόνος τύπος του RAS, H-RAS (H-RASV12), ο οποίος χρονίως διεγείρει το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνο (mitogen-activated protein kinase, MAPK), εκφράστηκε σε φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες.³⁴ Κατά συνέπεια, άλλα μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS (πχ, RAF, MEK, MOS και BRAF), καθώς επίσης και προπολλαπλασιαστικές πυρηνικές πρωτεΐνες δείχθηκε ότι προκαλούν γήρανση όταν υπερεκφράζονται ή εκφράζονται σε ογκογόνες μορφές.¹⁰ Η απόκριση της γήρανσης μπορεί να εξουδετερώνει την υπερβολική μιτογόνο διέγερση που προκαλείται από τα ογκογονίδια που διεγείρουν την κυτταρική ανάπτυξη, η οποία θέτει τα κύτταρα σε κίνδυνο χρωμοσωμικής αστάθειας και κατά συνέπεια ογκογονικής μεταμόρφωσης.³⁵ Επιπλέον τα κύτταρα εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης σε απόκριση της υπερέκφρασης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων όπως οι ERBB2. Χρόνια σηματοδότηση από τον TGF (Transforming Growth Factor B), έναν αναστολέα του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων, επάγει γήρανση προωθώντας έναν p16–pRB εξαρτώμενο σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Επίσης οξεία διέγερση από κυτταροκίνες όπως ιντερφερόνη-β αναστέλλει αντιστρεπτά την κυτταρική ανάπτυξη. Τέλος, απώλεια της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN (phosphatase and tensin homolog), η οποία αμβλύνει τα μιτογόνα σήματα και διάφορες άλλες μορφές χρόνιας ή υψηλής έντασης μιτογόνου διέγερσης οδηγούν σε γήρανση.^{7,10}

Πώς όμως τα υπερφυσιολογικά (supraphysiological) εξωτερικά σήματα επάγουν γήρανση; Παραδόξως ένας μηχανισμός είναι με το να επάγουν βλάβη στο DNA. Κάποια ογκογονίδια και ισχυρά μιτογόνα ερεθίσματα προκαλούν βλάβη του DNA και επίμονη σηματοδότηση DDR, πιθανόν ως συνέπεια ακατάλληλης πυροδότησης της αντιγραφής και κατάρρευση της δικάλας αντιγραφής. Η γήρανση που επάγεται από ογκογονίδιο συνδέεται με «σημεία» αντιγραφικού στρες του DNA, συμπεριλαμβανομένων των πρόωρα τερματισμένων δικάλων αντιγραφής και των δικλωνικών θραύσεων.¹¹ Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός δε μπορεί να εξηγήσει όλες τις περιπτώσεις γήρανσης. Παραδείγματος χάρη, η υπερ-ενεργοποίηση της κινάσης επαγόμενης από στρες p38MAPK επάγει γήρανση σε φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες με DDR-ανεξάρτητο μηχανισμό. Η p38MAPK είναι σημαντική για την αναστολή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης, λόγω της ικανότητας της να ενεργοποιεί τα μονοπάτια p53 και pRb/p16.³⁶ Ομοίως, η ενεργοποίηση της ATR, μιας πρωτεΐνη του DDR που αποκρίνεται στο αντιγραφικό στρες, μπορεί να επάγει γήρανση απουσία βλάβης του DNA.⁶ Οποιοδήποτε και αν είναι το αρχικό συμβάν, τα μιτογόνα σήματα τελικά εμπλέκουν τα μονοπάτια p53/p21 και/ή p16INK4a/pRB.⁷



Σχήμα 10: Οι συνθήκες που οδηγούν στη γήρανση σε κύτταρα και ιστούς.³⁸

1.6 Δείκτες της γήρανσης

Αρκετοί δείκτες μπορούν να προσδιορίσουν κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης σε καλλιέργεια και *in vivo*. Ωστόσο, κανένας δείκτης δεν είναι αποκλειστικός για την κατάσταση γήρανσης. Ένα χαρακτηριστικό αυτών των δεικτών είναι ότι, πέρα από τη φθίνουσα αντιγραφή του DNA, όλοι τους απαιτούν αρκετές ημέρες για να εμφανιστούν. Ένας προφανής δείκτης για τα κύτταρα σε γήρανση είναι η έλλειψη της αντιγραφής του DNA, η οποία τυπικά ανιχνεύεται από την ενσωμάτωση της **5-βρωμοδεοξουριδίνης** ή **3H-θυμιδίνης**, ή με ανοσοχρώση για πρωτεΐνες όπως οι PCNA και Ki-67.¹⁰ Αυτοί οι δείκτες δεν διακρίνουν μεταξύ κυττάρων σε γήρανση και κυττάρων που βρίσκονται σε ηρεμία ή διαφοροποιημένων μετα-μιτωτικών κυττάρων. Ο πρώτος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για τον πιο συγκεκριμένο προσδιορισμό των κυττάρων σε γήρανση ήταν η **SA-βgal**. Αυτός ο δείκτης είναι ανιχνεύσιμος με ιστοχημική χρώση στα περισσότερα κύτταρα σε γήρανση σε pH 6, παρέχει δε *in situ* απόδειξη για την πιθανή ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων και συσσωρεύεται *in vivo* με την ηλικία.³⁹ Ωστόσο, επίσης επάγεται από στρες όπως η παρατεταμένη παραμονή της καλλιέργειας στη φάση πληρότητας.¹⁰

Είναι απαραίτητο να καθοριστεί η προέλευση της δραστηριότητας της SA-β-gal για να καθοριστεί η βάση για την επαγωγή της κατά τη διάρκεια της γήρανσης και η καταλληλότητά της ως δείκτης που προσδιορίζει τα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης. Η SA-βgal πιθανώς προέρχεται από την λυσοσωμική β-γαλακτοζιδάση που είναι εντοπισμένη στα λυσοσώματα των θηλαστικών και αντανάκλα την αυξημένη λυσοσωμική βιογένεση που συνήθως συμβαίνει στα κύτταρα σε γήρανση.⁴⁰ Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα στο σχεδιασμό μεγάλης κλίμακας μελετών κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινες βλάβες είναι ότι η χρώση SA-β-gal χρειάζεται νωπό ιστό καθώς βασίζεται σε ενζυματική αντίδραση. Σε μια προσπάθεια για την εύρεση ενός βιοδείκτη της κυτταρικής γήρανσης που θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε αρχειακό υλικό ιστού, μονιμοποιημένου σε φορμαλίνη και εγκλεισμένου σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), καθιερώθηκε η λιποφουσκίνη. Η λιποφουσκίνη είναι ένα άθροισμα (συσσωμάτωμα) οξειδωμένων πρωτεϊνών που συσσωρεύεται σταδιακά ως επί το πλείστον σε γηρασμένα μετα-μιτωτικά κύτταρα. Ο συν-εντοπισμός της λιποφουσκίνης και της SA-β-gal στα γηρασμένα κύτταρα *in vitro* και *in vivo* (κρυο-διατηρημένου ιστού) υποστηρίζει την υποψηφιότητα της λιποφουσκίνης για βιοδείκτη της κυτταρικής

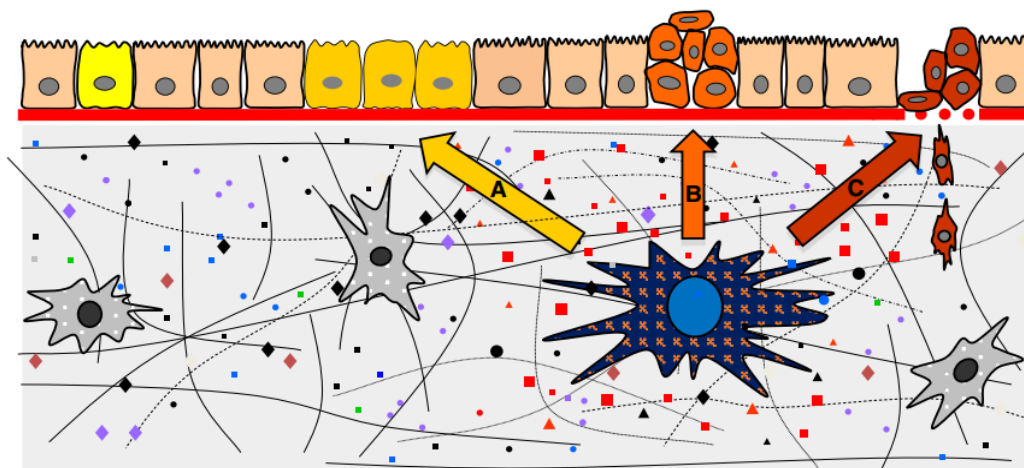
γήρανσης. Το Sudan Black B (SBB) είναι μια λιπόφιλη ιστοχημική χρωστική που αναγνωρίζει τη λιποφουσκίνη και εφαρμόζεται για *in vitro* και *in situ* μελέτες.⁴¹

Επιπλέον, η p16^{INK4a} - ένας σημαντικός ρυθμιστής της γήρανσης - χρησιμοποιείται τώρα για τον εντοπισμό κυττάρων σε γήρανση.⁴² Η p16^{INK4a} εκφράζεται από πολλά, αλλά όχι όλα, τα κύτταρα σε γήρανση και εκφράζεται επίσης από ορισμένα κύτταρα όγκου, ιδιαίτερα εκείνα που έχουν χάσει τη λειτουργία της pRb.¹⁰

1.7 Κύτταρα σε γήρανση και καρκίνος

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι, εκτός από το να οδηγήσουν σε εκφυλιστική παθολογία, τα κύτταρα σε γήρανση μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε παθολογία υπερπλασίας. Η πιο πειστική απόδειξη για τη δραστηριότητα αυτή προέρχεται από μελέτες ξενομοσχεύματος. Έχει δείχθει ότι τα γηρασμένα κύτταρα διεγείρουν την ανάπτυξη του όγκου *in vivo*, και η δραστηριότητα αυτή οφείλεται εν μέρει στην έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (matrix metalloproteinases, MMPs) από τα γηρασμένα κύτταρα.⁴³ Άλλα συστατικά του SASP όπως IL-6, IL-8 και GRO προωθούν επίσης την διήθηση των κυττάρων του όγκου, ενώ ο VEGF προωθεί όγκο-επαγόμενη αγγειογένεση.^{43,44}

Εκτός από τη διέγερση ανάπτυξης όγκου σε ποντικούς, οι παράγοντες του SASP μπορούν να διεγείρουν κακοήθεις φαινότυπους σε καλλιέργεια. Ένας τέτοιος φαινότυπος είναι η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (epithelial-mesenchymal transition, EMT) (Σχήμα 11). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της EMT είναι η αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας. Η αύξηση αυτή οφείλεται εν μέρει σε αναδιατάξεις στην ακτίνη του κυτταροσκελετού, και την αντικατάσταση των ενδιάμεσων ινιδίων κυτοκερατίνης από ενδιάμεσα ινίδια βιμεντίνης, που μετασχηματίζει το κύτταρο από ένα κυβοειδές σε ένα αξονικό σχήμα.⁴⁵ Αυτή η μορφολογική μετάβαση επιτρέπει στα μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα να εισβάλουν και να μεταναστεύουν μέσω των ιστών και είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη του μεταστατικού καρκίνου. Ινοβλάστες που βρίσκονται σε γήρανση επάγουν μια επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση σε κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα και μη επιθετικά επιθηλιακά κύτταρα εν μέρει μέσω της έκκρισης των IL-6 και IL-8.⁷



Σχήμα 11: Ο SASP και η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση. Α) Ένας γηρασμένος ινοβλάστης (μπλε πυρήνας) στο στρώμα εκκρίνει ποικίλους παράγοντες που διεγείρουν τα νεοπλαστικά επιθηλιακά κύτταρα (κίτρινα κύτταρα) να πολλαπλασιαστούν. Β) Ο SASP διεγείρει τα μετασχηματισμένα κύτταρα να εισέλθουν στην κατάσταση EMT (πορτοκαλί κύτταρα). Γ) Τελικά ο SASP προωθεί την εισβολή των κυττάρων που μοιάζουν με μεσεγχυματικά (κόκκινα κύτταρα) στο στρώμα.⁴⁵

Η εικόνα που προκύπτει, λοιπόν, είναι ότι κύτταρα σε γήρανση συσσωρεύονται με την ηλικία, δημιουργώντας ένα μικροπεριβάλλον στον ιστό που είναι ανεκτικό για την ανάπτυξη ή τουλάχιστον την εξέλιξη του καρκίνου. Τα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης μπορούν επίσης να προωθήσουν την έναρξη του καρκίνου⁷. Ο SASP μπορεί επίσης να διεγείρει τη φλεγμονή.⁴⁶ Επιπλέον, είναι πιθανόν παράγοντες που προέρχονται από τον SASP να διεγείρουν τη διήθηση των λευκοκυττάρων, η οποία παράγει τοξικά μόρια που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη του DNA.⁷

Υπάρχει, βέβαια, διάσταση με τις διαπιστώσεις ότι τα κύτταρα σε γήρανση μπορούν να τροφοδοτήσουν έναν κακοήγη φαινότυπο και να προωθήσουν την ανάπτυξη όγκου σε συνδυασμό με την υπόθεση ότι τα κύτταρα εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης για την πρόληψη της διάδοσης των κατεστραμμένων κυττάρων, τα οποία είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου. Ακόμη πιο «ειρωνικό» είναι το εύρημα ότι τα κύτταρα σε γήρανση, ιδιαίτερα εκείνα που εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης σε απόκριση ακτινοβολίας που βλάπτει το DNA ή λόγω χημειοθεραπευτικών παραγόντων, εκκρίνουν ουσίες που μπορεί να προστατεύσουν τα γειτονικά καρκινικά κύτταρα από το να καταστραφούν από τους ίδιους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Αυτοί οι SASP χημειοπροστατευτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τους WNT16B, IL-6 και τον αναστολέα ιστού των μεταλλοπρωτεϊνών-1 (tissue inhibitors of

metalloproteinases, TIMP-1). Σε αντίθεση, τουλάχιστον μερικά συστατικά του SASP μπορεί να είναι ευαίσθητα στη χημειοθεραπεία (χημειοευαίσθητοποιητικά). Για παράδειγμα, η γενική καταστολή του SASP (μέσω αναστολής του NF-κB) είχε ως αποτέλεσμα αντίσταση στη χημειοθεραπεία σε ένα μοντέλο λεμφώματος ποντικού.⁷

1.7.1 Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην ογκοκαταστολή

Παρά το γεγονός ότι πολλά από τα στοιχεία που συνδέουν την κυτταρική γήρανση και τις ογκοκατασταλτικές οδούς προέρχονται από κυτταροκαλλιέργεια, υπάρχουν σημαντικά αποδεικτικά στοιχεία από άθικτους οργανισμούς. Ίσως η καλύτερη απόδειξη προέρχεται από ποντικούς στους οποίους τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες p53 ή INK4a αδρανοποιούνται στη βλαστική σειρά. Τα κύτταρα που προέρχονται από αυτά τα ζώα αποτυγχάνουν να εισέλθουν σε κατάσταση γήρανσης ως απόκριση σε πολλαπλά ερεθίσματα. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα ζώα αναπτύσσουν καρκίνο σε πρώιμη ηλικία.⁴⁷ Αντίθετα, ένας γενετικός χειρισμός που προκαλεί πρόωρη γήρανση των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων καταστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού σε νεαρά ποντίκια που εκτίθενται στον ιό του μαστικού όγκου ποντικού.⁴⁸ Παρομοίως, κύτταρα από ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni, που φέρουν μεταλλάξεις στην p53 ή CHK2, διαφεύγουν της γήρανσης πολύ πιο εύκολα από τα κανονικά κύτταρα. Οι άνθρωποι με αυτές τις μεταλλάξεις είναι επίσης ευάλωτοι σε ανάπτυξη καρκίνου. Επίσης, μερικές προνεοπλαστικές βλάβες περιέχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων που εκφράζουν δείκτες γήρανσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απόκριση της γήρανσης διακόπτει την εξέλιξη τους σε κακοήθεια.¹⁰

1.7.2 Ο ρόλος του SASP στην ογκοκαταστολή

Γιατί ο πολύπλοκος φαινότυπος της γήρανσης, και ιδιαίτερα ο SASP, εξελίχθηκαν; Πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι υπάρχουν ευεργετικά αποτελέσματα της κυτταρικής γήρανσης και του SASP. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η αναστολή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης καταστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου. Μήπως ο SASP παίζει ρόλο σε αυτή την κατεύθυνση; Πράγματι, ορισμένα συστατικά του SASP προφανώς δρουν με έναν αυτοκρινή τρόπο για να στηρίξουν αυτή τη διακοπή της ανάπτυξης.⁷

Σε ανθρώπινα κύτταρα, οι IL-6 και IL-8, και η δεσμευτική πρωτεΐνη ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 7 (insulin-like growth factor-binding protein 7, IGFBP7) ενισχύουν την διακοπή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης που προκαλείται από τις ογκογόνες μορφές των RAS και BRAF. Η BRAF είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης που λειτουργεί ως άμεσος καθοδικός τελεστής του RAS. Ο RAS και ο BRAF συμμετέχουν στη μεταγωγή εξωκυτταρικών σημάτων προς το εσωτερικό του κυττάρου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν και τις δυο πρωτεΐνες συχνά μεταλλάσσονται στον ανθρώπινο καρκίνο.⁴⁹

Επιπλέον η έκφραση του Gro-1 (growth-regulated oncogene) ενεργοποιείται από την RAS και είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων και τον κακοήγη μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων των ωοθηκών. Παραδόξως, βρέθηκε ότι το Gro-1 είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της γήρανσης σε ινοβλάστες του στρώματος και αυτή η επίδραση εξαρτάται από λειτουργική p53. Ινοβλάστες σε γήρανση η οποία προκλήθηκε από Gro-1 μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου, ενώ η διαφυγή της γήρανσης μέσω αθανατοποίησης έχει ως αποτέλεσμα στην απώλεια της εν λόγω δραστηριότητας προώθησης του όγκου.⁵⁰ Έτσι, τουλάχιστον ορισμένοι παράγοντες SASP βοηθούν στην εγκαθίδρυση της απόκρισης της γήρανσης επαγόμενης από ογκογονίδιο.⁷ Σε κύτταρα ποντικού, ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) που είναι παράγοντας του SASP ενισχύει την κυτταρική γήρανση. Η καταστολή του γονιδίου-στόχου της p53 που κωδικοποιεί το PAI-1 οδηγεί σε διαφυγή από την κυτταρική γήρανση τόσο σε πρωτογενείς ινοβλάστες εμβρύου ποντικού και πρωτογενείς ανθρώπινες ινοβλάστες.⁵¹ Αυτό το εύρημα μπορεί να περιπλεχθεί από το γεγονός ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ποντικού που καλλιεργούνται σε περιβάλλον με συγκεντρώσεις

οξυγόνου, περίπου 20%, που είναι ουσιαστικά υψηλότερη από τη συγκέντρωση οξυγόνου στην οποία τα κύτταρα είναι εκτεθειμένα *in vivo*, έχει μόνο μερικά χαρακτηριστικά της απόκρισης της γήρανσης που επάγεται κάτω από φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου. Παρομοίως, ο εκκρινόμενος WNT16B αποτελεί σημαντικό παράγοντα επιβολής της αναστολής ανάπτυξης λόγω γήρανσης των ανθρώπινων ινοβλαστών σε καλλιέργεια, καθώς και των κυττάρων ποντικίου που εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης *in vivo* λόγω έκφρασης ενός ενεργοποιημένου RAS ογκογονιδίου.⁷

1.8 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της γήρανσης

Τα κύτταρα σε γήρανση σταματούν στη φάση G1 και δεν έχουν την ικανότητα να εισέρθουν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου ακόμα και ύστερα από μιτογόνο διέγερση. Τα μονοπάτια που οδηγούν στη κυτταρική γήρανση συμπίπτουν με τα μονοπάτια που σχετίζονται με τα προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στη γήρανση περιλαμβάνουν την p53, την Rb1, τις κινάσες που επάγονται από το στρες και το PTEN. Απενεργοποίηση τουλάχιστον ενός από αυτά οδηγεί σε αθανατοποίηση των κυττάρων η οποία αντανακλάται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.³

A. Έλεγχος της γήρανσης από τα μονοπάτια p53 και p16-pRB

Η διακοπή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης δημιουργείται και διατηρείται από τα ογκοκατασταλτικά μονοπάτια των p53 και p16-pRB. Αυτά τα μονοπάτια αλληλοεπιδρούν αλλά μπορούν να σταματήσουν και ανεξάρτητα το κυτταρικό κύκλο. Σε κάποιο βαθμό, μπορούν επίσης να ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα. Επιπλέον, υπάρχουν τόσο διαφορές ως προς το κυτταρικό τύπο όσο και ως προς το είδος στην τάση με την οποία τα κύτταρα ακολουθούν το ένα ή το άλλο μονοπάτι, και στην ικανότητα κάθε μονοπατιού να επάγει γήρανση. Τέλος, αν και τα κύτταρα εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης λόγω εμπλοκής του μονοπατιών p53 και p16-pRB, υπάρχουν παραδείγματα γήρανσης που φαίνεται να είναι ανεξάρτητα από αυτά τα μονοπάτια. Τα παραδείγματα αυτά εγείρουν την πιθανότητα μιας p53 και p16-pRB - ανεξάρτητης γήρανσης.¹⁰

B. Το μονοπάτι p53

Μία από τις αιτίες της ενεργοποίησης της p53 εμφανίζεται να είναι η αύξηση στην έκφραση του p14^{ARF}, ενός ογκοκατασταλτικού παράγοντα. Ο p14^{ARF} (p19^{ARF} στο ποντίκι) διεγείρει την δραστηριότητα της p53, διότι απομονώνει την MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), μια πρωτεΐνη που διευκολύνει την αποικοδόμηση της p53. Έτσι, ο p14^{ARF} αποτρέπει την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback) της p53 από την MDM2. Ο p14^{ARF} επάγεται από E2P1, το ογκογονίδιο RAS και από βλάβες στο DNA.⁴⁷ Η πρωτεΐνη p21 είναι ένας κρίσιμος μεταγραφικός στόχος της p53 και διαμεσολαβητής της p53-εξαρτώμενης γήρανσης. Η p21 μεσολαβεί σε μια παροδική διακοπή της ανάπτυξης που επάγεται από βλάβη του DNA. Το γονίδιο p21^{CIP1/WAF1} το οποίο κωδικοποιεί έναν αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών υπερεκφράζεται στα γηρασμένα κύτταρα. Αντίστροφα, απενεργοποίηση του p21^{CIP1/WAF1} είναι συχνά αρκετή για να παρακαμφθεί η γήρανση.⁵²

Λοιπόν, τι είναι αυτό που καθορίζει αν τα κύτταρα εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης ή σταματούν να αναπτύσσονται παροδικά;

Η απάντηση είναι σήμερα άγνωστη. Όποια και αν είναι η απάντηση, πειραματική μείωση των p53, p21 ή πρωτεϊνών του DDR (για παράδειγμα, ATM ή CHK2) αποτρέπουν τη γήρανση που προκαλείται από τα τελομερή ή άλλη βλάβη, και, σε ορισμένα κύτταρα (για παράδειγμα, αυτά που εκφράζουν λίγο ή καθόλου την p16 ή το ογκογόνο RAS), μπορεί ακόμη και να αντιστρέψει την αναστολή της ανάπτυξης λόγω γήρανσης. Ο πολλαπλασιασμός των κατεστραμμένων κυττάρων με μειωμένη λειτουργία του DDR και της p53 συχνά δεν μπορεί να διατηρηθεί, επειδή τα τελομερή τελικά υφίστανται εκτεταμένη βλάβη, οδηγώντας σε μια κατάσταση εκτεταμένης γενωμικής αστάθειας και κυτταρικό θάνατο που ονομάζεται κρίση ή μιτωτική καταστροφή.¹⁰

Η γήρανση που επάγεται από βράχυνση των τελομερών αναφέρεται συχνά ως M1 (mortality phase 1). Τα ανθρώπινα κύτταρα που διαφεύγουν της τελομερο-επαγόμενης γήρανσης (M1) λόγω την απώλεια της λειτουργίας του p53 μπορούν να πολλαπλασιαστούν μέχρι να περιέλθουν σε μια κατάσταση που ονομάζεται **κρίση, μιτωτική καταστροφή ή φάση θνησιμότητας 2** (mortality phase 2, M2). Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη γενωμική αστάθεια και κυτταρικό θάνατο.⁵³

Το DDR και το μονοπάτι p53 παρέχουν μια πρώτη γραμμή άμυνας κατά του καρκίνου εμποδίζοντας την ανάπτυξη των κυττάρων με σοβαρές βλάβες στο DNA, τα οποία βρίσκονται σε κίνδυνο ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού ογκογόνων μεταλλάξεων. Ωστόσο, η απώλεια της p53 ή ένα ανέπαφο DDR - είτε πριν τα κύτταρα υποστούν βλάβη ή μετά από γήρανση που προκαλείται από τη βλάβη - συνήθως οδηγεί σε μιτωτική καταστροφή, η οποία ενεργεί ως ένα δεύτερο εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί με σταθεροποίηση του τελομερούς.¹⁰

Γ. Το μονοπάτι p16-pRB

Ερεθίσματα που προκαλούν DDR μπορούν επίσης να εμπλακούν στο μονοπάτι p16-pRB, αλλά αυτό συνήθως συμβαίνει μετά την εμπλοκή του μονοπατιού p53.⁵⁵ Η pRB υπάρχει μόνο σε ενεργή (υποφωσφορυλιωμένη) μορφή στα γηρασμένα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα κύτταρα σε γήρανση εκφράζουν υψηλά επίπεδα των p21, p16, και, σε ορισμένες περιπτώσεις, p27.⁵⁶ Το ογκογόνο RAS επάγει την έκφραση της p16 με την ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής E26 ειδικών στο μετασχηματισμό (E26 transformation-specific, ETS).⁵⁷ Η δραστηριότητα ETS εξουδετερώνεται με πρωτεΐνες ID, αναστολείς της δέσμευσης DNA/διαφοροποίησης (inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins, ID), οι οποίες ρυθμίζονται μειωτικά σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης. Οι πρωτεΐνες ID είναι αρνητικοί ρυθμιστικοί παράγοντες μεταγραφής που εμποδίζουν ορισμένους παράγοντες μεταγραφής έλικας-βρόχου-έλικας (helix-loop-helix, HLH) να συνδεθούν στο DNA.⁵⁸

Η p16 και η p21 είναι και οι δυο CDKIs. Έτσι, μπορούν να διατηρήσουν το pRB σε μια ενεργή, υποφωσφορυλιωμένη μορφή και με αυτόν τον τρόπο να εμποδίσουν τον E2F να μεταγράψει γονίδια που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό.²² Ωστόσο, οι p16 και p21 δεν είναι σαφώς ισότιμες.⁵⁹

Τα κύτταρα που εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης αποκλειστικά λόγω ενεργοποίησης του μονοπατιού p53-p21 μπορούν να ανακτήσουν την ανάπτυξη ύστερα από την απενεργοποίηση του μονοπατιού p53 και να συνεχίσουν να το κάνουν αυτό για πολλούς διπλασιασμούς μέχρι να συμβεί κρίση ή μιτωτική καταστροφή.¹⁰ Ωστόσο, αν και τα κύτταρα που εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης λόγω του ογκογόνου RAS (το οποίο προκαλεί έκφραση του p16)

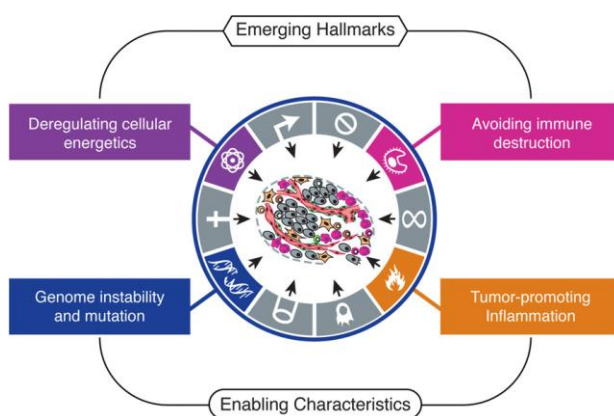
μπορούν να συνεχίσουν τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό, τα κύτταρα που εμπλέκονται πλήρως στο μονοπάτι p16-pRB για αρκετές ημέρες συνήθως δεν μπορούν να συνεχίσουν την ανάπτυξη, ακόμη και μετά την απενεργοποίηση των p53, p16 ή pRB.¹⁴ Επιπλέον, η απώλεια της δραστηριότητας p16-p53 ρυθμίζει ανοδικά την έκφραση των pRB και p21 εν μέρει επειδή ο E2F επίσης διεγείρει την έκφραση του ARF.⁶⁰ Παρά την αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ των οδών p53 και p16-pRB, υπάρχουν διαφορές στον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα αποκρίνονται όταν το ένα ή το άλλο μονοπάτι μεσολάβει στην απόκριση της γήρανσης.¹⁰

1.9 Γενωμική αστάθεια

Η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53* (που κωδικοποιεί την p53), της ATM και του εξαρτώμενου από κυκλίνη αναστολέα κινάσης 2A (*CDKN2A*, το οποίο κωδικοποιεί την p16INK4a και την p14ARF) υποστηρίζουν το μοντέλο του αντιγραφικού στρες του DNA που προκαλείται από ογκογονίδια (παράγραφος 1.9.2), το οποίο αποδίδει τη γενωμική αστάθεια και τις μεταλλάξεις του *TP53* και ATM στις βλάβες του DNA που προκαλούνται από ογκογονίδια.⁶¹

Το 2000 οι Hanahan και Weinberg περιέγραψαν έξι λειτουργικές δυνατότητες των καρκίνων που ονομάστηκαν χαρακτηριστικά του καρκίνου. Αυτές τα έξι χαρακτηριστικά ήταν: 1) αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης, 2) έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα που αναστέλλουν την ανάπτυξη, 3) αντίσταση στην απόπτωση, 4) αγγειογένεση, 5) διήθηση στον ιστό και μετάσταση και 6) απεριόριστο αντιγραφικό δυναμικό. Μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη μπορεί να αποτελούν τη βάση της αυτάρκειας στα σήματα ανάπτυξης. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στα παραπάνω χαρακτηριστικά δεν πρέπει να έχουν αποκτηθεί σε συγκεκριμένη σειρά. Η γενωμική αστάθεια υπολογίστηκε ξεχωριστά από τα έξι χαρακτηριστικά, υπό την έννοια ότι δεν είναι λειτουργική ικανότητα του καρκίνου *per se*, αλλά μια ιδιότητα που επιτρέπει την απόκτηση των χαρακτηριστικών του καρκίνου (Σχήμα 12). Η γενωμική αστάθεια είναι παρούσα σε όλα τα στάδια του καρκίνου, από προκαρκινικές αλλοιώσεις, ακόμα και πριν την απόκτηση *TP53* μεταλλάξεων και στους προχωρημένους καρκίνους. Υπάρχουν διάφορες μορφές γενωμικής αστάθειας. Οι περισσότεροι καρκίνοι έχουν τη μορφή που ονομάζεται χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN), η οποία αναφέρεται στον

υψηλό ρυθμό με τον οποίο η δομή των χρωμοσωμάτων και ο αριθμός αλλάζει με τον χρόνο στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα.⁶¹



Σχήμα 12: Δυο επιπλέον χαρακτηριστικά του καρκίνου. Το ένα αφορά τη δυνατότητα να τροποποιήσει ή να επαναπρογραμματίσει τον κυτταρικό μεταβολισμό, ώστε να υποστηρίξει αποτελεσματικότερα το νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό. Το δεύτερο επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να διαφεύγουν την ανοσολογική καταστροφή, ιδίως από τα T και B λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς. Επειδή καμία δυνατότητα από τις παραπάνω δεν είναι ακόμη γενικευμένη και επικυρωμένη πλήρως, οι δυνατότητες αυτές είναι χαρακτηρισμένες ως αναδυόμενα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, δύο επακόλουθα χαρακτηριστικά της νεοπλασίας διευκολύνουν την απόκτηση τόσο των βασικών χαρακτηριστικών όσο και των αναδυόμενων χαρακτηριστικών. Αυτά είναι η γενωμική αστάθεια και η ικανότητα μεταλλάξεων που προσδίδουν γενετικές αλλοιώσεις στα καρκινικά κύτταρα που οδηγούν στην εξέλιξη του όγκου. Επιπλέον, η φλεγμονή από τα κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος που αποσκοπούν στην καταπολέμηση των λοιμώξεων και στην επούλωση των πληγών μπορεί αντ' αυτού να οδηγήσει σε υποστήριξη πολλαπλών χαρακτηριστικών του καρκίνου.⁸

1.9.1 Τα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια

Η γενωμική αστάθεια, ειδικά η CIN, χαρακτηρίζει σχεδόν όλους τους ανθρώπινους σποραδικούς καρκίνους. Έτσι, μια ελκυστική υπόθεση είναι ότι τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια σε ανθρώπινο καρκίνο είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για την παρουσία της γενωμικής αστάθειας. Οι μελέτες δείχνουν ότι πολύ λίγα γονίδια είναι μεταλλαγμένα, διαγράφονται ή/και ενισχύονται με υψηλές συχνότητες σε σποραδικούς ανθρώπινους καρκίνους. Αυτά είναι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*, γονίδια σημείων ελέγχου βλαβών του DNA και γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων είτε θετικά (όπως τα ογκογονίδια *EGFR* και *RAS*) ή αρνητικά (όπως τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *CDKN2A* και *PTEN*).⁶¹

1.9.2 Μοντέλο αντιγραφικού στρες του DNA επαγόμενο από ογκογονίδια

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ο μηχανισμός με τον οποίο τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια επάγουν αστάθεια του γονιδιώματος περιλαμβάνει αντιγραφικό στρες του DNA. Ειδικές τοποθεσίες του γονιδιώματος, που ονομάζονται **κοινές εύθραυστες θέσεις**, είναι ευαίσθητες στο αντιγραφικό στρες του DNA. Στις ανθρώπινες καρκινικές βλάβες και σε διάφορα πειραματικά συστήματα στα οποία τα ογκογονίδια έχουν ενεργοποιηθεί, η γενωμική αστάθεια προσβάλλει επιλεκτικά τις κοινές εύθραυστες θέσεις. Η υψηλή συχνότητα των μεταλλάξεων TP53 σε ανθρώπινους καρκίνους θα μπορούσε επίσης να είναι σε απόκριση της επαγόμενης από ογκογονίδιο βλάβης του DNA. Σε καρκινικές αλλοιώσεις που συνήθως διατηρούν τη λειτουργία φυσιολογικά εκφραζόμενης p53 (wild type), η βλάβη του DNA που προκαλείται από ογκογονίδιο προκαλεί p53-εξαρτώμενη απόπτωση ή/και γήρανση, η οποία περιορίζει την ανάπτυξη της βλάβης. Όταν η λειτουργία της p53 χάνεται, τα κύτταρα μπορούν να διαφύγουν της απόπτωσης και της γήρανσης, και η προκαρκινική βλάβη μπορεί να γίνει καρκινική.⁶²

1.10 Η πρωτεΐνη p21

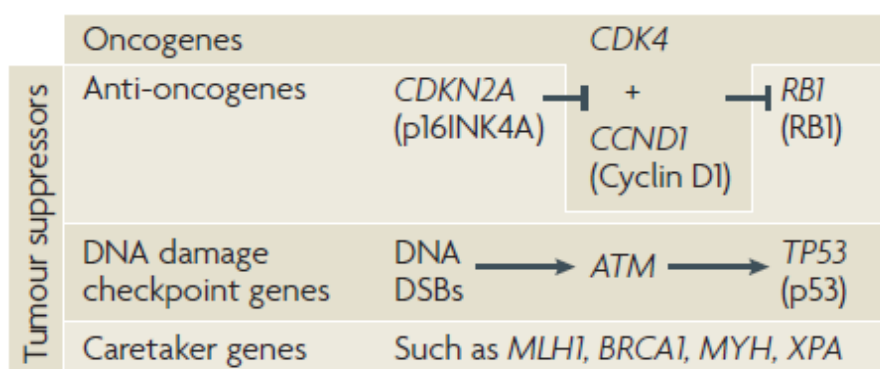
Μια από τις κύριες μηχανές που οδηγεί στον κυτταρικό μετασχηματισμό είναι η απώλεια του σωστού ελέγχου του κυτταρικού κύκλου των θηλαστικών. Ο εξαρτώμενος από κυκλίνη αναστολέας κινάσης p21 (επίσης γνωστός ως *p21^{WAF1/Cip1}*) προάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση προς πολλά ερεθίσματα. Ο p21 λειτουργεί τόσο ως αισθητήρας όσο και ως τελεστής πολλαπλών αντι-πολλαπλασιαστικών σημάτων.⁶³ Για να διαφυλαχθεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος, οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν πολύπλοκους μηχανισμούς εποπτείας, που ονομάζονται σημεία ελέγχου, τα οποία εξουδετερώνουν τις πανταχού παρούσες βλάβες του DNA που έχουν προκύψει από ενδογενείς (μεταβολικές) και περιβαλλοντικές γενοτοξικές προσβολές. Οι μηχανισμοί των σημείων ελέγχου παρακολουθούν και απαντούν σε κυτταρικές διαταραχές, διακόπτοντας την κυτταρική εξέλιξη μέχρι να επιδιορθωθούν τα λάθη ή το περιβάλλον να επιτρέψει την πιστή μετάδοση του γενετικού υλικού.⁶⁴ Κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης, τα καρκινικά κύτταρα συχνά «χαλαρώνουν» τα σημεία ελέγχου. Οι διαταραχές στους μηχανισμούς ελέγχου είναι επιζήμιες για την ακεραιότητα του γονιδιώματος και αυτό διευκολύνει την

ανάπτυξη του όγκου. Ωστόσο, αυτά τα ελαττώματα αντιπροσωπεύουν μια «Αχίλλειο πτέρνα» που μπορεί να γίνει στόχος για τη βελτίωση των σημερινών θεραπευτικών στρατηγικών.^{65,66}

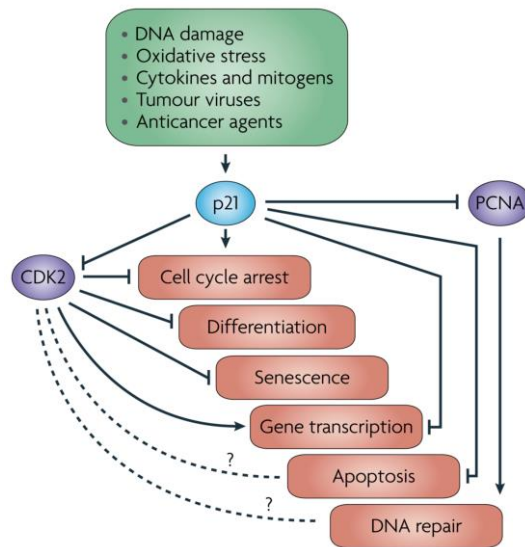
Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 μεσολαβεί στο επαγόμενο από βλάβη του DNA σημείο ελέγχου μέσω της ενεργοποίησης διάφορων ανασταλτικών της ανάπτυξης ή αποπτωτικών γονιδίων. Μεταξύ αυτών, η μικρή, 165 αμινοξέων πρωτεΐνη p21, που μεσολαβεί στην p53-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης στη φάση G1.^{67,68} Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η p21 καταστέλλει τους όγκους προωθώντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Επιπλέον, σημαντικά στοιχεία από βιοχημικές και γενετικές μελέτες δείχνουν ότι η p21 δρα ως κύριος τελεστής πολλαπλών ογκοκατασταλτικών μονοπατιών για την προώθηση των αντι-πολλαπλασιαστικών δραστηριοτήτων που είναι ανεξάρτητες από το κλασικό μονοπάτι της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (Πίνακας 1).⁶³

Πίνακας 1: Τάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να διαιρεθούν σε διακριτές κατηγορίες με βάση την κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Αντι-ογκογονίδια, όπως ο εξαρτώμενος από κυκλίνη αναστολέας της κινάσης 2A (CDKN2A) και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος 1 (Rb1), τα οποία κωδικοποιούν τις p16INK4a και RB1, αντίστοιχα, ανταγωνίζονται τις δραστηριότητες που προάγουν την ανάπτυξη των ογκογονιδίων, όπως CDK4 και CCND1, τα οποία κωδικοποιούν CDK4 και κυκλίνη D1, αντίστοιχα. Τα γονίδια σημείου ελέγχου των βλαβών DNA, όπως η ATM και ο καταστολέας όγκων TP53, τα οποία κωδικοποιούν την ATM και p53, αντίστοιχα, επάγουν κυτταρικό θάνατο ή γήρανση σε απόκριση βλάβης του DNA ή στρες αντιγραφής του DNA. Προστατευτικά γονίδια (γονίδια επιδιόρθωσης του DNA και τα μιτωτικά γονίδια σημείο ελέγχου, όπως MLH1 (BRCA1), MYH και η ομάδα Pigmentosum ξηροδερμίας A (XPA)) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος. Μερικοί καταστολείς όγκων έχουν περισσότερες από μία λειτουργία και θα μπορούσαν να ταιριάζουν σε περισσότερες από μία από τις κατηγορίες που περιγράφονται εδώ. Έτσι, η διάκριση που προτείνεται εδώ βασίζεται στην πρωταρχική λειτουργία.⁶¹



Παρά τον σπουδαίο ρόλο της p21 στην ανάσχεση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ικανότητά της να προάγει τη διαφοροποίηση και την κυτταρική γήρανση, πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, η πρωτεΐνη p21 μπορεί να προωθήσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση.⁶⁹ Η p21 μεσολαβεί σε διάφορες βιολογικές δραστηριότητες κυρίως με σύνδεση της στις CDKs, CDK2 και CDK1 (επίσης γνωστές ως CDC2), αναστέλλοντας τη δραστηριότητά τους και οδηγώντας σε διακοπή της ανάπτυξης σε συγκεκριμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, με δέσμευση στο PCNA, η p21 παρεμβαίνει στην δραστηριότητα της PCNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης με αποτέλεσμα να αναστέλλει την αντιγραφή του DNA και τη διαμόρφωση διαφόρων PCNA-εξαρτώμενων διεργασιών επιδιόρθωσης του DNA (Σχήμα 13).⁶³



Σχήμα 13: Η απόκριση της p21 σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα. Η p21 αποκρίνεται σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα για να επηρεάσει πλήθος φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης της και της ανασταλτικής της δράσης επί της CDK2 και του PCNA.⁶³

1.10.1 Επιδράσεις της p21 τόσο στην μετάβαση G1/S όσο και στην G2/M του κυτταρικού κύκλου

Έχει προταθεί ότι οι λειτουργίες των αναστολέων της κυκλίνου-εξαρτώμενης κινάσης p21^{Cip1/WAF1} και της p27^{Kip1} περιορίζονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου στην μετάβαση της φάσης G1/S και στη διατήρηση της κυτταρικής ηρεμίας. Για να ελεγχθεί η εγκυρότητα αυτής της υπόθεσης, η p21 εκφράστηκε σε ένα διαφορετικό πλαίσιο κυτταρικών σειρών, απομονώνοντας έτσι τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της p21 από τις πλειοτροπικές επιδράσεις των οδών σηματοδότησης που συνήθως επάγουν την έκφραση του p21. Τα στοιχεία δείχνουν ότι σε φυσιολογικά επίπεδα συσσώρευσης, η p21, εκτός από το ρόλο της στην αρνητική ρύθμιση της μετάβασης G1/S, συμβάλλει και στη ρύθμιση της μετάβασης G2/M. Παρατηρήθηκαν G1 και G2-ακίνητοποιημένα κύτταρα σε όλους τους τύπους κυττάρων, με διαφορετικές επικράτειες. Επικρατέστερη ήταν η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ως απόκριση της έκφρασης της p21 που συσχετίζεται με την παρουσία λειτουργικού pRb. Η αναστολή της ανάπτυξης στη φάση G2 ήταν πιο φανερή στα Rb-αρνητικά κύτταρα. Επιπλέον, ο ενδοαναδιπλασιασμός του DNA που συνέβη σε pRb-αρνητικά, αλλά όχι σε pRb-θετικά κύτταρα, υποδηλώνει ότι η λειτουργική pRb είναι αναγκαία για την πρόληψη της

αντιγραφής του DNA σε κύτταρα που σταμάτησαν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2 λόγω ενεργοποίησης του p21.⁷⁰

1.10.2 Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό κύκλο

Η p21 αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου κυρίως μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της CDK2, η οποία απαιτείται όχι μόνο για τη φωσφορυλίωση του Rb με την επακόλουθη αποδέσμευση και την ενεργοποίηση της E2F-εξαρτώμενης γονιδιακής έκφρασης, αλλά επίσης και για την πυροδότηση των σημείων εκκίνησης της αντιγραφής (replication origins) και για τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών που εμπλέκονται άμεσα στη σύνθεση του DNA.⁶³ Μηχανισμοί που αποτρέπουν την πρόωρη πυροδότηση της αντιγραφής και που εξασφαλίζουν ότι το DNA αντιγράφεται μόνο μία φορά κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την διατήρηση της γενωμικής ακεραιότητας.⁶⁹ Παρά το γεγονός ότι τη δραστηριότητα αυτή συμμερίζονται και άλλοι αναστολείς CDK της οικογένειας Cip/Kip όπως η p27Kip1 και η p57Kip2, βιοχημικές και γενετικές ενδείξεις υποδηλώνουν ότι έχουν διακριτούς ρόλους στην ογκογένεση. Παρ' όλα αυτά, η p21 προορίζεται μοναδικά για να λειτουργήσει ως ένας κεντρικός αναστολέας της CDK2 που ενεργοποιείται ως απόκριση σε μια ποικιλία κυτταρικών και περιβαλλοντικών σημάτων για την προώθηση ογκοκατασταλτικών δραστηριοτήτων.⁶³

Πειραματικές αποδείξεις ωστόσο έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, παρά την αναστολή της CDK2, π.χ. στον καρκίνο του παχέος εντέρου⁷¹. Επιπλέον, στοχευμένη αποσιώπηση (deletion) του CDK2 υποδεικνύει ότι η Cdk2 δεν είναι απαραίτητη για την μεσολαβούμενη από p21Cip1 αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβη του DNA.⁷² Η CDK1, τουλάχιστον σε ορισμένους ιστούς, μπορεί να είναι ο κύριος στόχος της p21 στην ογκογένεση επειδή η p21 αναστέλλει αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της κινάσης CDK1 τόσο σε κύτταρα που δεν έχουν υποστεί στρες όσο και σε κύτταρα που έχουν υποστεί γονοτοξικό στρες, οδηγώντας σε διακοπή της ανάπτυξης στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου.⁶³

1.10.3 Η φωσφορυλίωση της p21

Ενώ οι ανασταλτικές της ανάπτυξης λειτουργίες της p21 συνδέονται με τον πυρηνικό εντοπισμό της, οι ογκογόνες, πολλαπλασιαστικές και αντι-αποπτωτικές δραστηριότητες της συχνά συνδέονται με την κυτταροπλασματική συσσώρευση της.⁷ Στην πραγματικότητα, κυτταροπλασματική έκφραση της p21 είναι κοινή σε ανθρώπινες κακοήθειες και συσχετίζεται με επιθετικούς όγκους και αρνητική πρόγνωση.⁶³ Μέχρι πρόσφατα, είχε αποδειχθεί δύσκολο να συμβιβαστούν αυτές οι πολλαπλές και ενίοτε αντίθετες λειτουργίες της p21. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση της p21 σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης μπορεί να εξηγήσει μερικά από αυτά τα αντιφατικά χαρακτηριστικά⁷³. Η φωσφορυλίωση της p21 στη Ser130 από την CDK2-κυκλίνη E, για παράδειγμα, προωθεί την πρόσδεση της στην πρωτεΐνη που σχετίζεται με κινάση της φάσης S (S-phase kinase-associated protein 2, SKP2), οδηγώντας σε ουβικουτινυλίωση της και την επακόλουθη πρωτεόλυση, και έτσι προάγει την εξέλιξη στην G1/S μετάβαση του κυτταρικού κύκλου και κατά τη διάρκεια της φάσης S.⁷⁴⁻⁷⁶ Η φωσφορυλίωση της p21 στη Thr145 στη θέση δέσμευσης του PCNA από την AKT1 (επίσης γνωστή ως PKB) διαταράσσει την δέσμευση της με το PCNA, προκαλεί κυτταροπλασματική συσσώρευση και απαιτείται για διαμεσολαβούμενο από ERBB2 πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου του μαστού.⁶³

1.10.4 Απορρύθμιση της p21 στον καρκίνο

Μεγάλο μέρος των γνώσεών μας σχετικά με το ρόλο της p21 στον καρκίνο έχει προέλθει από μελέτες σε ποντίκι knockout που δε λειτουργούσε το συγκεκριμένο γονίδιο σε συνδυασμό με την βιοχημική και λειτουργική ανάλυση των κυττάρων σε καλλιέργεια. Πολύ σημαντικό έργο προήλθε από την αρχική ανακάλυψη της p21 ως δυνητικής μεσολαβητικής πρωτεΐνης της ογκοκατασταλτικής δραστηριότητας της p53.⁸ Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που η διαγραφή των *Cdkn1a* σε ποντίκια κατήργησε την αναστολή της ανάπτυξης που προκαλείται από βλάβη του DNA και είναι p53-εξαρτώμενη, δεν είχε καμία επίδραση στην p53-εξαρτώμενη απόπτωση. Έτσι, η p21 δεν θα μπορούσε, ως εκ τούτου, να ευθύνεται για όλες τις ογκοκατασταλτικές δραστηριότητες της p53.⁶³ Παρόλα αυτά η διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω της p21 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη p53-εξαρτώμενη προστασία από τον καρκίνο διότι διαγραφή του *Cdkn1a* επιταχύνει δραστικά το

σχηματισμό όγκων στα ποντίκια που εκφράζουν μία μεταλλαγμένη μορφή της p53 (*Trp53^{R172P+/+}*) που είναι ανίκανη να επάγει απόπτωση αλλά διατηρεί μερική δραστηριότητα αναστολής της ανάπτυξης.⁷⁷⁻⁷⁹

Μια σημαντική εικόνα για το ρόλο της p21 στην καταστολή του όγκου προήλθε από μελέτη των Shen et al. αποδεικνύοντας έναν εξέχοντα ογκοκατασταλτικό ρόλο για τη p21 σε γενωμικές αστάθειες.⁸⁰ Ανεπάρκεια του Cdkn1a «συνεργάστηκε» με την απώλεια της πρωτεΐνης του σημείου ελέγχου βλαβών του DNA, ATM στην προώθηση ανευπλοειδίας που προηγήθηκε της ανάπτυξης του όγκου.⁸⁰ Επιπλέον, η διαπίστωση ότι η αρνητική ρύθμιση της p21 σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) σε καρκίνο του παχέος εντέρου, ανεξάρτητα από τη κατάσταση της p53^{81,82}, υποστηρίζει το συμπέρασμα ότι η απώλεια της προστασίας έναντι της γενωμικής αστάθειας από τη p21 συμβάλλει σε ανθρώπινη κακοήθεια.

Επιπλέον, η p21 προωθεί την σταθερότητα του γονιδιώματος σε βλαστικά κύτταρα, τόσο διατηρώντας την ικανότητα αυτο-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων όσο και, ενδεχομένως, συμβάλλοντας στο ογκογόνο δυναμικό του.⁶³

1.10.5 Ογκογόνες δραστηριότητες της p21

Η απλή άποψη ότι η p21 δρα ως καταστολέας των όγκων έχει περιπλεχθεί από τη διαπίστωση ότι η p21 μπορεί επίσης να εμφανίζει ογκογόνες δραστηριότητες. Η p21 υπερεκφράζεται σε μία ποικιλία καρκίνων του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένων του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας, του μαστού και καρκινώματα των πλακωδών κυττάρων και, σε πολλές περιπτώσεις, η αυξητική ρύθμιση της p21 συσχετίζεται θετικά με το βαθμό του όγκου, την εισβολή και την επιθετικότητα και είναι ένας ασθενής προγνωστικός δείκτης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις η p21 είναι κυτταροπλασματική και έτσι η ογκογόνος λειτουργία της μπορεί να εξαρτάται από μη παραδοσιακούς κυτταροπλασματικούς στόχους της πρωτεΐνης.⁶³

1.11 ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία θα πραγματοποιηθεί υπερμικροσκοπική μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία της καρκινικής κυτταρικής σειράς Saos2, που αποτελείται από κύτταρα οστεοσαρκώματος με μη-λειτουργική πρωτεΐνη p53, μετά από επαγωγή έκφρασης του γονιδίου $p21^{CIP1/WAF1}$ η οποία οδηγεί τα κύτταρα σε γήρανση. Ο αναστολέας κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη $p21^{WAF1/CIP1}$ εκδηλώνει αντι-πολλαπλασιαστικές δραστηριότητες μέσω p53-εξαρτώμενης και p53-ανεξάρτητης οδού. Ωστόσο, ο $p21^{WAF1/CIP1}$ μπορεί επίσης να προωθήσει την ογκογένεση.

Συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιηθεί το επαγωγίμο κυτταρικό σύστημα Saos2-TetON p21 και θα γίνει επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου $p21^{WAF1/CIP1}$ σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Στα χρονικά διαστήματα αυτά, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη έχει παρατηρηθεί σταδιακή εμφάνιση γήρανσης και τελικά διαφυγή γήρανσης σε υποπληθυσμό κυττάρων, τα οποία είχαν αποκτήσει χαρακτηριστικά επιθετικών καρκινικών κυττάρων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σταδιακή επαγωγή γήρανσης στο κυτταρικό σύστημα Saos2-TetON p21 και η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων αυτών σε όλα τα χρονικά διαστήματα έκφρασης του γονιδίου $p21^{WAF1/CIP1}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Η κυτταροκαλλιέργεια είναι ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία διότι παρέχει εξαιρετικά συστήματα - μοντέλα για τη μελέτη της φυσιολογίας και βιοχημείας των κυττάρων όπως για το μεταβολισμό, τη γήρανση, τη μεταλλαξιγένεση και την καρκινογένεση. Επίσης οι κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την ανάπτυξη φαρμάκων και μεγάλης κλίμακας παραγωγή βιολογικών ενώσεων (π.χ. εμβόλια, θεραπευτικές πρωτεΐνες). Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης των κυτταρικών καλλιεργειών για οποιαδήποτε από τις αυτές τις εφαρμογές είναι η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων που μπορούν να επιτευχθούν από τη χρήση μιας παρτίδας κλωνικών κυττάρων. Η κυτταροκαλλιέργεια αναφέρεται στην αφαίρεση των κυττάρων από ένα ζώο ή φυτό και η μετέπειτα ανάπτυξη τους σε ένα τεχνητό ευνοϊκό περιβάλλον. Τα κύτταρα μπορούν να αφαιρεθούν από τον ιστό άμεσα και να αναλυθούν με ενζυματικά ή μηχανικά μέσα πριν από την καλλιέργεια, ή μπορούν να προέρχονται από μια κυτταρική σειρά ή κυτταρικό στέλεχος που έχει ήδη καθιερωθεί.

Οι συνθήκες καλλιέργειας ποικίλλουν ευρέως για κάθε τύπο κυττάρου, αλλά το τεχνητό περιβάλλον στο οποίο τα κύτταρα καλλιεργούνται αποτελείται πάντοτε από ένα κατάλληλο δοχείο που περιέχει ένα υπόστρωμα ή μέσο που παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (αμινοξέα, υδατάνθρακες, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, O₂, CO₂) και ρυθμίζει το φυσικοχημικό περιβάλλον (pH, ωσμωτική πίεση, θερμοκρασία).

2.1.1 Συλλογή του υλικού

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από κύτταρα της καθιερωμένης κυτταρικής σειράς Saos-2 (Sarcoma osteogenic) η οποία απομονώθηκε από πρωτογενές οστεοσάρκωμα ενός εντεκάχρονου κοριτσιού το 1973 και δεν εκφράζει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το **Saos2-TetON** σύστημα, δηλαδή ένα σύστημα επαγωγίμης έκφρασης όπου η μεταγραφή ενεργοποιείται αντιστρεπτά παρουσία του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (Dox). Στη

διατριβή αυτή το γονίδιο του οποίου η έκφραση ενεργοποιήθηκε μέσω της προσθήκης δοξυκυκλίνης στην καλλιέργεια των κύτταρων Saos2-TetON είναι το *CDKN1A* το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21 (CIP1/WAF1) η οποία δρα ως αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDK1 και CDK2 οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προώθηση των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Συνεπώς, επαγωγή στην έκφραση της πρωτεΐνης p21 συνεπάγεται επαγωγή γήρανσης στα κύτταρα αυτά. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επαγωγή γήρανσης σε τέσσερα χρονικά διαστήματα 0, 6, 10 και 26 ημερών. Το ζητούμενο ήταν η υπερμικροσκοπική μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων αυτών. Τα κύτταρα Saos2-TetON p21 είναι διαθέσιμα σύμφωνα με την εργασία των Bates et al.⁸³

2.2 Το σύστημα Tet-ON

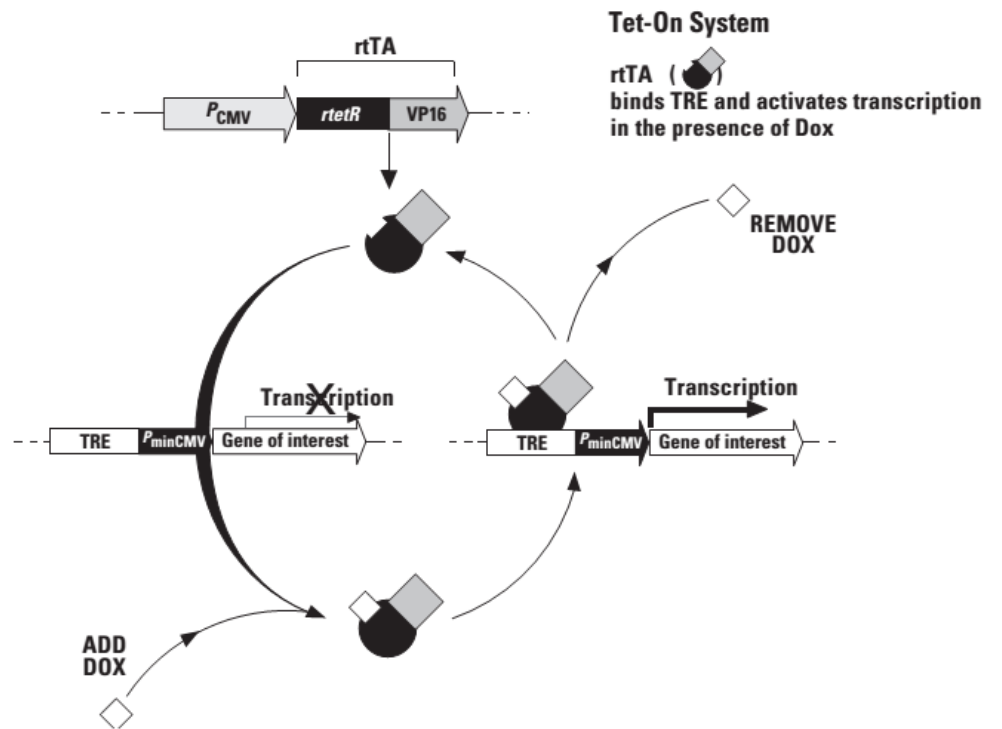
Ένα κοινώς χρησιμοποιούμενο επαγωγίμο σύστημα έκφρασης θηλαστικών είναι το τετρακυκλίνη-ελεγχόμενο σύστημα μεταγραφικής ενεργοποίησης που αναπτύχθηκε το 1992 από τους καθηγητές Bujard και Gossen στο Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης.⁸⁴

Ανάμεσα στα πιο δημοφιλή εμπορικά διαθέσιμα συστήματα στην αγορά για την επαγωγίμη έκφραση μίας κασέτας είναι το Tet-ON μαζί με το παραπλήσιο Tet-Off σύστημα που διατίθεται από την εταιρία Clontech Inc. Στο βακτήριο *E.coli* η πρωτεΐνη του καταστολέα Tet (TetR) ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων ενός οπερονίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη που βρίσκεται πάνω στο τρανσποζόνιο *Tn10*. Η TetR εμποδίζει την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου μέσω πρόσδεσης στον χειριστή (operator) *tet* ή αλλιώς *tetO* απουσία της τετρακυκλίνης (Tc). Η TetR και το *cis* στοιχείο του *tetO* αποτελούν τη βάση και την ουσία της ρύθμισης της «επαγωγίμης έκφρασης» στα κυτταρικά συστήματα θηλαστικών. Το σύστημα Tet-On δίνει στους ερευνητές την δυνατότητα της ελεγχόμενης γονιδιακής έκφρασης σε υψηλό βαθμό. Στο σύστημα Tet-ON η γονιδιακή έκφραση επάγεται όταν στο θρεπτικό μέσο προστεθεί η δοξυκυκλίνη (Dox) που είναι παράγωγο της Tc. Το εν λόγω κυτταρικό σύστημα επιτρέπει την αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου σε απόκριση σε διάφορες συγκεντρώσεις Dox.

Η πρώτη κρίσιμη συνιστώσα του συστήματος Tet-On είναι μια *ρυθμιστική πρωτεΐνη* που βασίζεται στην φιλοσοφία της λειτουργίας της TetR. Συγκεκριμένα, το σύστημα Tet-On στηρίζεται στην πρωτεΐνη «ανάστροφος καταστολέας Tet (reverse Tet repressor, rTetR) η οποία δημιουργήθηκε μέσω τεσσάρων αμινοξικών υποκαταστάσεων στην TetR. Η δε TetR αντιστοιχεί στην tTA (tetracycline-controlled transactivator) μια συνθετική χμιαϊκή πρωτεΐνη 37 kDa που προκύπτει από την σύντηξη των αμινοξέων 1-207 της TetR και 127 αμινοξέων του C-τελικού άκρου της δομής ενεργοποίησης (activation domain, AD) του τρανσενεργοποιητή VP16 του ερπητοϊού HSV-1 (Herpes simplex virus-1), λειτουργώντας έτσι ως μεταγραφικός ενεργοποιητής παρά ως καταστολέας (Σχήμα 14). Η προκύπτουσα πρωτεΐνη, η rtTA (reverse tTA), κωδικοποιείται από το *ρυθμιστικό πλασμίδιο* pTet-On που επιπλέον είναι σχεδιασμένο να φέρει και κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε ένα ή δυο αντιβιοτικά.

Η δεύτερη κρίσιμη συνιστώσα του συστήματος Tet-ON είναι το πλασμίδιο απόκρισης το οποίο εκφράζει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (gene of interest, GOI) υπό τον έλεγχο ενός cis στοιχείου απόκρισης στην τετρακυκλίνη, του TRE (tetracycline-response element). Η εταιρία Clontech Inc. παρέχει μια σειρά από διαφορετικούς φορείς απόκρισης για τα συστήματα Tet. Για παράδειγμα, το πλασμίδιο pTRE και τα παράγωγά του περιέχουν το στοιχείο TRE που αποτελείται από επτά επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 42 bp και περιέχει τον tetO ακριβώς πριν από τον υποκινητή P_{min}CMV (minimal CMV promoter). Ο υποκινητής P_{min}CMV στερείται των ισχυρών ενισχυτών που βρίσκονται φυσιολογικά στον IE (immediate early) υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού. Επειδή απουσιάζουν αυτά τα cis στοιχεία υπάρχει εξαιρετικά χαμηλή έκφραση («διαρροή») του γονιδίου Gene X απουσία της Tc (www.clontech.com).

Tet-On



Σχήμα 14: Αρχές λειτουργίας του συστήματος Tet-ON.
<http://2014.igem.org/Team:Tsinghua/Project/Drug>

2.2.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των επαγωγίμων συστημάτων Tet

Το επαγωγίμο σύστημα τετρακυκλίνης επιτρέπει τη μελέτη των πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα κατά έναν ελεγχόμενο τρόπο. Είναι συχνά το προτιμώμενο επαγωγίμο σύστημα, επειδή επιτρέπει την ταχεία και αναστρέψιμη γονιδιακή έκφραση. Αυτή η τεχνολογία έχει επίσης προσαρμοστεί για χρήση σε συστήματα ζωικών μοντέλων όπου η tTA εκφράζεται σε συγκεκριμένους ιστούς, επιτρέποντας να μελετηθεί η λειτουργία του γονιδίου σε επιθυμητούς τύπους κυττάρων.

Ένα μειονέκτημα των tet επαγωγίμων συστημάτων είναι ότι συχνά μπορεί να παρατηρηθούν χρόνοι «διαρροής» στους οποίους το γονίδιο που μας ενδιαφέρει εκφράζεται ακόμη και χωρίς την προσθήκη τετρακυκλίνης. Τα μέσα για τη μείωση αυτής της διαρροής περιλαμβάνουν την «στρατολόγηση» ισχυρότερων καταστολέων (στην περίπτωση των συστημάτων Tet-Off) ή μείωση της σταθερότητας του mRNA του γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

Επίσης, η τετρακυκλίνη είναι ένα αντιβιοτικό που δεσμεύεται με την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος. Δυστυχώς, μπορεί επίσης να συνδέεται με την υπομονάδα 30S των ριβοσωμάτων θηλαστικών και να προκαλέσει τοξικότητα στα κύτταρα αυτά, όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Θα πρέπει να ρυθμίζεται η ποσότητα της τετρακυκλίνης που χρησιμοποιείται για να βρεθεί μια ισορροπία μεταξύ της τοξικότητας των κυττάρων και της αποτελεσματικότητας της γονιδιακής έκφρασης.

2.3 Η κυτταρική σειρά Saos-2

Οι κυτταρικές σειρές είναι πολύ χρήσιμες στην έρευνα γιατί αποτελούν την πηγή ως επί το πλείστο ομοιογενών κυττάρων που αντικαθιστούν τα πρωταρχικά κύτταρα. Στα πλεονεκτήματα χρήσης των κυτταρικών σειρών ως εργαλείου στην έρευνα περιλαμβάνεται η δυνατότητα τους ν' αποθηκεύονται στους -80°C για απεριόριστο χρονικό διάστημα και, όταν αποψυχθούν, να αναπτυχθούν ξανά. Επιπροσθέτως, αποτελούν μια απεριόριστη πηγή υλικού που παρακάμπτει τα ηθικά ζητήματα που προκύπτουν από τη χρήση ζωικών και κυρίως ανθρώπινων ιστών.

Η Saos-2 είναι μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος, η οποία εμφανίζει αρκετά οστεοβλαστικά χαρακτηριστικά. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν

υποδοχείς για την 1,25-διυδροξυβιταμίνη D₃ και έχουν υψηλή βασική δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης. Εκφράζουν τον υποδοχέα της παραθυροειδούς ορμόνης (PTH) και παράγουν κυκλικό AMP σε απόκριση σε θεραπεία με PTH. Αυτά τα κύτταρα δεν σχηματίζουν όγκους όταν εγχέονται υποδορίως εντός ανοσοκατεσταλμένων ποντικών. Όταν ενίονται σε θαλάμους διάχυσης που εμφυτεύθηκαν ενδοπεριτοναϊκώς σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς, ωστόσο, τα κύτταρα Saos-2 παράγουν μια ανοργανοποιημένη μήτρα, η οποία είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό των οστεοβλαστικών κυττάρων. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν αυτή η κυτταρική σειρά μια ελκυστική πηγή μορίων που σχετίζονται με τα οστά για την έρευνα.

Παρόλα αυτά θα πρέπει κανείς να είναι προσεκτικός κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων διότι οι κυτταρικές σειρές δεν αντιγράφουν επακριβώς τα πρωταρχικά κύτταρα.

2.4 Χώρος καλλιέργειών

Οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιούνται σε ειδικά διαμορφωμένο, αποστειρωμένο χώρο. Η είσοδος στο χώρο γίνεται μόνο με τη χρήση ποδοναρίων, εργαστηριακής ποδιάς και γαντιών. Ο χώρος των καλλιέργειών καθαρίζεται και αποστειρώνεται με προσοχή ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στο βασικό εξοπλισμό του χώρου των καλλιέργειών περιλαμβάνονται:

Θάλαμος νηματικής ροής τάξης (class) II (Microflow). Ο θάλαμος νηματικής ροής παρέχει έναν αποστειρωμένο χώρο μέσα στον οποίο διεξάγονται όλοι οι χειρισμοί των καλλιέργειών. Ο εισερχόμενος αέρας φιλτράρεται σε ποσοστό άνω του 99,9% και αναμιγνύεται με τον εσωτερικό αέρα που δημιουργεί φραγμό μεταξύ του εξωτερικού περιβάλλοντος και του αποστειρωμένου χώρου εργασίας, εμποδίζοντας την είσοδο μολυσματικών παραγόντων. Στο εσωτερικό του θαλάμου υπάρχει παροχή ηλεκτρικού ρεύματος και γκαζιού σε λύχνο Bunsen, η φλόγα του οποίου χρησιμοποιείται για αποστείρωση αντικειμένων (μεταλλικά αντικείμενα, πώματα και καπάκια φιαλών, καπάκια τρυβλίων). Ο θάλαμος διαθέτει προστατευτικό υαλοφράκτη, το άνοιγμα του οποίου κατά τη διάρκεια της εργασίας είναι μικρό, μόνο όσο χρειάζεται για να γίνονται οι απαραίτητοι χειρισμοί. Τέλος,

είναι εφοδιασμένος με λάμπα UV για την αποστείρωση του χώρου πριν και μετά το τέλος της εργασίας. (Εικόνα 1)

Κλίβανος επώασης καλλιιεργειών (Forma Scientific, model 3111, Forma Scientific Inc.). Στον κλίβανο γίνεται η επώαση των καλλιιεργειών. Συνδέεται με φιάλη παροχής διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και διαθέτει ηλεκτρονικό σύστημα ρύθμισης της θερμοκρασίας (37°C) και της ροής CO₂ (5% κ.ο.). Οι συνθήκες αυτές είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη των κυττάρων. Στο δίσκο του κλιβάνου τοποθετείται αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (dH₂O) συμπληρωμένο με 2% αντιμυκητιακό διάλυμα Lysol ώστε να προληφθεί τυχόν μόλυνση με μύκητες, που αποτελούν μείζονα μολυσματικό παράγοντα.



Εικόνα 1: Εικόνα από το χώρο καλλιιεργειών. Διακρίνονται ο θάλαμος νηματικής ροής και ο κλίβανος καλλιιεργειών.

Ανάστροφο μικροσκόπιο (Zeiss). Διαθέτει αντικειμενικούς φακούς x10. Χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των καλλιιεργειών και της μορφολογίας των κυττάρων καθώς και την ανεύρεση πιθανών μολυσματικών παραγόντων.

Υδατόλουτρο (Mettler, WNE 22, Shutzart DIN 40050, Germany). Η θερμοκρασία του νερού (dH₂O συμπληρωμένο με 2% αντιμυκητιακό διάλυμα Lysol) ελέγχεται ηλεκτρονικά και ρυθμίζεται στους 37°C. Χρησιμοποιείται για την επώαση των θρεπτικών υλικών, ώστε αυτά να έρθουν σε θερμοκρασία 37°C πριν χρησιμοποιηθούν στις κυτταροκαλλιιεργειες.

Ψυγείο (συντήρηση 4°C, κατάψυξη -20°C). Χρησιμοποιείται για τη συντήρηση ορισμένων απαραίτητων για τις κυτταροκαλλιέργειες διαλυμάτων.

Ξηρή και υγρή αποστείρωση

Γυάλινα σκεύη, μεταλλικά εργαλεία και γάζες αποστειρώνονται σε κλίβανο στους 120°C, για 2h, ενώ tips, erpendorf και διάφορα διαλύματα αποστειρώνονται με υγρή αποστείρωση στους 120°C, υπό πίεση, για 35 min.

2.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία ορίζεται ως η τεχνική που κάνει χρήση των ιδιοτήτων των ηλεκτρονίων καθώς αυτά σκεδάζονται από ένα σώμα ή διέρχονται μέσα από αυτό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transmission Electron Microscope, TEM).

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ο σχηματισμός του ειδώλου εξαρτάται από τη σκέδαση της δέσμης των ηλεκτρονίων. Καθώς η δέσμη των ηλεκτρονίων προσπίπτει στο παρασκεύασμα, μερικά ηλεκτρόνια υφίστανται σκέδαση από το παρασκεύασμα, αποδίδοντας εικόνα στις αποχρώσεις του μαύρου – γκρι, ενώ άλλα συνεχίζουν το δρόμο τους, αποδίδοντας την εικόνα στην απόχρωση του άσπρου.

Τα σύγχρονα ηλεκτρονικά μικροσκόπια έχουν δυναμικότητα διακριτικού ορίου 1-2 περίπου μονάδων Å. Με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης έχει προσεγγιστεί η δυνατότητα παρατήρησης του βιολογικού κόσμου σε ατομικό και μοριακό επίπεδο.

Η παρατήρηση του ειδώλου γίνεται πάνω σε μια φθορίζουσα οθόνη. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαθέτει φωτογραφικό σύστημα συμβατικό ή ψηφιακό, όπου αποτυπώνεται το είδωλο ως ηλεκτρονιογραφία.

2.6 Πειραματική πορεία



Σχήμα 15: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας. Χρονικά διαστήματα μελέτης της έκφρασης του γονιδίου $p21^{CIP1/WAF1}$.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων σε Aclar discs (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Aclar disc

Χαρακτηριστικά του Aclar disc

- Διαφανές φθοριούχο χλωριωμένο θερμοπλαστικό υλικό που δεν περιέχει πτητικά συστατικά.
- Χημικά αδρανές, για όλους τους πρακτικούς σκοπούς, ιδανικό για τις κυτταρικές καλλιέργειες.
- Τα κύτταρα προσκολλώνται σε αυτό εύκολα και μπορούν να παραμείνουν συνδεδεμένα μετά τη μονιμοποίηση και την αφυδάτωση.
- Σημείο τήξεως 202 °C
- Διαφανές όσο το γυαλί

- Μπορεί να κοπεί σε τομές και δεν βλάπτει τα μαχαίρια της υπερμικροτόμου.
- Μπορεί να αποστειρωθεί.
- Δίνει επίπεδα τμήματα.
- Η λεία επιφάνεια που σχηματίζει καθιστά δυνατή τις παρατηρήσεις στην οπτική μικροσκοπία.
- Αποσπάται εύκολα από την εποξική ρητίνη που χρησιμοποιείται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία.
- Ανθεκτικό στους οργανικούς διαλύτες (πχ προπυλενοξείδιο κατά την κατεργασία της έγκλεισης).

A. Ανακαλλιέργεια (splitting)

Όταν τα προσκολλημένα κύτταρα έχουν καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του τρυβλίου λαμβάνει χώρα ανακαλλιέργεια, ώστε να συνεχιστεί η ομαλή ανάπτυξη τους. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Αφαίρεση του καλλιεργητικού μέσου
- ✓ Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS (αποστειρωμένο)
- ✓ Προσθήκη 2.5 mL διαλύματος θρυψίνης και επώαση σε κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 3-5min.

Το διάλυμα θρυψίνης - κυττάρων μοιράζεται στα ήδη έτοιμα τρυβλία που έχουν καλλιεργητικό μέσο 10 mL (τρυβλία των 10cm). Το σπάσιμο των κυττάρων γίνεται σε αναλογία περίπου 1:3 όταν τα κύτταρα είναι σε αφθονία περίπου 80-90%. Γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας και προσθήκη Dox κάθε 2 ημέρες και τακτική παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο.

B. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού/αντίθεσης φάσεων και φωτογράφιση

Η παρατήρηση των κυττάρων Saos2-TetOn-p21 έγινε σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού/αντίθεσης φάσεων Zeiss Axiovert S100 με x63 ελαιοκαταδυτικό αντικειμενικό φακό.

Κατόπιν, έγινε διαδοχική φωτογράφιση του ίδιου πεδίου στη λειτουργία αντίθεσης φάσεων. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με ψηφιακή κάμερα CCD προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus v.3.0.

Γ. Μονιμοποίηση των κυττάρων

Η μονιμοποίηση των κυττάρων έχει σκοπό την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου με χημικούς και φυσικούς τρόπους. Η φορμαλδεΰδη που χρησιμοποιείται στις παρακάτω συνταγές προέρχεται από αποπολυμερισμό παραφορμαλδεΰδης υψηλής καθαρότητας. Για την παρασκευή της θερμαίνεται απεσταγμένο νερό στους 58-60°C και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της παραφορμαλδεΰδης ώστε να επιτευχθεί η ζητούμενη συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα. Το διάλυμα της παραφορμαλδεΰδης γίνεται διαυγές με τον αποπολυμερισμό της προσθέτοντας σταδιακά σταγόνες NaOH 1N.

Όλοι οι μονιμοποιητές διατηρούνται στους 4°C. Το μονιμοποιητικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το εξής:

3% παραφορμαλδεΰδη – 0.5% γλουταραλδεΰδη σε 0.1M PB (phosphate buffer), pH 7.4

8% παραφορμαλδεΰδη	18.75 mL
25% γλουταραλδεΰδη	1 mL
0.2M PB	25 mL
dH ₂ O	5.25 mL

Αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο και ακολουθεί πρώτη μονιμοποίηση των κυττάρων με 3% παραφορμαλδεΐδη + 0,5% γλουταραλδεΐδη σε 0.1M PB pH 7.4 για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Το μονιμοποιητικό διάλυμα είναι προθερμασμένο στους 37°C για να μην υπάρχει διαφορά θερμοκρασίας στην αρχή που προστίθεται στα κύτταρα. Στη συνέχεια η μονιμοποίηση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, RT. Τα κύτταρα ξεπλένονται με 0.1 M PB, pH 7.4, 3x5min. Αφαιρείται το 0.1M PB και προστίθενται στο τρυβλίο 1.200 μ l 0.1M PB, pH 7.4

Δ. Απομόνωση κυττάρων από καλλιέργεια για παρατήρηση στο HM

Για την απομόνωση των κυττάρων από την καλλιέργεια πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων με ξύστρα και συλλογή τους σε erpendorf. Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικά τα παρακάτω βήματα:

- 1) Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 1500g για 10min.
- 2) Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του κομβίου σε 1 mL 4% υδατικού διαλύματος ζελατίνας, το οποίο έχει θερμανθεί στους 37-40°C ώστε να είναι υδαρές.
- 3) Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 1000g για 10min και μεταφορά του Erpendorf στον πάγο ώστε να στερεοποιηθεί η ζελατίνα.
- 4) Επιλογή των περιοχών των κυττάρων εγκλεισμένων στη ζελατίνα κάτω από το στερεοσκόπιο και φύλαξή τους σε 0.1M PB, pH 7.4 στους 4°C.
- 5) Χειρισμός των τεμαχίων κύτταρα-ζελατίνα σαν ιστοτεμάχια. Κατά την αφυδάτωση, η ζελατίνα αφυδατώνεται και, από κυβοειδή εμφάνιση, που έχει γίνεται σαν φλοίδα (στην 100% αιθανόλη).

Ε. Συμπληρωματική μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα OsO₄ 1% aq

Το υδατικό διάλυμα OsO₄ 1% προστίθεται για 1 ώρα στα κύτταρα με αναμονή στους 4°C. Το Os δεσμεύει τα νουκλεϊκά οξέα, μονιμοποιεί τα λιπίδια και δίνει την απαιτούμενη αντίθεση για την παρατήρηση στο HM. Απαιτείται υψηλή καθαρότητα κατά την παρασκευή του διαλύματος. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Z. Αφυδάτωση των κυττάρων

Στη συνέχεια ακολουθεί αφυδάτωση των κυττάρων με διάλυμα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης 25%, 50%, 70%, 95% τα οποία προστίθενται διαδοχικά για 5 λεπτά στους 4°C. Τέλος, προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 100% v/v, 3x7min σε RT.

Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με διάλυμα προπυλενοξειδίου για 10 λεπτά συνολικά, σε RT. Το προπυλενοξείδιο είναι διαλύτης των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο.

Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα μίγμα προπυλενοξείδιο/εποξική ρητίνη σε αναλογία 2:1 για 30 λεπτά στο μηχάνημα περιστροφής φιαλιδίων και ακολουθεί προσθήκη μίγματος προπυλενοξείδιο/εποξική ρητίνη αναλογίας 1:1. Τα κύτταρα παραμένουν καλυμμένα με το παραπάνω μίγμα για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Την επόμενη μέρα ακολουθεί η διαδικασία της εμπότισης - έγκλεισης των κυττάρων.

H. Εμπότιση - Έγκλειση

Για να μπορέσει ένα βιολογικό δείγμα να κοπεί σε λεπτές τομές θα πρέπει το μέσο αφυδάτωσης να αντικατασταθεί με το μέσο έγκλεισης που πριν πολυμεριστεί, είναι υγρό και στερεοποιείται με πολυμερισμό όταν εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία (60°C) ή υπεριώδης ακτινοβολία.

Το μέσο έγκλεισης που χρησιμοποιήθηκε είναι το μίγμα εποξικών ρητινών Epon/Araldite που παρουσιάζεται στο Παράρτημα I (Πίνακας 4).

Η συγκεκριμένη αναλογία εποξικών ρητινών προσδίδει στην πολυμερισμένη κάψουλα αρκετή ελαστικότητα κατά το κόψιμο λεπτών τομών στον υπερμικροτόμο.

Σε επίπεδα ελαστικά εκμαγεία τοποθετούμε τα κύτταρα τα οποία είναι εγκλεισμένα σε ζελατίνη και στη συνέχεια προσθέτουμε το μίγμα εποξικών ρητινών και το τοποθετούμε σε κλίβανο, στους 60°C για 24 ώρες.

Θ. Τμήση τομών

Τα δείγματα κόβονται σε ημίλεπτες τομές πάχους 1μm με τον υπερμικροτόμο, τοποθετούνται επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και στη συνέχεια ακολουθεί χρώση τους με μίγμα 2% κυανό Ο της τολουιδίνης και 2% βορικό νάτριο σε αναλογία 1:1, το οποίο «χρωματίζει» τους πυρήνες των κυττάρων και έτσι τα κύτταρα μπορούν να παρατηρηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο και να γίνει επιλογή της περιοχής των κυττάρων που μας ενδιαφέρει.

Ιστοχημικές χρώσεις

- **2% κυανό Ο της τολουιδίνης**

κυανό Ο της τολουιδίνης	1g
dH ₂ O	50mL

- **2% βορικό νάτριο**

βορικό νάτριο	1g
dH ₂ O	50mL

Τα δείγματα κατόπιν κόβονται σε πολύ λεπτές τομές, πάχους 50-100 nm, με τον υπερμικροτόμο, και τοποθετούνται πάνω σε ειδικά πλέγματα, (grids, αντίστοιχα με τις αντικειμενοφόρους πλάκες) που τοποθετούνται στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης.

I. Χρώση

Συνήθως τα βιολογικά δείγματα είναι τελείως διαπερατά από τα ηλεκτρόνια γιατί τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται (συνήθως C, H, O και N) δεν σκεδάζουν τα επιταχυμένα ηλεκτρόνια και δε μπορούν να δώσουν την απαιτούμενη αντίθεση (contrast). Για το λόγο αυτό χρειάζεται να τα «χρωματίσουμε» με χημικές ουσίες

που δεσμεύονται εκλεκτικά από τα διάφορα συστατικά του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων και το σχηματισμό της εικόνας. Οι πιο συνηθισμένες χρωστικές για τη χρώση τομών είναι το οξικό ουρανύλιο, ο κιτρικός μόλυβδος και το υπερμαγγανικό κάλιο.

Κ. Παρατήρηση των δειγμάτων

Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε δύο ΗΜ α) Philips 201C με συμβατική φωτογραφική μηχανή του Ιδρύματος Θ. Θ. Κότσικα και β) Philips EM 420 με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus, model: MegaView G2 του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Παρατήρηση σε πεδίο αντίθεσης φάσης της μορφολογίας των κυττάρων Saos2-TetON p21.

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου p21 στα κύτταρα Saos2-TetON p21 πραγματοποιήθηκε στα 4 διαφορετικά χρονικά διαστήματα των 0, 6, 10, 26 ημερών ύστερα από την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (Dox). Τα κύτταρα Saos2-TetON p21 παρουσιάζουν μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων, έχουν ευδιάκριτους πυρήνες και εμφανίζονται φαινοτυπικά ως κύτταρα με πλακώδες και ατρακτοειδές σχήμα. Πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού Dox στα κύτταρα (**OFF**), τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης και έχουν την χαρακτηριστική πλακώδη και ατρακτοειδή εμφάνιση των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 3 Α,Δ). Επιπλέον, κάποια κύτταρα σχηματίζουν μικρές κυτταρικές προσεκβολές οι οποίες εκτείνονται συνήθως σε διπλανά κύτταρα (εικόνα 3B). Το σχήμα λίγων κυττάρων είναι πλακώδες αλλά πεπλατυσμένο (εικόνα 3Γ). Τέλος, παρατηρείται μικρή απόπτωση των κυττάρων (εικόνα 3Δ).

Αφού γίνει η προσθήκη της Dox, μετά το πέρας 6 ημερών (**κύτταρα ON 6 μέρες**), κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά γήρανσης, όπως πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος (εικόνα 4A). Επίσης, συχνά διακρίνονται ομάδες κυττάρων με πλακώδες αλλά περισσότερο πεπλατυσμένο σχήμα από τα κύτταρα OFF (εικόνα 4B). Επιπλέον, λίγα κύτταρα διατηρούν το επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα τους (εικόνα 4Γ). Συχνά παρατηρούνται κύτταρα σε απόπτωση τα οποία συνήθως εντοπίζονται γειτονικά με τα κύτταρα σε γήρανση (εικόνα 4Δ). Τέλος, λίγα κύτταρα σχηματίζουν λεπτές κυτταρικές προσεκβολές που εκτείνονται στον διακυτταρικό χώρο (εικόνα 4E).

Μετά από 10 ημέρες επώασης των κυττάρων με Dox (**κύτταρα ON 10 μέρες**), παρατηρούνται ομάδες από κύτταρα που διατηρούν την χαρακτηριστική πλακώδη εμφάνιση των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 5A) και λίγες μικρές ομάδες κυττάρων με επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα (εικόνα 5B). Επιπλέον, πολλά κύτταρα εμφανίζουν φαινότυπο προς γήρανση (εικόνα 5B) ενώ άλλα έχουν υιοθετήσει πλήρως τις μορφολογικές αλλαγές που συνοδεύουν τη γήρανση όπως πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος. Τα ON 10 μέρες κύτταρα που

βρίσκονται σε γήρανση είναι στην πλειοψηφία τους πιο μεγάλα σε μέγεθος από τα ON 6 μέρες γηρασμένα κύτταρα (εικόνα 5Γ). Ακόμη, το ποσοστό της απόπτωσης των κυττάρων είναι αυξημένο συγκριτικά με αυτό των OFF και ON 6 ημερών κυττάρων. Αρκετά συχνά τα αποπτωτικά κύτταρα βρίσκονται κοντά στα γηρασμένα κύτταρα (εικόνα 5Γ). Τέλος, σποραδικά παρατηρούνται κύτταρα με άφθονα κενोटόπια (εικόνα 5Δ).

Μετά από την παρατεταμένη 26 ημερών επώαση των κυττάρων με την Dox, τα κύτταρα **escaped** έχουν αποκτήσει ποικίλους φαινοτύπους. Συχνή είναι η παρουσία ομάδων από escaped κύτταρα που έχουν πλακώδες και σχεδόν στρογγυλό σχήμα (εικόνα 6Α), ενώ παράλληλα παρατηρούνται κάποια κύτταρα με πεπλατυσμένη πλακώδη μορφολογία (εικόνα 6Β). Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η παρουσία κάποιων escaped κυττάρων τα οποία έχουν αποκτήσει πολύ έντονο ατρακτοειδές σχήμα (εικόνα 6Γ). Ιδιαίτερα συχνή είναι η παρουσία του μοτίβου κυττάρου σε γήρανση (γ) που περιβάλλεται από κύτταρα escaped (εικόνα 6Δ). Παρατηρούνται επίσης λίγα αποπτωτικά κύτταρα (εικόνα 6Β).

Παρατήρηση σε πεδίο αντίθεσης φάσης της μορφολογίας των κυττάρων Saos2-TetON p21 που καλλιεργήθηκαν σε Aclar disc

Η καλλιέργεια των κυττάρων Saos-TetON p21 πραγματοποιήθηκε παράλληλα σε τρυβλία Petri 100mm τα οποία είναι κατασκευασμένα από πολυστυρένιο και σε Aclar discs. Το Aclar disc είναι διαφανές, φθοριούχο, χλωριωμένο, θερμοπλαστικό υλικό. Τα κύτταρα προσκολλώνται στο Aclar disc εύκολα και μπορούν να παραμένουν συνδεδεμένα μετά τη μονιμοποίηση και την αφυδάτωση. Επιπλέον, μπορεί να κοπεί σε τομές και δεν βλάπτει τα μαχαίρια της υπερμικροτόμου. Επίσης μπορεί να αποστειρωθεί ενώ είναι ανθεκτικό στους οργανικούς διαλύτες (π.χ. προπυλενοξειδίο κατά την κατεργασία της έγκλεισης).

Κατά την καλλιέργεια των κυττάρων Saos2-TetON p21 σε Aclar disc παρατηρήθηκε μια ποικιλία φαινοτύπων παρόμοιων με αυτούς που παρατηρήθηκαν στο τρυβλίο Petri και στα τέσσερα χρονικά διαστήματα καλλιέργειας.

Συγκεκριμένα, κατά την παρατήρηση των OFF κυττάρων, διακρίνονται κύτταρα που βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης και έχουν χαρακτηριστική πλακώδη εμφάνιση επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 7Α), ενώ παράλληλα παρατηρούνται λίγα κύτταρα

με επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα (εικόνα 7B). Επιπλέον, παρατηρούνται λίγα αποπτωτικά κύτταρα.

Κατά την παρατήρηση των ON 6 ημερών κυττάρων, διακρίνονται κύτταρα σε γήρανση τα οποία περιβάλλονται από πλακώδη ελαφρώς πεπλατυσμένα κύτταρα και κύτταρα με φαινότυπο προς γήρανση (εικόνα 8). Τα ON 10 μέρες κύτταρα παρουσιάζουν πλακώδες και ατρακτοειδές σχήμα (εικόνα 9A). Τα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης είναι λίγα ενώ πολλά είναι τα κύτταρα που παρουσιάζουν φαινότυπο προς γήρανση (εικόνα 9B).

Ύστερα από 26 ημέρες επώασης των κυττάρων με την Dox, παρατηρούνται λίγες ομάδες από escaped κύτταρα τα οποία περιβάλλουν κύτταρα σε γήρανση (εικόνα 10A) και σποραδικά διακρίνονται μικρές προσεκβολές, οι οποίες σχηματίζονται από τα γηρασμένα κύτταρα και κατευθύνονται σε γειτονικά κύτταρα σε γήρανση (εικόνα 10B).

Σύγκριση της καλλιέργειας σε τρυβλίο Petri με την καλλιέργεια σε Aclar disc.

Η διαφορά που εντοπίστηκε ανάμεσα στα δυο υλικά έγκειται στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στα Aclar discs εμφάνισαν μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη γήρανση σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στα τρυβλία Petri. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο διαφορετικό μέσο προσκόλλησης των κυττάρων κατά την καλλιέργεια. Συμπερασματικά, έχοντας συγκρίνει την καλλιέργεια στα δύο υλικά και λαμβάνοντας υπόψιν την καθυστέρηση στην ανάπτυξη που παρουσίασαν τα κύτταρα στο Aclar disc προχωρήσαμε στην παρατήρηση της υπερμικροσκοπικής δομής των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν στο τρυβλίο Petri.

Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε δύο ΗΜ α) Philips 201C με συμβατική φωτογραφική μηχανή του Ιδρύματος Θ. Θ. Κότσικα και β) Philips EM 420 με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus, model: MegaView G2 του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA).

3.2 Παρατήρηση της υπερμικροσκοπικής δομής των κυττάρων Saos2-TetON p21.

Saos2-TetON p21 OFF (χωρίς προσθήκη δοξουκυκλίνης)

Η παρατήρηση των OFF κυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε την ανάπτυξη κυτταρικών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων (εικόνα 11B), ενώ η κυτταρική μεμβράνη κάποιων κυττάρων σχηματίζει μικρολάχνες οι οποίες εκτείνονται σε γειτονικά κύτταρα (εικόνα 11Γ). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία άφθονων μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα των περισσότερων κυττάρων (εικόνα 11Δ). Επιπλέον, κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει σφαιρικές κυτταροπλασματικές προεκβολές οι οποίες συχνά κατευθύνονται προς γειτονικά κύτταρα (εικόνα 11Ε). Πιο σπάνια, παρατηρούνται διακυτταρικά κανάλια (intercellular canaliculi) καθώς και δεσμοσώματα (εικόνα 11Ζ).

Saos2-TetON p21 ON 6 μέρες

Στα κύτταρα Saos2-TetON p21 τα οποία βρίσκονται στην 6^η μέρα έκφρασης του γονιδίου p21 παρατηρείται συχνά η ανάπτυξη κυτταρικών συνδέσεων παρόμοιων με αυτών που παρατηρήθηκαν στα OFF κύτταρα (εικόνα 12A,B). Επίσης, φαίνεται ότι κάποια κύτταρα αναπτύσσουν διακυτταρική επικοινωνία μέσω σχηματισμού λεπτών κυτταροπλασματικών προεκβολών στο διακυτταρικό χώρο, οι οποίες συχνά περικλείουν διάφορα κυστίδια (εικόνα 12Γ). Ένας επιπλέον τρόπος κυτταρικής επικοινωνίας που παρατηρείται είναι μέσω εκτεταμένων κυτταροπλασματικών προεκβολών τις οποίες έχουν αποκτήσει κάποια κύτταρα και οι οποίες συχνά εκτείνονται σε γειτονικά κύτταρα (εικόνα 13A). Η κυτταρική μεμβράνη πολλών κυττάρων σχηματίζει πολλά μικροκυστίδια (microvesicles, MV) (εικόνα 13B), ενώ το φαινόμενο της εξωκυττάρωσης είναι αρκετά συχνό (εικόνα 13Γ). Ακόμη, παρατηρήθηκε η παρουσία κυττάρων που απελευθερώνουν πολλά εξωσώματα στο διακυτταρικό χώρο (εικόνα 13Δ). Διακριτά πολυστιβαδικά σωματίδια είναι παρόντα στο κυτταρόπλασμα (multilamellar bodies, MLBs) (εικόνα 13Ε). Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών αποτελεί η παρουσία αυτοφαγοσωμάτων. Στο κυτταρόπλασμα πολλών κυττάρων περιέχονται άφθονα αυτοφαγοσώματα ή πρώιμα αυτοφαγικά κενοτόπια (autophagic vacuoles,

AV-I) (εικόνα 14A). Σε κάποια κύτταρα μάλιστα, διακρίνεται η φάση επιμήκυνσης της διπλής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος (εικόνα 14B). Τέλος, τα μιτοχόνδρια στην πλειοψηφία των κυττάρων παρουσιάζουν ελαττωματική μορφολογία έχοντας χάσει μερικώς ή ολικώς τις πτυχώσεις-ακρολοφίες τους, ενώ σε κάποια από αυτά παρατηρείται σχετική επιμήκυνση συγκριτικά με τα μιτοχόνδρια των OFF κυττάρων (εικόνα 15A,B).

Saos2-TetON p21 ON 10 μέρες

Κατά την παρατήρηση των κυττάρων που έχουν επωαστεί για 10 ημέρες με την Dox διακρίνονται συχνά κύτταρα με τα τυπικά χαρακτηριστικά της γήρανσης όπως πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος (εικόνα 16A). Επιπροσθέτως, παρατηρούνται κάποια κύτταρα με συσσωρευμένο γλυκογόνο στο κυτταρόπλασμα τους (εικόνα 16B,Γ). Παρόμοια με τα κύτταρα OFF και τα κύτταρα ON 6 ημερών, τα κύτταρα ON 10 ημερών αναπτύσσουν ποικίλους τρόπους διακυτταρικής επικοινωνίας. Ειδικότερα, τα κύτταρα που βρίσκονται σε γήρανση συχνά σχηματίζουν λεπτές επιμήκεις κυτταρικές προσεκβολές που έρχονται σε επαφή με τα escaped κύτταρα (εικόνα 17A,A1) ενώ άλλες φορές διαμορφώνονται κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ τους (εικόνα 17B,B1). Επίσης τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης συχνά έρχονται σε στενή επαφή με τα γειτονικά τους κύτταρα σχηματίζοντας δεσμοσώματα (εικόνα 18A). Αρκετά συχνά σχηματίζονται διακυτταρικά κανάλια (intercellular canaliculi) ανάμεσα στα γηρασμένα κύτταρα και στα escaped κύτταρα (εικόνα 18B). Ο σχηματισμός λεπτών, επιμηκυμένων και διακλαδισμένων κυτταρικών προσεκβολών οι οποίες εκτείνονται σε διπλανά κύτταρα είναι αρκετά συχνός (εικόνα 18Γ). Η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει συχνά προσεκβολές με σφαιρικό σχήμα οι οποίες κατευθύνονται συνήθως στα γειτονικά κύτταρα (εικόνα 18Δ). Κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει μεγάλες σφαιρικές κυτταροπλασματικές προσεκβολές (εικόνα 19Γ). Τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης συχνά σχηματίζουν ένα δίκτυο από λεπτές, επιμήκεις και διακλαδισμένες κυτταροπλασματικές προσεκβολές (εικόνα 20A,B). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία αυτοφαγοσωμάτων και στην 10^η ημέρα έκφρασης του γονιδίου p21. Συχνά παρατηρούνται αυτοφαγοσώματα τα οποία βρίσκονται στο τελικό στάδιο επιμήκυνσης της διπλής τους μεμβράνης και εγκολπώνουν διάφορα κυστίδια (εικόνα 21A). Αρκετά συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της

μακροαυτοφαγίας δηλαδή η εγκόλπωση πυκνού υλικού από τα αυτοφαγοσώματα, πιθανώς κάποιων οργανιδίων (εικόνα 21B).

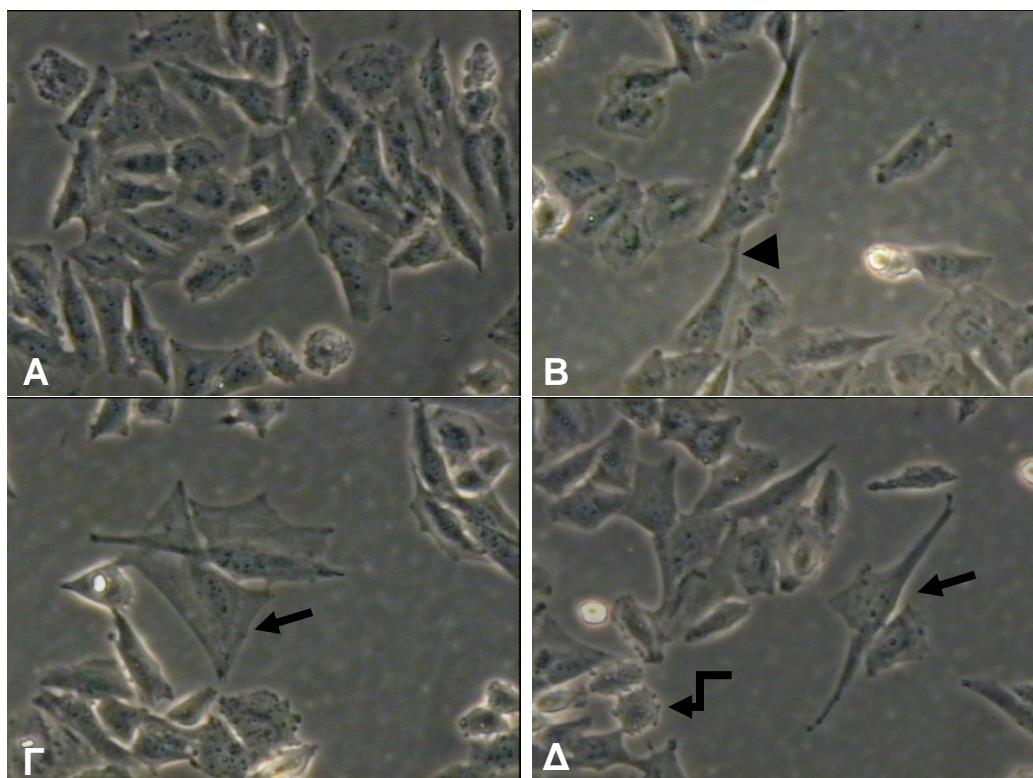
Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που βρίσκονται σε γήρανση έχουν χάσει μερικώς ή ολικώς τις ακρολοφίες τους (εικόνα 22A,B)

Saos2-TetON p21 ON 26 μέρες - κύτταρα escaped

Τα κύτταρα Saos2-TetON p21 που επωάστηκαν για 26 μέρες με την Dox παρουσιάζουν ποικιλία χαρακτηριστικών όπως π.χ πολύλοβους πυρήνες (multilobular nuclei) οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά νημάτια χρωματίνης σχηματίζοντας πυρηνικές γέφυρες (εικόνα 23A-Γ). Ακόμη παρατηρούνται συχνά κύτταρα με πολλούς πυρηνίσκους και μικροπυρήνες (εικόνα 23Δ). Επιπλέον, παρατηρούνται πολλά κύτταρα που σχηματίζουν στενές επαφές μεταξύ τους (εικόνα 24A). Χαρακτηριστική είναι η διαμόρφωση λεπτών και διακλαδισμένων κυτταρικών προσεκβολών από τα escaped κύτταρα οι οποίες εκτείνονται σε γειτονικά κύτταρα (24B), ενώ συχνά η κυτταρική μεμβράνη τους σχηματίζει σχεδόν σφαιρικές κυτταροπλασματικές προσεκβολές που εκτείνονται στον διακυτταρικό χώρο με κατεύθυνση επίσης γειτονικά κύτταρα (εικόνα 25A). Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η απελευθέρωση από τα γηρασμένα κύτταρα άφθονων μικροκυστιδίων σε σχηματισμούς που μοιάζουν με “μπουκέτο” (εικόνα 25B, 26). Αρκετά συχνά τα escaped κύτταρα σχηματίζουν πολλές διακλαδισμένες κυτταρικές προσεκβολές που εκτείνονται προς τα γειτονικά κύτταρα (εικόνα 25Γ). Σποραδικά παρατηρούνται διακυτταρικά κανάλια (εικόνα 25Δ) και ανάπτυξη ενδοκυτταρικής επικοινωνίας μέσω ενδοκυτταροπλασματικών αυλών (εικόνα 27). Τέλος, τα μιτοχόνδρια των κυττάρων παρουσιάζουν αυξημένο όγκο και σχεδόν ολική απώλεια των ακρολοφιών τους (εικόνα 28)

3.3 Εικόνες των κυττάρων Saos2-TetON p21 από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης

Κύτταρα Saos2-TetON p21 OFF (χωρίς προσθήκη δοξυκυκλίνης)



Εικόνα 3: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21 πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (OFF).

A Η πλειοψηφία των κυττάρων βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης και έχει χαρακτηριστική πλακώδη εμφάνιση επιθηλιακών κυττάρων.

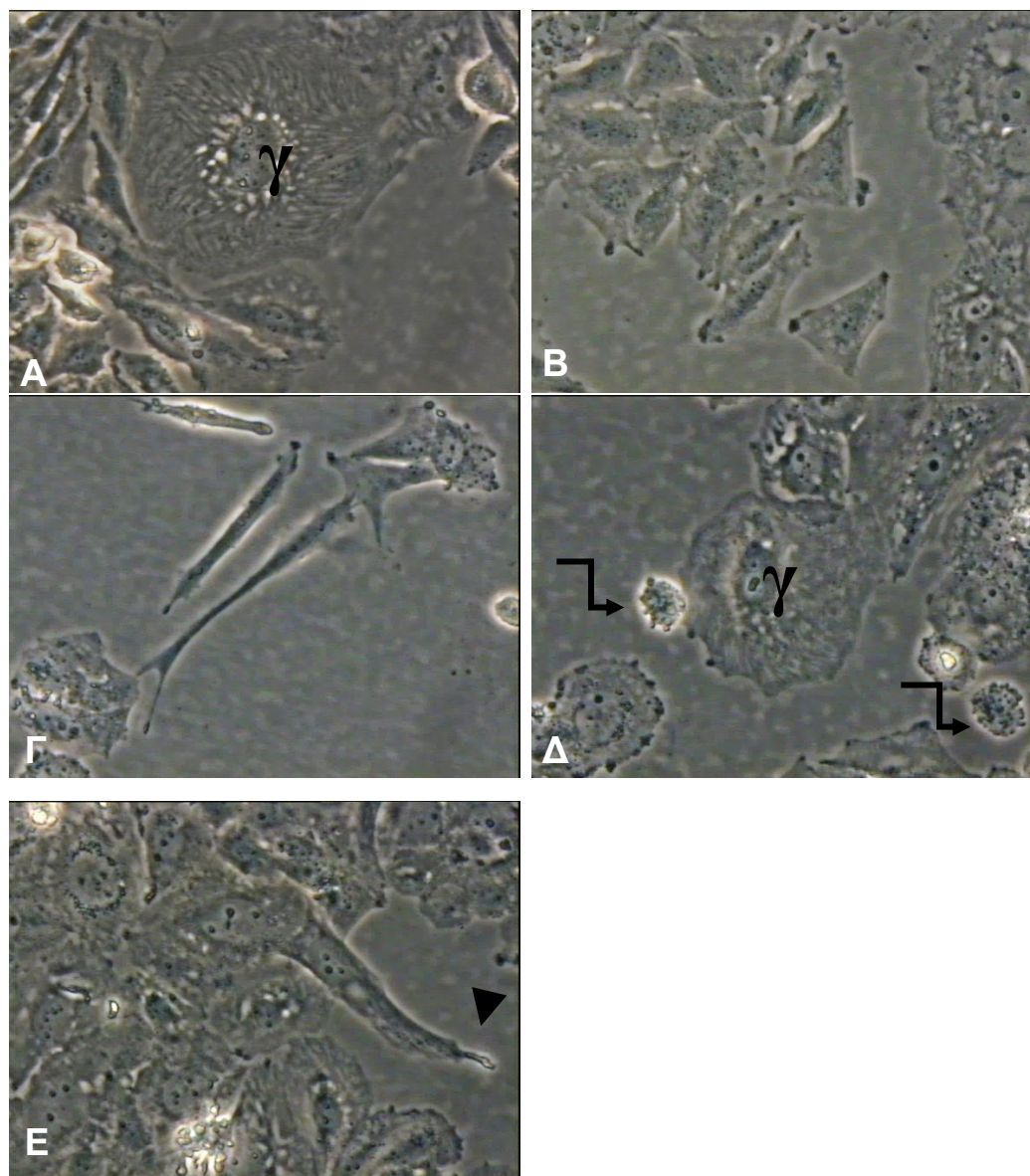
B Σε κάποια κύτταρα παρατηρείται ο σχηματισμός κυτταρικών προσεκβολών (κεφαλή βέλους).

Γ Σπανίως παρατηρήθηκαν κύτταρα με πλακώδες πεπλατυσμένο σχήμα (βέλος).

Δ Συναντώνται συχνά κύτταρα με ατρακτοειδές επίμηκες σχήμα (βέλος) ενώ διακρίνονται λίγα κύτταρα σε απόπτωση (κεκαμμένο βέλος).

Αρχική μεγέθυνση: x200

Κύτταρα Saos2-TetON p21, ON 6 μέρες



Εικόνα 4: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).

Α Συχνά παρατηρούνται κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης (γ) με χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος.

Β Διακρίνονται συχνά ομάδες κυττάρων με πεπλατυσμένη πλακώδη εμφάνιση.

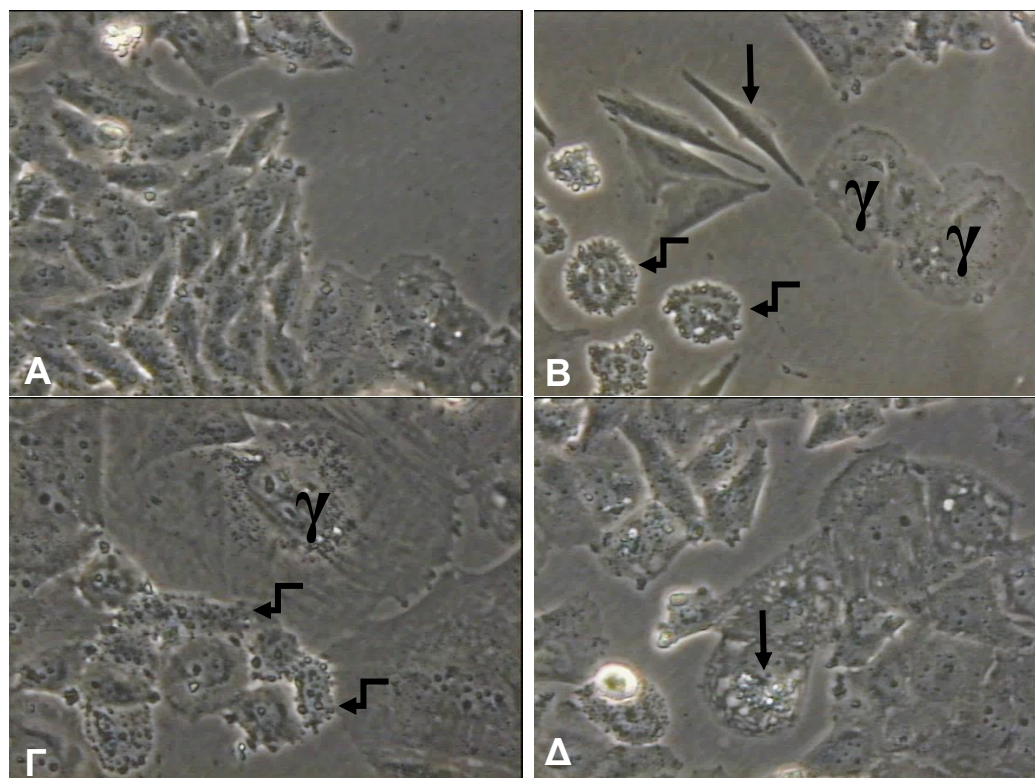
Γ Πιο σπάνια, παρατηρούνται λεπτά επιμήκη ατρακτοειδή κύτταρα.

Δ Σποραδικά παρατηρούνται αποπτωτικά κύτταρα (κεκαμμένο βέλος) εντοπισμένα κοντά σε γηρασμένα κύτταρα (γ).

Ε Κάποια κύτταρα σχηματίζουν λεπτές επιμήκεις κυτταρικές προσεκβολές (κεφαλή βέλους).

Αρχική μεγέθυνση: x200

Κύτταρα Saos2-TetON p21, ON 10 μέρες



Εικόνα 5: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).

A Παρατηρούνται συχνά ομάδες κυττάρων με χαρακτηριστική πλακώδη εμφάνιση επιθηλιακών κυττάρων.

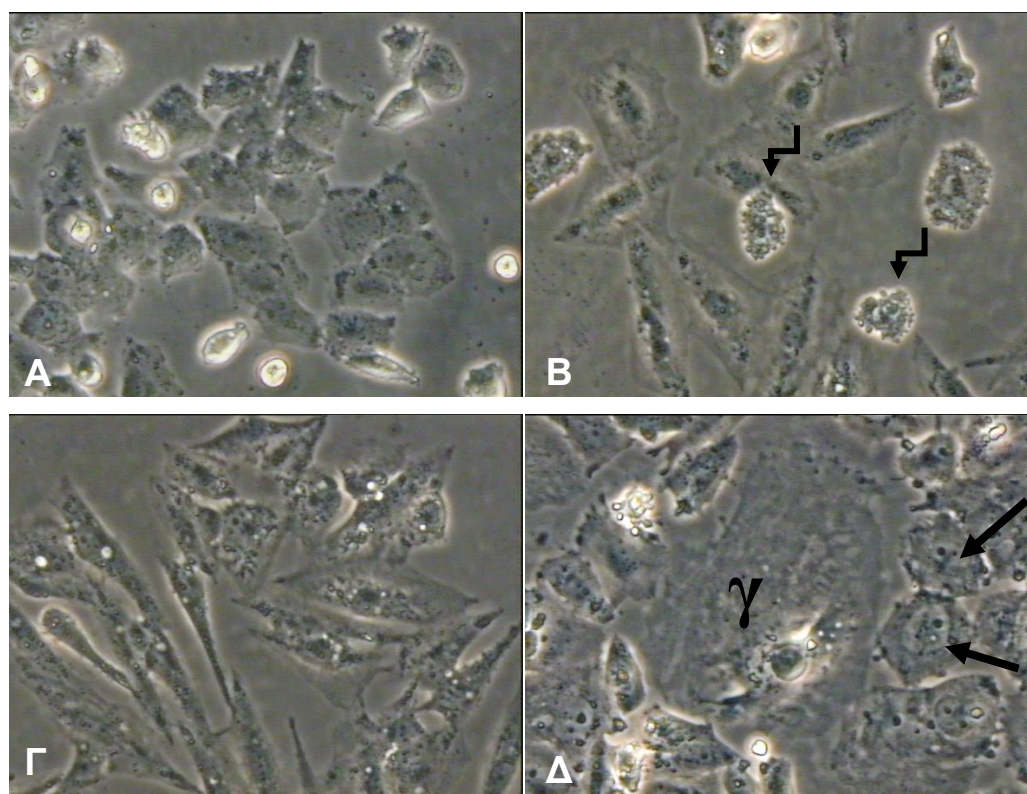
B Σποραδικά διακρίνονται μικρές ομάδες κυττάρων με επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα (βέλος) ενώ πολλά κύτταρα παρουσιάζουν φαινότυπο προς γήρανση (γ). Αυξημένη είναι η συχνότητα εμφάνισης αποπτωτικών κυττάρων (κεκαμμένα βέλη).

Γ Παρατηρούνται συχνά κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης (γ) με χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος. Έντονη είναι η παρουσία των αποπτωτικών κυττάρων τα οποία είναι συχνά εντοπισμένα πλησίον των γηρασμένων κυττάρων.

Δ Παρατηρούνται λίγα κύτταρα με άφθονα κενोटόπια (βέλος).

Αρχική μεγέθυνση: x200

Κύτταρα Saos2-TetON p21, ON 26 μέρες (escaped)



Εικόνα 6: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).

A Συχνά παρατηρούνται ομάδες από escaped κύτταρα με πλακώδες σχεδόν στρογγυλό σχήμα.

B Αρκετά συχνή είναι η παρουσία ομάδων κυττάρων με πεπλατυσμένη πλακώδη εμφάνιση ενώ, παρατηρούνται λίγα κύτταρα σε απόπτωση (κεκαμμένο βέλος).

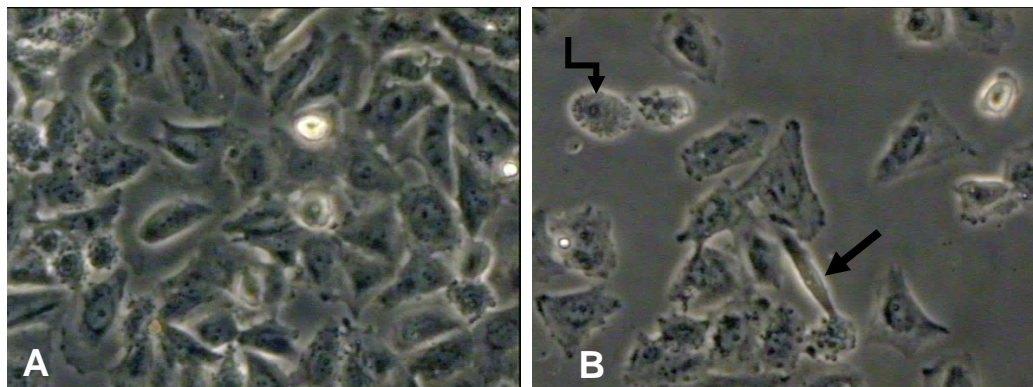
Γ Κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει έντονο ατρακτοειδές σχήμα.

Δ Ιδιαίτερα συχνή είναι η παρουσία του μοτίβου κυττάρου σε γήρανση (γ) που περιβάλλεται από κύτταρα escaped (βέλη).

Αρχική μεγέθυνση: x200

Εικόνες από την καλλιέργεια των κυττάρων σε Aclar disc

Saos2-TetON p21 OFF (χωρίς προσθήκη δοξυκυκλίνης)



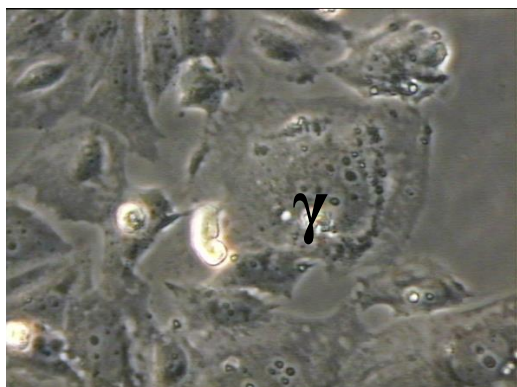
Εικόνα 7: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21 πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (OFF). Καλλιέργεια σε Aclar disc.

A Τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης και έχουν χαρακτηριστική πλακώδη εμφάνιση επιθηλιακών κυττάρων.

B Λίγα κύτταρα έχουν επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα (βέλος), ενώ παρατηρούνται και λίγα αποπτωτικά κύτταρα (κεκαμμένο βέλος).

Αρχική μεγέθυνση: x200

Κύτταρα Saos2-TetON p21, ON 6 μέρες

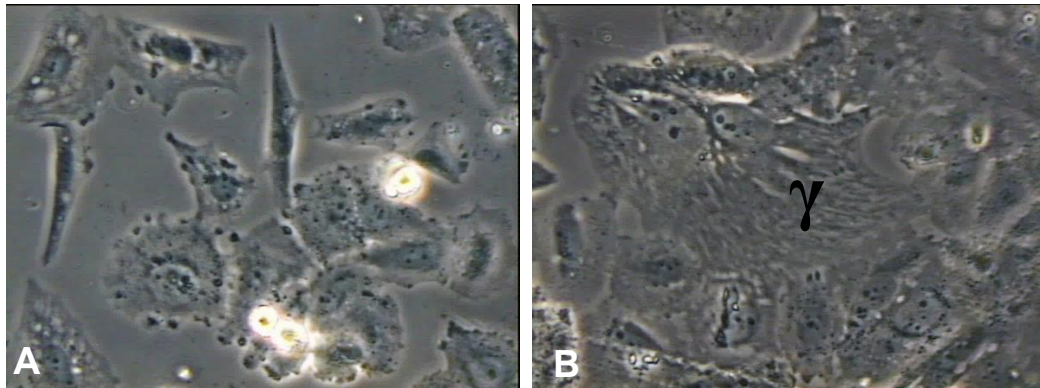


Εικόνα 8: Εικόνα από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες). Καλλιέργεια σε Aclar disc.

Διακρίνεται κύτταρο σε γήρανση (γ) με χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος το οποίο περιβάλλεται από πλακώδη ελαφρώς πεπλατυσμένα κύτταρα και κύτταρα με φαινότυπο προς γήρανση.

Αρχική μεγέθυνση: x200

Saos2-TetON p21, ON 10 μέρες



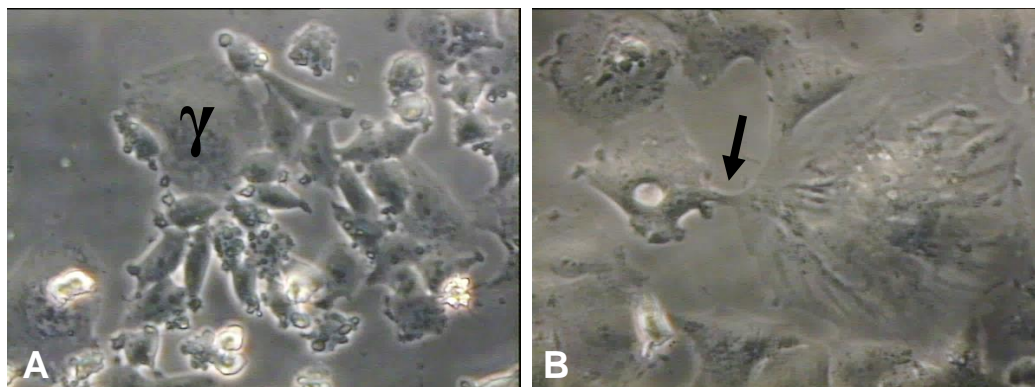
Εικόνα 9: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες). Καλλιέργεια σε Aclar disc.

A Παρατηρούνται πλακώδη και ατρακτοειδή κύτταρα.

B Παρατηρούνται λίγα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης (γ) και πολλά κύτταρα με φαινότυπο προς γήρανση.

Αρχική μεγέθυνση: x200

Saos2-TetON p21, ON 26 μέρες (escaped)



Εικόνα 10: Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης. Ομάδες καρκινικών κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped). Καλλιέργεια σε Aclar disc.

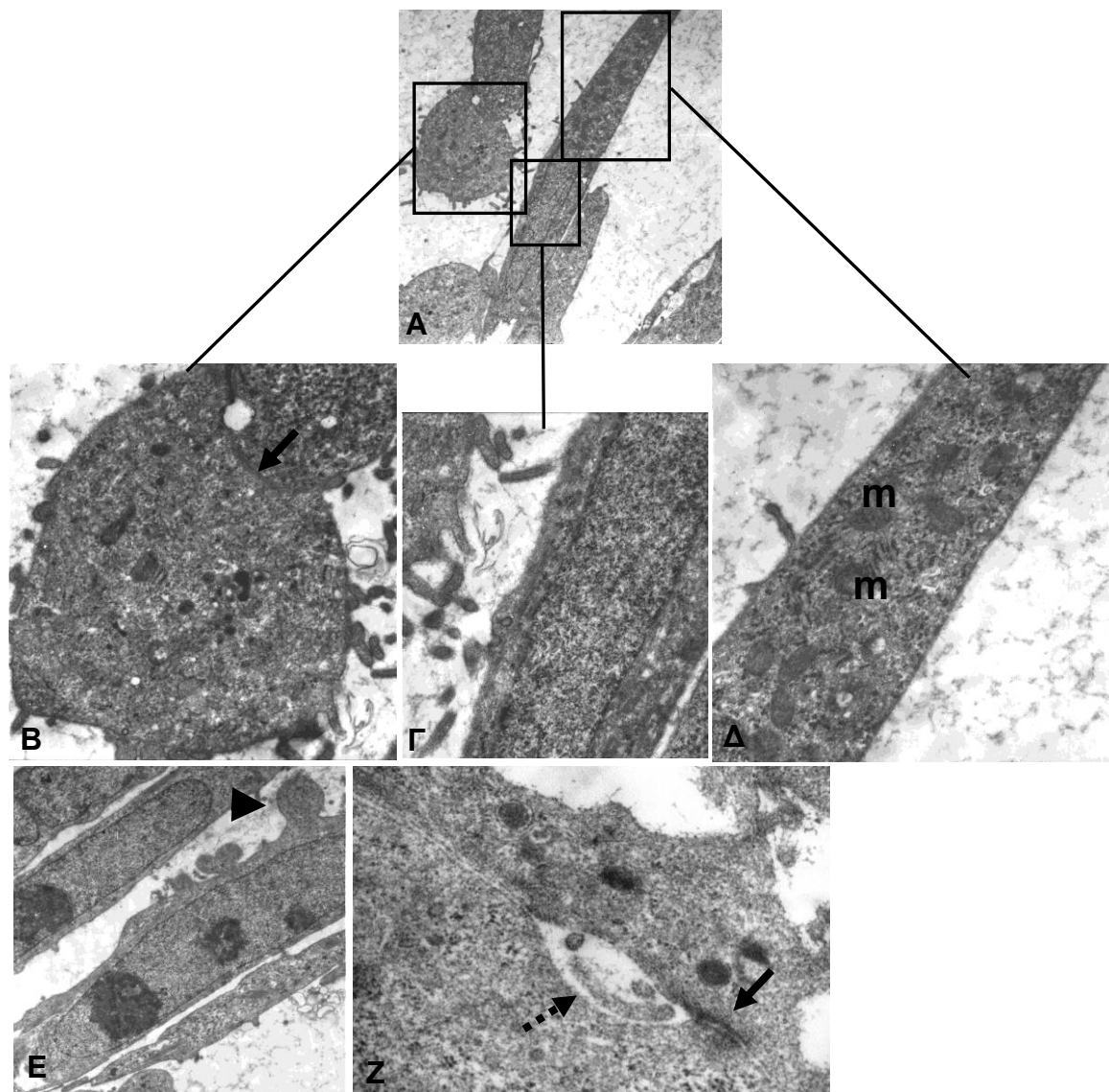
A Παρατηρούνται ομάδες escaped κυττάρων γύρω από κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης (γ).

B Κάποια escaped κύτταρα διαμορφώνουν κυτταροπλασματικές προσεκβολές, δίκην γεφυρών (βέλος), που εκτείνονται προς γειτονικά γηρασμένα κύτταρα.

Αρχική μεγέθυνση: x200

3.4 Υπερμικροσκοπική δομή των κυττάρων Saos2-TetON p21

Saos2-TetON p21 OFF (χωρίς προσθήκη δοξυκυκλίνης)



Εικόνα 11: Κύτταρα OFF. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21 πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (OFF).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A Κύτταρα OFF. Οι περιοχές εντός των τριών πλαισίων μεγεθύνονται στις εικόνες B,Γ,Δ.

B Παρατηρείται συχνά η ανάπτυξη κυτταρικών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων (βέλος).

Γ Σε κάποια κύτταρα παρατηρείται ο σχηματισμός μικρολαχνών που εκτείνονται σε διπλανά κύτταρα.

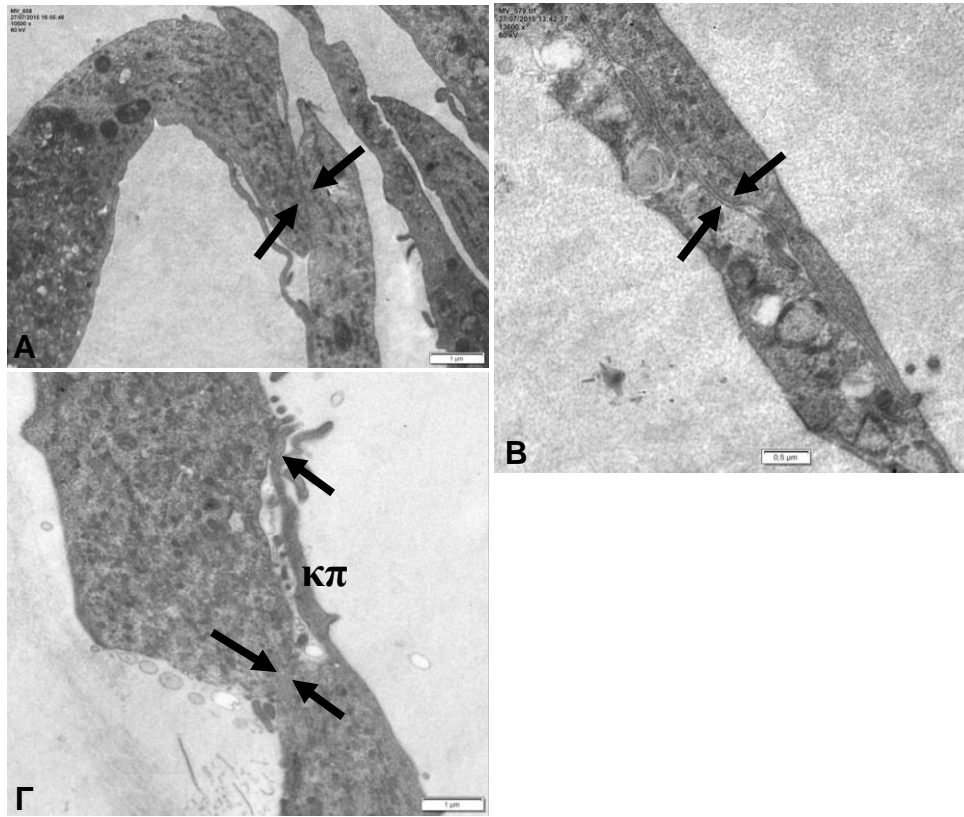
Δ Το κυτταρόπλασμα των περισσότερων κυττάρων περιέχει άφθονα μιτοχόνδρια (m).

Ε Κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει σφαιρικές κυτταροπλασματικές προεκβολές (κεφαλή βέλους).

Z Σπανίως παρατηρούνται διακυτταρικά κανάλια (intercellular canaliculi) (διακεκομμένο βέλος) και δεσμοσώματα (βέλος).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x1490, (B),(Γ),(Δ)x4350, (E)x2240, (Z)x36000

Κύτταρα Saos2-TetON p21, ON 6 μέρες



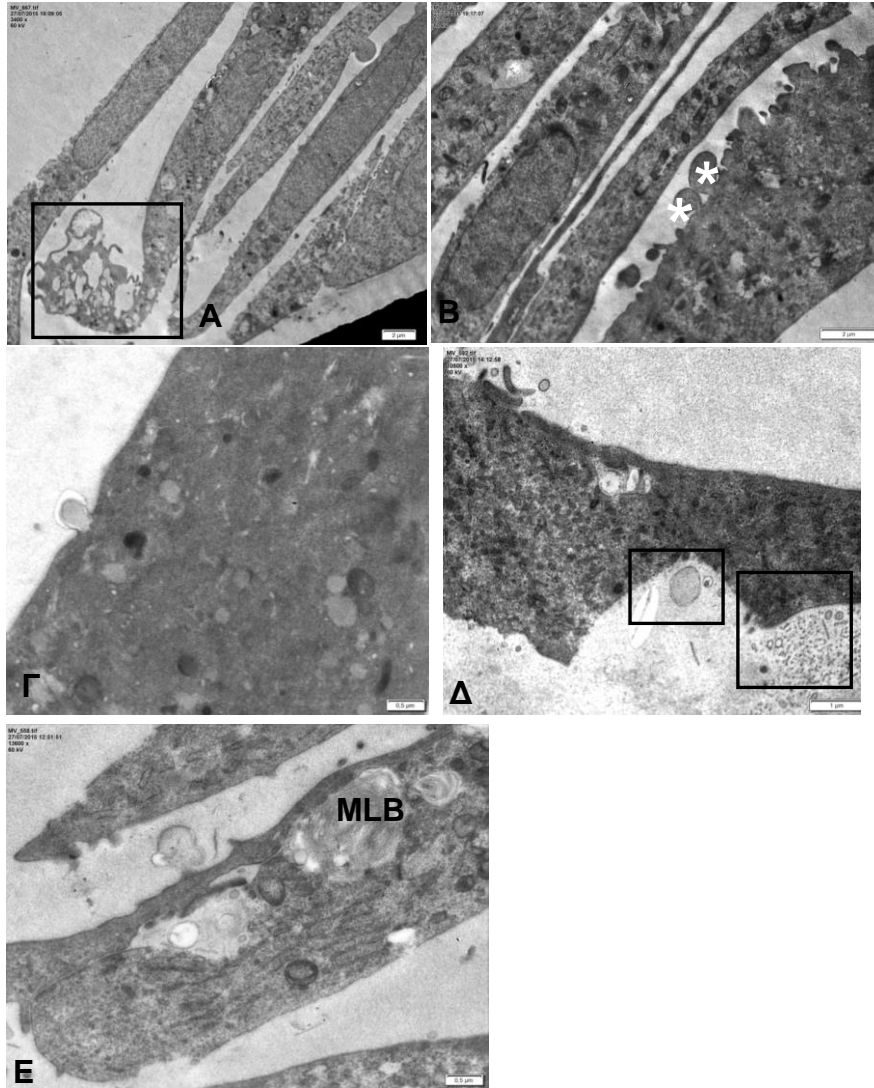
Εικόνα 12: Κυτταρικές επαφές. Ηλεκτρονιογραφίες κυτάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A, B Παρατηρείται συχνά η ανάπτυξη κυτταρικών συνδέσεων (βέλος).

Γ Κάποια κύτταρα αναπτύσσουν διακυτταρικές επαφές μέσω σχηματισμού λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών (κπ) στο διακυτταρικό χώρο, οι οποίες συχνά περικλείουν διάφορα κυστίδια.

Αρχική μεγέθυνση: (A),(Γ)x10500, (B)x13600



Εικόνα 13: Κυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A Κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει εκτεταμένες κυτταροπλασματικές προσεκβολές οι οποίες εκτείνονται σε γειτονικά κύτταρα (πλαίσιο).

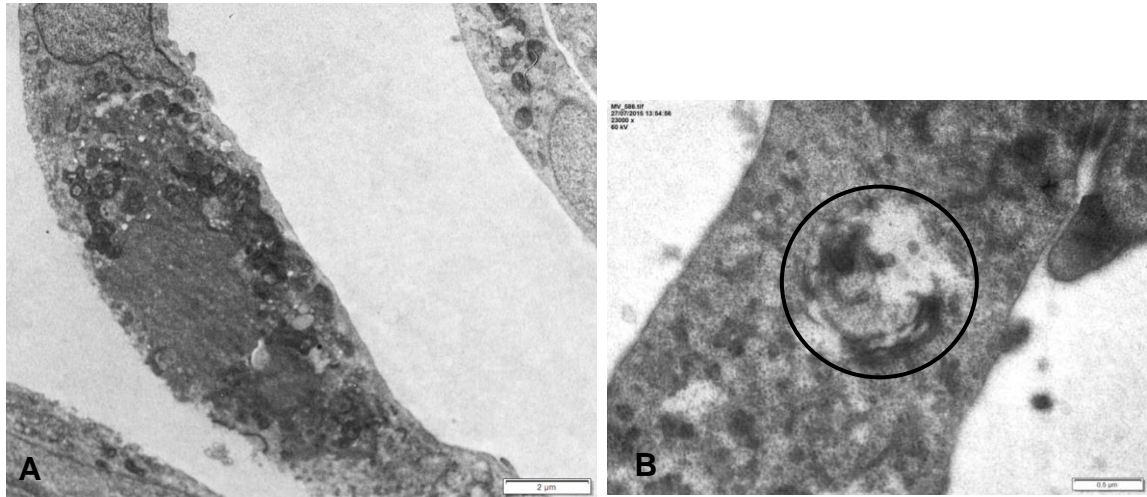
B Σε πολλά κύτταρα η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει πολλά μικροκυστίδια (microvesicles, MV) (αστερίσκοι).

Γ Συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της εξωκυττάρωσης.

Δ Ιδιαίτερα συχνή είναι η παρουσία κυττάρων που απελευθερώνουν πολλά εξωσώματα στο διακυτταρικό χώρο (πλαίσιο).

E Διακριτά πολυστιβαδικά σωματίδια είναι παρόντα στο κυτταρόπλασμα (multilamellar bodies, MLBs).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x3400, (B)x6350, (Γ),(E)x13600, (Δ)x10500



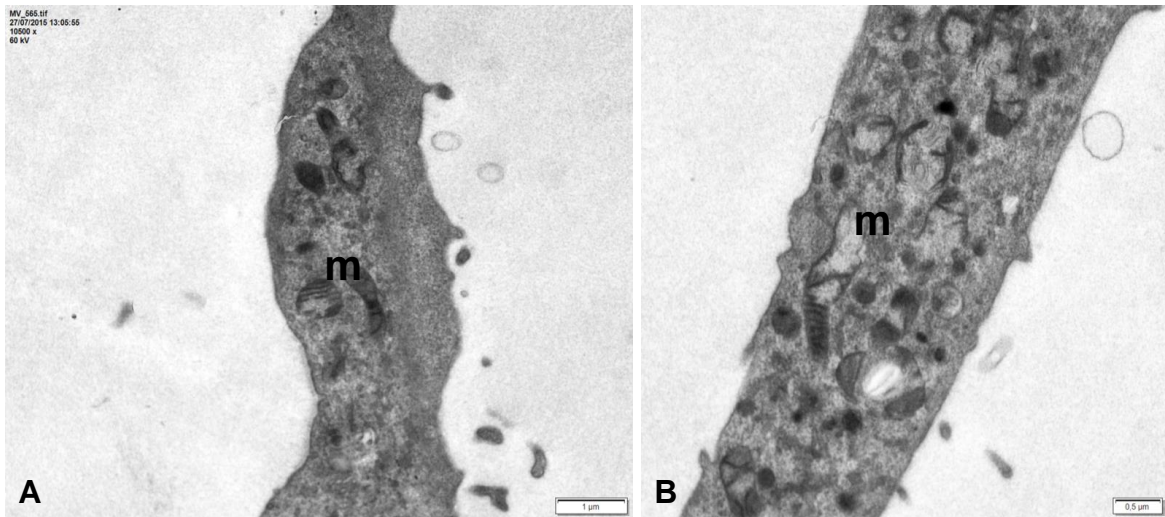
Εικόνα 14: Αυτοφαγία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A Το κυτταρόπλασμα πολλών κυττάρων περιέχει άφθονα αυτοφαγοσώματα ή πρώιμα αυτοφαγικά κενοτόπια (autophagic vacuoles, AV-I).

B Διακρίνεται η φάση επιμήκυνσης της διπλής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος και τα μικροκυτίδια στην περιοχή που εγκολπώνει (κύκλος).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x6350, (B)x23000



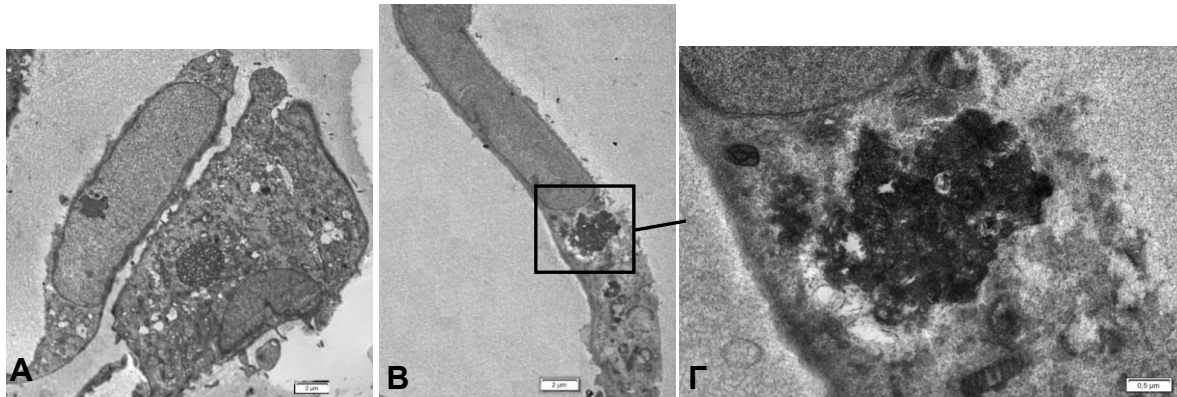
Εικόνα 15: Μιτοχόνδρια. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 6 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 6 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A,B Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων παρουσιάζουν ελαττωματική μορφολογία. Στην πλειοψηφία των κυττάρων τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν μερική ή ολική απώλεια των ακρολοφιών, ενώ σε κάποια από αυτά παρατηρείται σχετική επιμήκυνσή τους (m).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x10500, (B)x13600

Saos2-TetON p21 ON 10 μέρες



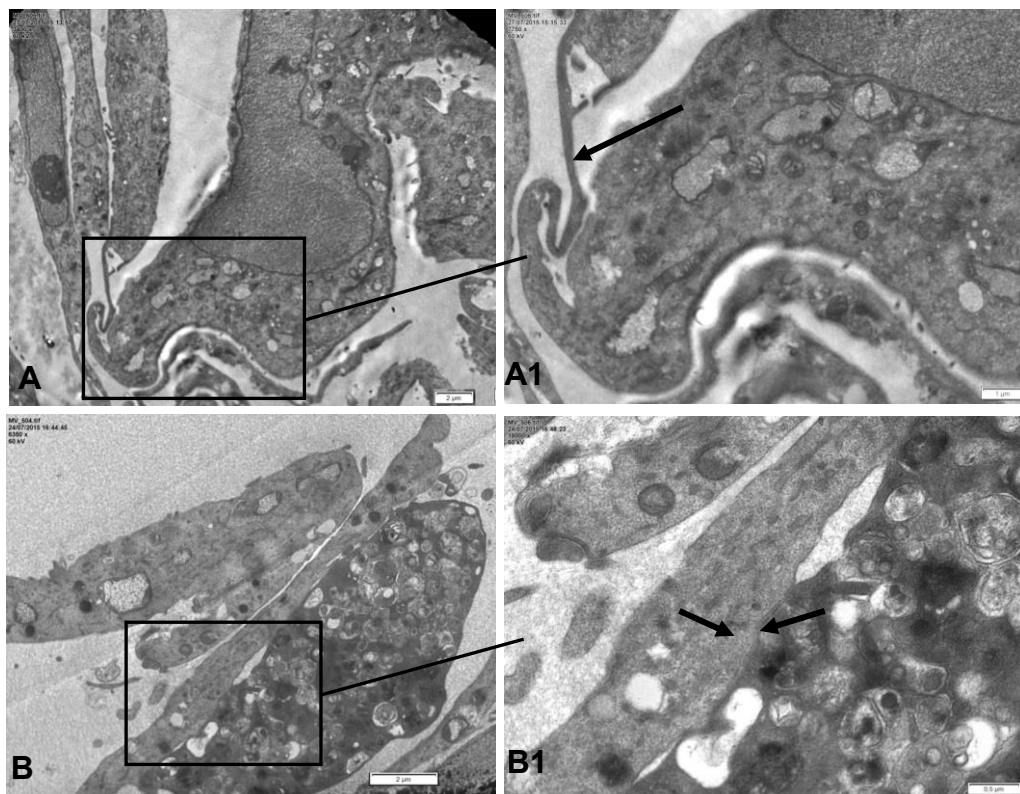
Εικόνα 16: Κύτταρα σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A Διακρίνονται συχνά κύτταρα σε γήρανση με χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος.

B,Γ Συχνά παρατηρείται συσσώρευση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα.

Αρχική μεγέθυνση: (A),(B)x3400, (Γ)x13600

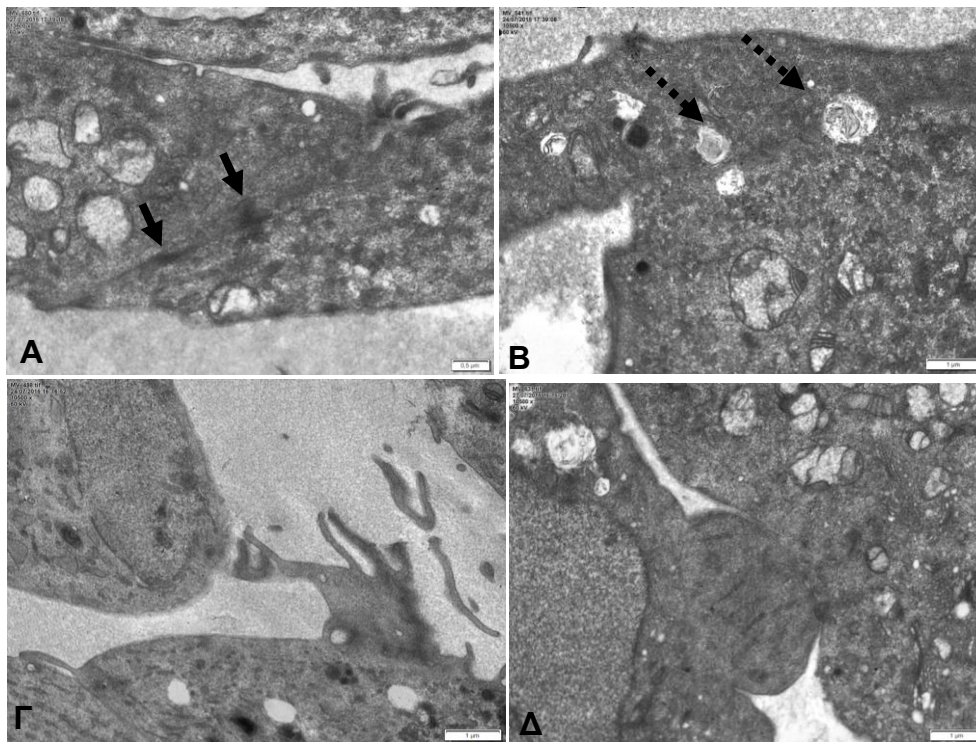


Εικόνα 17: Επαφές κυττάρων σε γήρανση με κύτταρα escaped. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A, A1 Τα κύτταρα που βρίσκονται σε γήρανση συχνά σχηματίζουν λεπτές επιμήκεις κυτταρικές προσεκβολές που έρχονται σε επαφή με τα escaped κύτταρα (βέλος).

B, B1 Τα κύτταρα που βρίσκονται σε γήρανση αναπτύσσουν κυτταρικές συνδέσεις με τα escaped κύτταρα (βέλη).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x3400, (A1)x7750, (B)x6350, (B1)x18000



Εικόνα 18: Διακυτταρικές επαφές κυττάρων σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

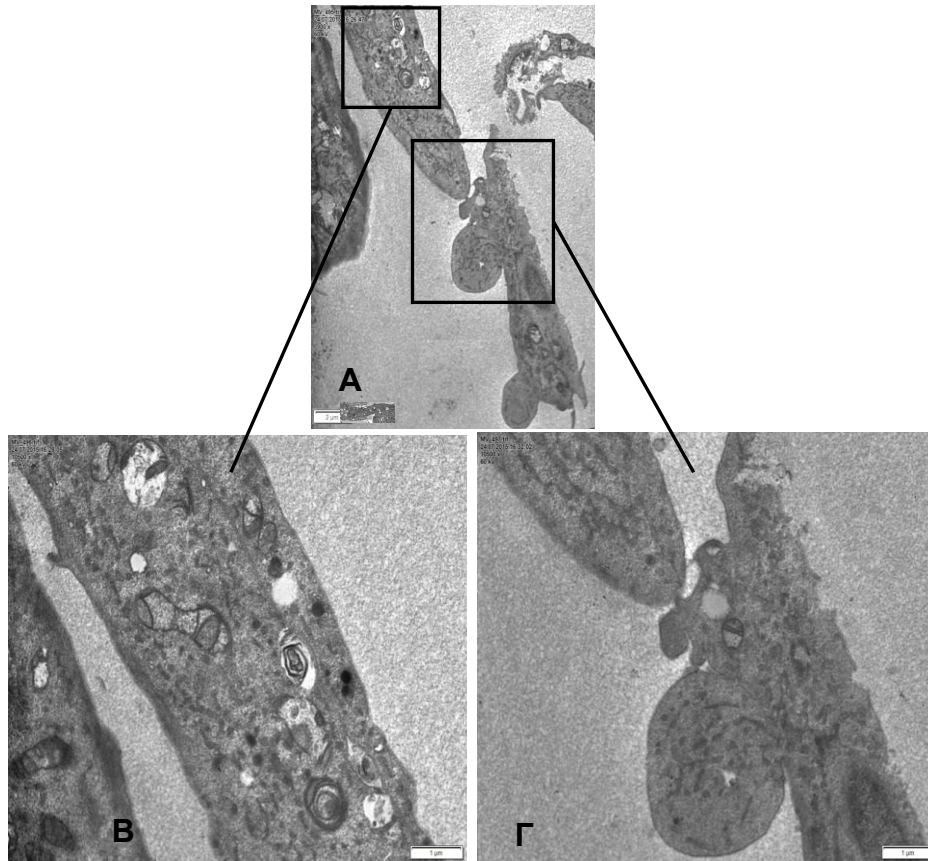
A Τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης συχνά σχηματίζουν δεσμοσώματα με τα γειτονικά τους κύτταρα (βέλη).

B Αρκετά συχνά σχηματίζονται διακυτταρικά κανάλια (intercellular canaliculi) ανάμεσα στα γηρασμένα κύτταρα και στα escaped κύτταρα (διακεκομμένα βέλη).

Γ Σχηματισμός λεπτών, επιμηκυμένων και διακλαδισμένων κυτταρικών προσεκβολών οι οποίες εκτείνονται σε διπλανά κύτταρα.

Δ Η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει συχνά προσεκβολές με σφαιρικό σχήμα οι οποίες κατευθύνονται συνήθως προς τα γειτονικά κύτταρα.

Αρχική μεγέθυνση: (A)x13600, (B),(Γ),(Δ)x10500



Εικόνα 19: Κύτταρα *escaped* που γεινιάζουν με κύτταρα σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

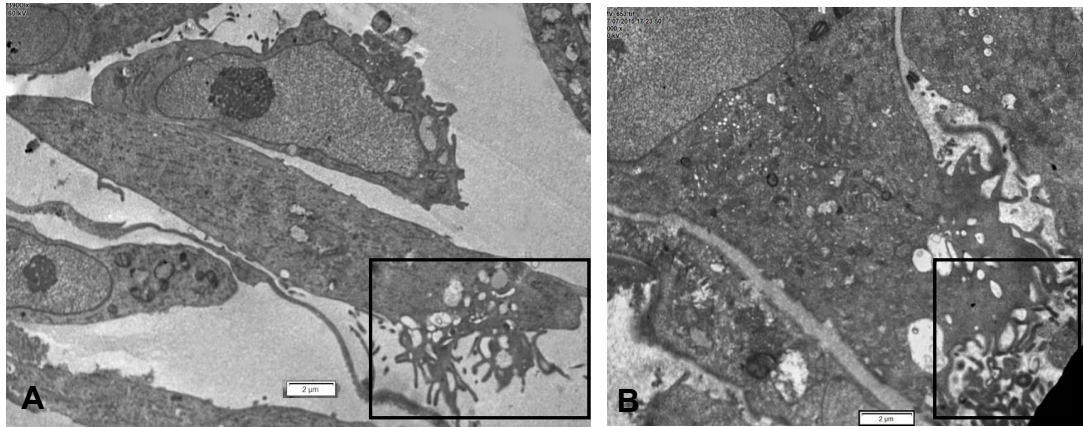
A Κύτταρο σε γήρανση (επάνω) που βρίσκεται σε γεινίαση με κύτταρο *escaped* (κάτω).

Οι περιοχές εντός των πλαισίων μεγεθύνονται στις εικόνες B, Γ.

B Μέρος κυτταροπλάσματος κυττάρου σε γήρανση με παρουσία μιτοχονδρίων με απώλεια ακρολοφιών, καθώς και αυτοφαγοσωμάτων.

Γ Κάποια κύτταρα έχουν αποκτήσει σφαιρικές κυτταροπλασματικές προσεκβολές.

Αρχική μεγέθυνση: (A)x3900, (B),(Γ)x10500

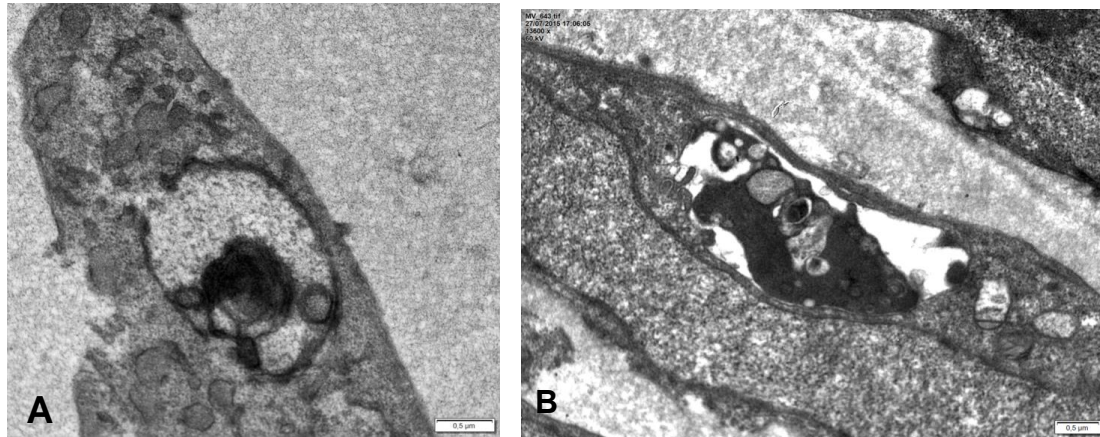


Εικόνα 20: Κύτταρα σε γήρανση - Κυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A, B Τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης συχνά σχηματίζουν ένα δίκτυο από λεπτές, επιμήκεις και διακλαδισμένες κυτταροπλασματικές προσεκβολές (πλαίσια).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x3900, (B)x5000



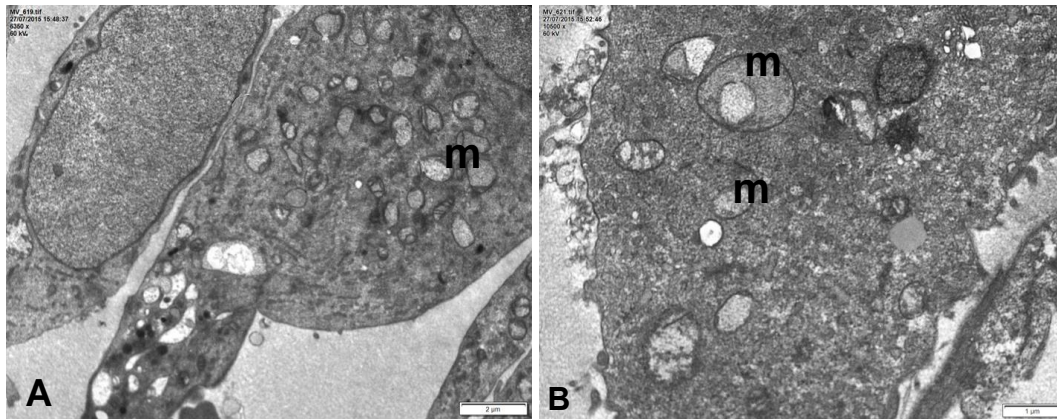
Εικόνα 21: Αυτοφαγία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξκυκλίνη (ON 10 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A Παρατηρείται η φάση επιμήκυνσης της διπλής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος, το οποίο εγκολπώνει διάφορα κυστίδια.

B Συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της μακροαυτοφαγίας.

Αρχική μεγέθυνση: (A)x18000, (B)x10500, (Γ)x13600



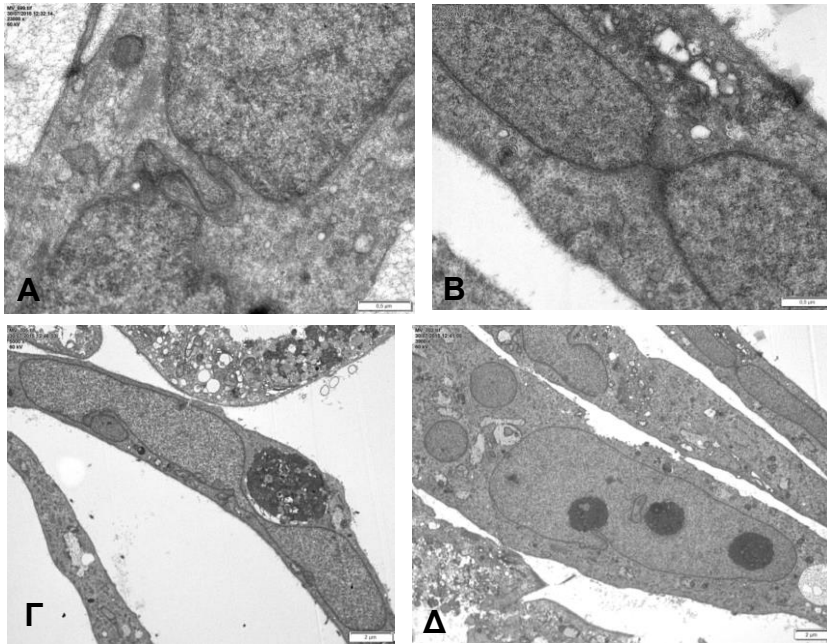
Εικόνα 22: Μιτοχόνδρια των κυττάρων σε γήρανση. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 10 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 10 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A, B Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που βρίσκονται σε γήρανση έχουν χάσει μερικώς ή ολικώς τις ακρολοφίες τους (m).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x6350, (B)x10500

Saos2-TetON p21 ON 26 μέρες - κύτταρα escaped



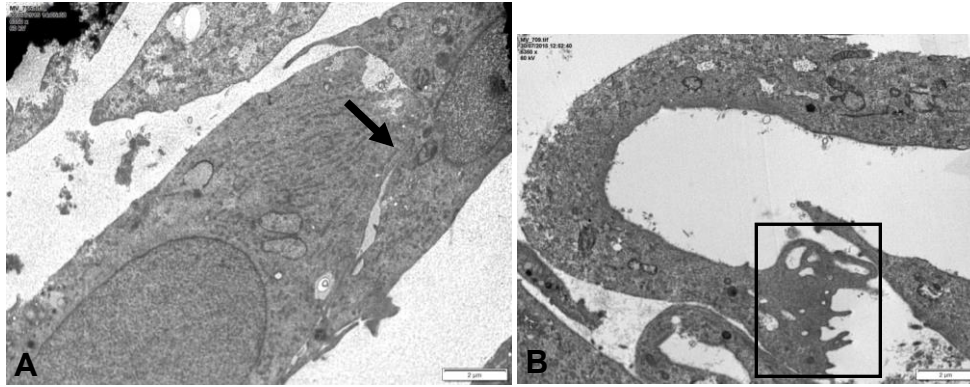
Εικόνα 23: Πολύλοβοι πυρήνες. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ON 26 μέρες).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A-Γ Χαρακτηριστικό των escaped κυττάρων που συναντάται συχνά είναι η παρουσία πολύλοβων πυρήνων (multilobular nuclei) που συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά νημάτια χρωματίνης (πυρηνικές γέφυρες).

Δ Παρατηρούνται συχνά κύτταρα με τρεις πυρηνίσκους (nucleolus) και μικροπυρήνες (micronucleus) (βέλη).

Αρχική μεγέθυνση: (A),(B)x23000, (Γ)x5000, (Δ)x3900



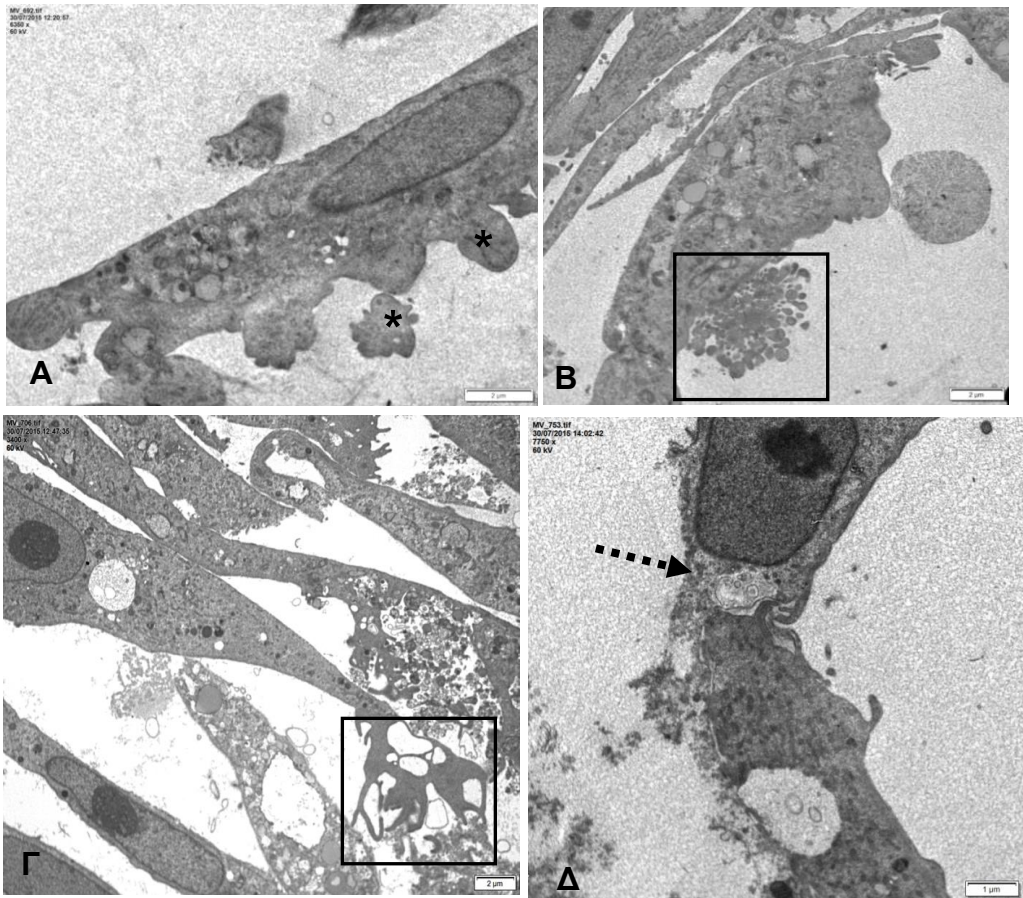
Εικόνα 24: Κυτταρικές επαφές. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A Πολλά κύτταρα αναπτύσσουν κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ τους.

B Χαρακτηριστικός είναι ο σχηματισμός λεπτών και διακλαδισμένων κυτταρικών προεκβολών από τα escaped κύτταρα οι οποίες εκτείνονται σε διπλανά κύτταρα (πλαίσιο).

Αρχική μεγέθυνση: (A),(B)x6350



Εικόνα 25: Διακυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

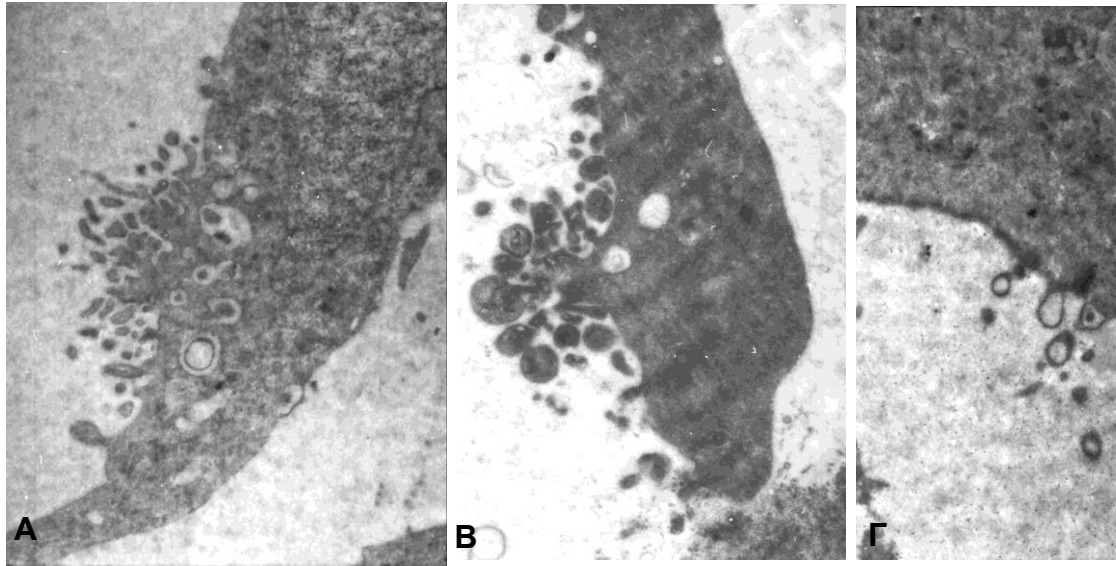
A Η κυτταρική μεμβράνη των escaped κυττάρων σχηματίζει σχεδόν σφαιρικές κυτταροπλασματικές προεκβολές που εκτείνονται στον διακυτταρικό χώρο με κατεύθυνση γειτονικά κύτταρα (αστερίσκοι).

B Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η απελευθέρωση από τα γηρασμένα κύτταρα άφθονων μικροκυστιδίων σε σχηματισμούς που μοιάζουν με “μπουκέτο” (πλαίσιο).

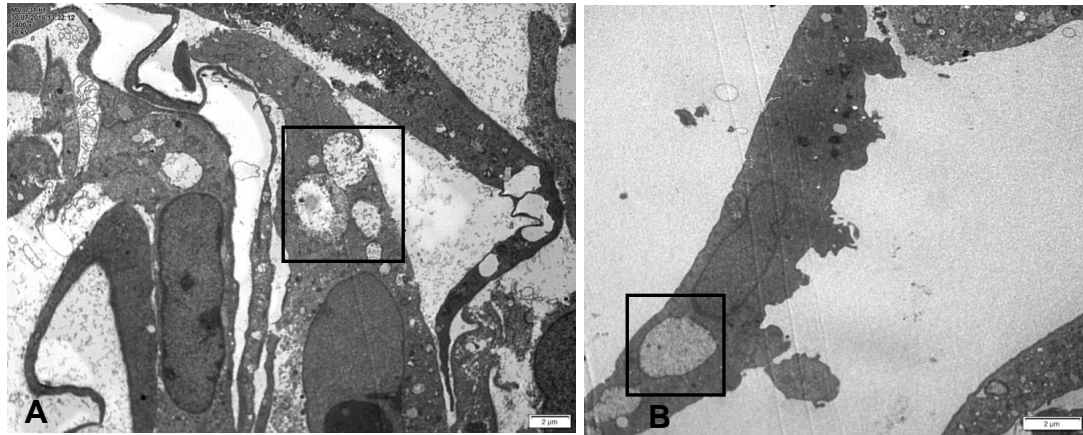
Γ Τα κύτταρα σχηματίζουν πολλές διακλαδισμένες κυτταρικές προεκβολές που εκτείνονται προς τα γειτονικά κύτταρα (πλαίσιο).

Δ Σχηματισμός διακυτταρικού καναλιού (διακεκομμένο βέλος).

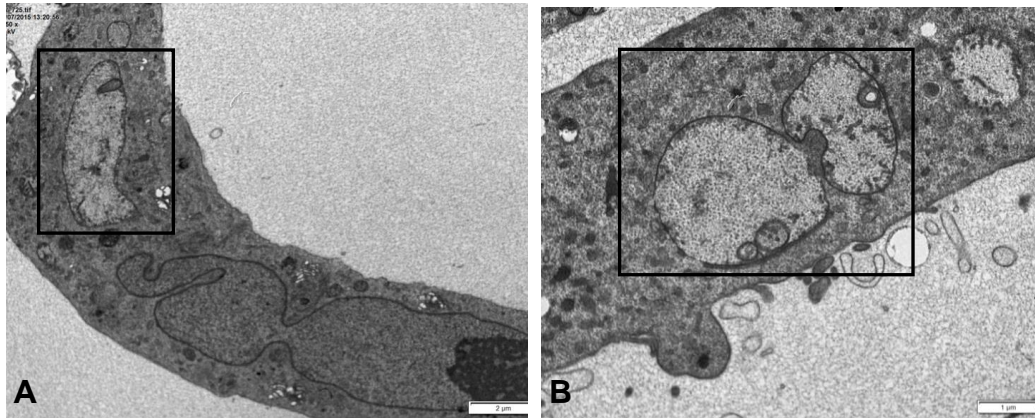
Αρχική μεγέθυνση: (A)x6350, (B)x5000, (Γ)x3400, (Δ)x7750



Εικόνα 26: Διακυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος
A-Γ Απελευθέρωση άφθονων μικροκυστιδίων και εξωσωμάτων από τα escaped κύτταρα.
Αρχική μεγέθυνση: (A)x975, (B),(Γ)x3200



Εικόνα 27: Ενδοκυτταρική επικοινωνία. Ηλεκτρονιογραφίες κυτάρων της σειράς Saos2TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος
A,B Παρατηρείται ο σχηματισμός ενδοκυτταροπλασματικών αυλών (πλαίσια).
Αρχική μεγέθυνση: (A)x3400, (B)x5000



Εικόνα 28: Μιτοχόνδρια. Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Saos2-TetON p21, 26 μέρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (escaped).

Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος

A, B Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων παρουσιάζουν αυξημένο όγκο και σχεδόν ολική απώλεια των ακρολοφιών τους (πλαίσια).

Αρχική μεγέθυνση: (A)x6350, (B)x10500

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπερμικροσκοπική μελέτη της καρκινικής κυτταρικής σειράς Saos2, που αποτελείται από κύτταρα οστεοσαρκώματος με μη-λειτουργική πρωτεΐνη p53, μετά από επαγωγή έκφρασης του γονιδίου *p21^{CIP1/WAF1}*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το επαγωγίμο κυτταρικό σύστημα Saos2-TetON p21 σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα έκφρασης του γονιδίου *p21^{WAF1/Cip1}*, στα οποία, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη της Ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, παρατηρήθηκε σταδιακή εμφάνιση γήρανσης και τελικά διαφυγή γήρανσης σε υποπληθυσμό κυττάρων.

Σύμφωνα με την εργασία αυτή, σε μία σειρά από ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς προχωρημένου σταδίου, οι οποίοι δεν είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία πριν την εκτομή τους, παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημικά μία ενδιαφέρουσα και απροσδόκητη συσχέτιση μεταξύ της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p21 και της πρωτεΐνης Ki67, η οποία αποτελεί δείκτη πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, σε έναν περιορισμένο αριθμό καρκινικών κυττάρων, συνήθως με άτυπους και ευμεγέθεις πυρήνες, παρατηρήθηκε συνεντόπιση τόσο για την p21 όσο και για την Ki67. Στην παθολογική ανατομική ανάλογες παρατηρήσεις συσχετίζονται με αρνητικές προγνώσεις προσδόκιμου επιβίωσης για τους ασθενείς. Πρέπει να τονιστεί ότι στο σύνολο των καρκινικών ιστών με τις παραπάνω παρατηρήσεις, η πρωτεΐνη p53 ήταν μεταλλαγμένη ή απύουσα.⁸⁵⁻⁸⁷ Η απροσδόκητη συνεντόπιση της p21 με τον πολλαπλασιαστικό παράγοντα Ki67 μπορεί να ερμηνευθεί με δυο τρόπους:

1. Τα καρκινικά κύτταρα απέκτησαν ανοχή στην παρουσία της p21
2. Η συνεχής έκφραση της p21 οδήγησε μέσω επιλογής στην εμφάνιση υποπληθυσμού καρκινικών κυττάρων, τα οποία υπό τη συνεχή παρουσία της πρωτεΐνης ανέκτησαν μετά από μία περίοδο αναστολής του κυτταρικού κύκλου, την ικανότητα πολλαπλασιασμού και ίσως στοιχεία περαιτέρω επιθετικότητας ως καρκινικά κύτταρα.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία των υπερμικροσκοπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων Saos2-TetON p21 στα τέσσερα χρονικά διαστήματα ενεργοποίησης του γονιδίου. Έτσι προκύπτουν τα εξής:

A. Κύτταρα OFF (χωρίς την ενεργοποίηση της p21)

Η παρατήρηση των κυττάρων Saos2-TetON p21 σε ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία έδειξε ότι τα κύτταρα OFF, στα οποία δεν έχει γίνει επαγωγή έκφρασης του γονιδίου p21, έχουν χαρακτηριστική πλακώδη μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων, ενώ κάποια από αυτά έχουν ατρακτοειδές σχήμα. Η υπερμικροσκοπική μελέτη της δομής των κυττάρων αυτών αποκαλύπτει την ανάπτυξη στενών επαφών μεταξύ τους και ποικίλων τρόπων διακυτταρικής επικοινωνίας, όπως τον σχηματισμό μικρολαχνών, κυτταροπλασματικών προσεκβολών και διακυτταρικών καναλιών. Ακόμη, η ύπαρξη άφθονων μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα είναι ενδεικτική της έντονης μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων αυτών. Ένα από τα εξέχοντα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η μεταβολική ανισορροπία και η αυξημένη αντοχή στη μιτοχονδριακή απόπτωση.⁸⁸

B. 6 ημέρες ενεργοποίησης της p21

Κατά την 6^η ημέρα έκφρασης του γονιδίου p21, η παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο σε πεδίο αντίθεσης φάσης έδειξε κύτταρα με πιο πεπλατυσμένη πλακώδη μορφολογία συγκριτικά με τα κύτταρα OFF, ενώ ανάμεσα στον πληθυσμό των κυττάρων παρατηρήθηκαν και κάποια κύτταρα σε γήρανση. Τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος και η υπερμικροσκοπική τους δομή χαρακτηρίζεται από την παρουσία αρκετών αυτοφαγοσωμάτων. Η αυτοφαγία αποτελεί μια σημαντική φυσιολογική απόκριση του κυττάρου που κανονικά λειτουργεί σε χαμηλά, βασικά επίπεδα στα κύτταρα. Μπορεί, όμως, να προκληθεί έντονη επαγωγή της σε ορισμένες περιπτώσεις κυτταρικού στρες, η πιο προφανής από τις οποίες είναι η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών.^{89,90} Το αυτοφαγικό πρόγραμμα επιτρέπει στα κύτταρα να αποικοδομούν τα κυτταρικά οργανίδια, όπως ριβοσώματα και μιτοχόνδρια, επιτρέποντας στους καταβολίτες που προκύπτουν να ανακυκλωθούν και να

χρησιμοποιηθούν για τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό της ενέργειας. Στο πλαίσιο αυτού του προγράμματος, ενδοκυτταρικά κυστίδια, που ονομάζονται αυτοφαγосώματα, εγκολπώνουν τα ενδοκυτταρικά οργανίδια και στη συνέχεια ενώνονται με τα λυσοσώματα όπου γίνεται η αποικοδόμηση. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούνται χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες που υποστηρίζουν την επιβίωση σε καταστάσεις στρες και σε περιβάλλοντα με περιορισμένα συστατικά που συχνά «βιώνουν» πολλά καρκινικά κύτταρα.⁸ Επίσης, τα μιτοχόνδρια κάποιων από αυτά τα κύτταρα είναι σχετικά ευμεγέθη και έχουν χάσει μερικώς τις ακρολοφίες τους, γεγονός που ενδεχομένως υποδηλώνει μείωση του ρυθμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τέλος, η διακυτταρική επαφή είναι πιο καλά αναπτυγμένη με τη διαμόρφωση κυτταρικών συνδέσεων, ενώ παράλληλα τα κύτταρα έχουν αναπτύξει περισσότερους τρόπους διακυτταρικής επικοινωνίας με σχηματισμό προσεκβολών, απελευθέρωση εξωσωμάτων, σχηματισμό μικροκυστιδίων και πολυμεμβρανικών σωματιδίων-(MLBs).

Συγκεκριμένα, τα εξωσώματα είναι μεμβρανικά κυστίδια (endosomal derived) που απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας τα τελευταία χρόνια. *In vitro* και *in vivo* μελέτες υποστηρίζουν τη συμβολή των εξωσωμάτων στο μη κυτταρικό τρόπο επικοινωνίας, οδηγώντας σε διακυτταρική μεταφορά των μορίων.⁹¹ Σε αντίθεση με τα εξωσώματα, τα μικροκυστίδια (Microvesicles, MV) φαίνεται να προέρχονται απευθείας από την πλασματική μεμβράνη. Η πλασματική μεμβράνη υφίσταται διάφορες μοριακές ανακατατάξεις στις θέσεις προέλευσης των MV, οι οποίες οδηγούν σε μεμβρανικές εκβλαστήσεις—(membrane budding) συμπεριλαμβανομένων των μεταβολών στη σύνθεση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, καθώς και των επιπέδων Ca^{2+} .⁹²

Τα MLBs είναι κυτταρικά οργανίδια δεσμευμένα σε μεμβράνη, των οποίων το μέγεθος ποικίλλει από 100 σε 2400 nm. Τα MLBs αποτελούνται από ομόκεντρα στρώματα μεμβράνης και συχνά εμφανίζουν έναν ηλεκτρονιόπυκνο κέντρο. Επίσης, βρίσκονται σε πολλά είδη κυττάρων, και η λειτουργία τους σχετίζεται με την αποθήκευση των λιπιδίων και την έκκριση.⁹³ Ο σχηματισμός της πολλαπλής μεμβράνης του MLB απαιτεί ένα τεράστιο ποσό κυτταρικών λιπιδίων, και η αυτοφαγία μπορεί να αποτελεί το πιο αποτελεσματικό μέσο της συγκέντρωσης των απαραίτητων μορίων σε ένα ενιαίο οργανίδιο. Η επιλεκτική αντίσταση των περιεχομένων του αυτοφαγικού κενοτόπιου για λυσοσωμική αποικοδόμηση,

καταλήγει σε έναν εντοπισμένο σχηματισμό μεμβρανικών φύλλων, τα οποία δημιουργούν τις ομόκεντρες σπείρες της μεμβράνης του MLB.⁹³

Γ. 10 ημέρες ενεργοποίησης της p21

Υπό τη συνεχή έκφραση του γονιδίου p21 για 10 μέρες, η γήρανση έφτασε στο αποκορύφωμά της. Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των κυττάρων παρουσίασε φαινότυπο με χαρακτηριστικά γήρανσης, όπως πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος, ενώ αρκετά από αυτά είχαν φαινότυπο προς γήρανση. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα που είχαν παρουσιαστεί και σε προηγούμενες εργασίες.⁸³ Επιπλέον, παρατηρήθηκαν πολλά κύτταρα σε απόπτωση. Η απόπτωση αποτελεί έναν σημαντικό ογκοκατασταλτικό μηχανισμό που συμβάλλει στην εξάλειψη των μεταλλαγμένων κυττάρων, τα οποία διαφορετικά, μπορούν να εξελιχθούν σε προ-νεοπλασματικά κύτταρα. Η αυξημένη απόπτωση πιστεύεται ότι είναι μια απόκριση στη μειωμένη ικανότητα των κυττάρων να διατηρήσουν τη γενωμική ακεραιότητα και να επιδιορθώσουν τις βλάβες, όπως συνήθως παρατηρείται κατά τη γήρανση. Το οξειδωτικό στρες, που είναι αυξημένο στη γήρανση και ο σχηματισμός των ROS αυξάνουν τον κίνδυνο βλάβης του DNA, προκαλώντας έτσι απόπτωση στα κατεστραμμένα κύτταρα. Δεν υπάρχει μοναδική ερμηνεία σχετικά με τη φύση της αλληλεπίδρασής της γήρανσης και της απόπτωσης. Από τη μια πλευρά, αυτές οι δύο διαδικασίες μπορεί να ενεργοποιηθούν ταυτόχρονα ως απόκριση στο στρες. Η μια οδός θα μπορούσε να ευνοείται σε σύγκριση με την άλλη. Κατά την άποψη αυτή, οι συνθήκες που αναστέλλουν το ένα μονοπάτι (π.χ. απόπτωση) πιθανόν να προωθήσουν τη στροφή προς το άλλο (π.χ. την κυτταρική γήρανση). Έτσι, η γήρανση και η απόπτωση πιθανόν δρουν ανταγωνιστικά αλλά ενδεχομένως και αντισταθμιστικά. Από την άλλη πλευρά θα μπορούσαν να παίζουν συμπληρωματικό ρόλο.⁹⁴

Υπερμικροσκοπικά, ορισμένα γηρασμένα κύτταρα παρουσίασαν συσσώρευση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα. Μεταξύ των διαφόρων μεταβολικών προσαρμογών που χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα ώστε να προσαρμοστούν στις συνθήκες που επιβάλλονται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, αλλαγές στον μεταβολισμό του γλυκογόνου αναδύονται ως ουσιαστική απόκριση. Επιπλέον, η αναστολή της κινητοποίησης και η συσσώρευση του

γλυκογόνου σε καρκινικά κύτταρα είναι παράγοντας που συμβάλλει στην επαγωγή της γήρανσης ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη του όγκου.⁹⁵

Επιπροσθέτως, τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης αναπτύσσουν επαφές με κύτταρα *escaped*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν την καρκινογένεση με δυο τρόπους, είτε ενισχύοντάς την είτε καταστέλλοντάς την. Συγκεκριμένα, τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να υποβοηθήσουν την καρκινογένεση, κυρίως με την έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και μεταλλοπρωτεϊνών. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να προσλάβουν οργανίδια και πρωτεΐνες από τα γηρασμένα κύτταρα για να υποστηρίξουν τον γρήγορο πολλαπλασιασμό τους. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται από τα γηρασμένα κύτταρα στα γειτονικά τους θα μπορούσαν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης σε αυτά τα κύτταρα, η οποία τελικά, οδηγεί σε αλλαγές στην κυτταρική συμπεριφορά. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα σε γήρανση θα μπορούσαν να μεταφέρουν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου (π.χ. p16, p21, p15) προς τα καρκινικά κύτταρα, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό τους. Συμπερασματικά, η επιβίωση ενός καρκινικού κυττάρου ενδεχομένως υποβοηθείται από την επαφή του με κύτταρο σε γήρανση.⁹⁶ Επιπλέον, αυξημένη είναι η παρουσία αυτοφαγοσωμάτων και κατά τη 10^η μέρα της επώασης των κυττάρων με Doxycycline. Παρατηρούνται αυτοφαγοσώματα στα οποία η φάση επιμήκυνσης της διπλής μεμβράνης τους είναι σε πιο προχωρημένο στάδιο από ότι την 6^η μέρα ενώ συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της μακροαυτοφαγίας. Κατά την μακροαυτοφαγία τμήματα του κυτταροπλάσματος συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων οργανιδίων εγκολλώνονται από τα αυτοφαγοσώματα. Το φαινόμενο της μακροαυτοφαγίας φαίνεται να είναι πολύ σημαντικό για τη διαδικασία της γήρανσης. Η μακροαυτοφαγία ενεργοποιείται από τη λυσοσωμική μεμβράνη μέσω του μηχανισμού διαπερατοποίησης της τελευταίας, ως απάντηση στο κυτταρικό στρες (*permeabilization cellular stress response*), οδηγώντας με τη σειρά της σε φαινότυπο γήρανσης. Τα λυσοσώματα είναι ο τελικός προορισμός των αυτοφαγοσωμάτων και ως εκ τούτου, η δυσλειτουργία αυτών των οργανιδίων παρεμποδίζει τον σχηματισμό αυτολυσοσώματος και συνεπώς την αυτοφαγία. Με τον τρόπο αυτό, η διαπερατότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης προκαλεί μακροαυτοφαγία και ενεργοποιεί επίσης την πρόωρη γήρανση που επάγεται από το στρες, η οποία είναι αναστρέψιμη με αναστολή της αυτοφαγίας. Συνολικά, αυτά τα δεδομένα

αποκαλύπτουν μια βαθιά σχέση μεταξύ των διαδικασιών μακροαυτοφαγίας και γήρανσης.⁹⁷

Επίσης, συγκριτικά με τα κύτταρα που βρίσκονται στην 6η ημέρα ενεργοποίησης της p21, περισσότερα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν ελαττωματική μορφολογία έχοντας χάσει μερικώς ή ολικώς τις ακρολοφίες τους. Τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια μπορούν να επάγουν κυτταρική γήρανση σε καλλιέργεια (*in vitro*), αλλά και *in vivo*. Ορισμένες μελέτες εμπλέκουν τις μιτοχονδριακές ενεργές ρίζες οξυγόνου ως την αιτία του φαινομένου.⁹⁸

Επειδή τα μιτοχόνδρια οξειδώνουν το NADH σε NAD⁺⁹⁹, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να μειώσει την αναλογία NAD⁺/NADH. Ενώ τα μιτοχόνδρια οξειδώνουν το NADH που δημιουργείται από τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) ή την οξείδωση των λιπαρών οξέων, μπορούν επίσης να οξειδώνουν την κυτοσολική δεξαμενή NAD⁺/NADH μέσω της αντιμεταφοράς α-γλυκεροφωσφορικού και μηλικού-ασπαρτικού. Αναστολή της δεύτερης από εξάντληση της μηλικής αφυδρογονάσης μειώνει την αναλογία NAD⁺/NADH και επάγει μια αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω γήρανσης. Η αυτοφαγία και η γήρανση μπορεί να είναι μέρος του ίδιου βιολογικού φαινομένου. Σε υποστήριξη της έννοιας αυτής, πολλά από τα ίδια ερεθίσματα που επάγουν αυτοφαγία (όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου και το οξειδωτικό στρες) επάγουν επίσης γήρανση.⁹⁹

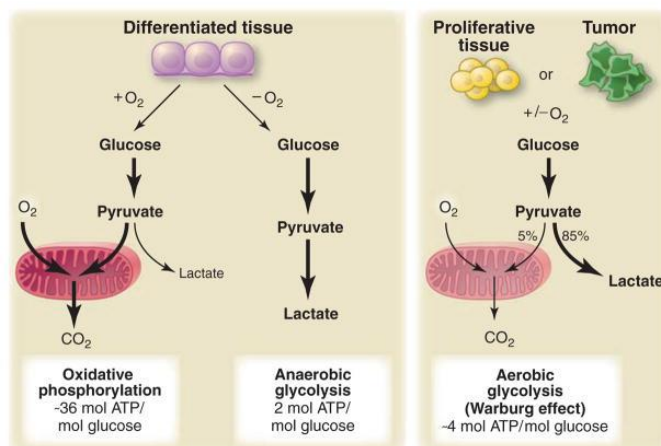
Δ. 26 ημέρες ενεργοποίησης της p21 (Escaped)

Μετά από την παρατεταμένη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p21 για 26 ημέρες, τα κύτταρα *escaped* έχουν αποκτήσει πιο έντονα ατρακτοειδή σχήματα συγκριτικά με τα κύτταρα OFF, ενώ παρατηρείται μείωση στον αριθμό των κυττάρων με χαρακτηριστικά γήρανσης. Ένα επιπλέον ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των *escaped* κυττάρων είναι ότι ο πυρήνας τους είναι συγκριτικά μεγαλύτερος σε σχέση με τον πυρήνα των κυττάρων που δεν έχει γίνει ενεργοποίηση της p21 (OFF). Η υπερμικροσκοπική μελέτη μάλιστα έδειξε τη διαμόρφωση λοβών στους πυρήνες (πολύλοβοι πυρήνες) που συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά νημάτια χρωματίνης (πυρηνικές γέφυρες), καθώς και τη παρουσία μικροπυρήνων (*micronuclei*). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι ενδεικτικά της ύπαρξης χρωμοσωμικής αστάθειας, ελαττωματικής απόκρισης σε βλάβη του DNA και επιδιόρθωσής του

επιρρεπή σε σφάλμα (error-prone).^{62,85} Σύμφωνα με το μοντέλο που προτείνεται σε πρόσφατη δημοσίευση του εργαστηρίου μας σε συνεργασία με διεθνή εργαστήρια,⁶² η συνεχής συσσώρευση γενωμικών βλαβών οδηγεί τελικώς σε γενωμική αστάθεια και μέσα από αυτή τη διαδικασία προκύπτουν κύτταρα με χαρακτηριστικά επιθετικού καρκίνου (full malignancy). Επιπλέον, παρατηρούνται συχνά κύτταρα με πολλούς πυρηνίσκους, γεγονός που υποδεικνύει την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα. Η έντονη μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων πιθανώς να συσχετίζεται με τον ενισχυμένο τρόπο διακυτταρικής επικοινωνίας που χαρακτηρίζει τα escaped κύτταρα. Συγκεκριμένα, κάποια κύτταρα που έχουν διαφύγει της γήρανσης παρουσιάζουν μαζική απελευθέρωση εκκρινόμενου υλικού μέσω άφθονων μικροκυστιδίων ή εξωσωμάτων, γεγονός που ενδεχομένως αποτελεί συνέπεια της αυξημένης μεταγραφής που λαμβάνει χώρα στο κύτταρο.

Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια των escaped κυττάρων είναι ευμεγέθη και σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζουν έντονη διόγκωση, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν ελαττωματική μορφολογία έχοντας χάσει πλήρως τις ακρολοφίες τους. Τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν ελαττώματα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, οδηγώντας σε ανεπάρκεια μιτοχονδριακής αναπνοής και παραγωγής ATP.⁸⁸ Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού, ανεξάρτητα από την διαθεσιμότητα οξυγόνου και ως εκ τούτου ο μεταβολισμός τους συχνά αναφέρεται ως «αερόβια γλυκόλυση». Ο Warburg (1924) αρχικά υπέθεσε ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ελαττωματικά μιτοχόνδρια, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη αερόβια αναπνοή και μια επακόλουθη εξάρτηση από γλυκολυτικό μεταβολισμό.¹⁰⁰ Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα, βασίζονται στην αερόβια γλυκόλυση, ένα φαινόμενο που ονομάζεται "επίδραση Warburg." Η αερόβια γλυκόλυση είναι ένας αναποτελεσματικός τρόπος για να δημιουργηθεί ATP. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε γαλακτικό δημιουργεί μόνο 2 ATP ανά μόριο γλυκόζης, ενώ η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει έως 36 ATP κατά την πλήρη οξείδωση ενός μορίου γλυκόζης. Αυτό εγείρει το ερώτημα γιατί μια λιγότερο αποτελεσματική μεταβολική πορεία, τουλάχιστον όσον αφορά την παραγωγή ATP, επιλέγεται από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα;¹⁰⁰ Σύμφωνα με μια ξεχασμένη και πρόσφατα αναβιωμένη και εκλεπτυσμένη υπόθεση, η αυξημένη γλυκόλυση επιτρέπει την εκτροπή των γλυκολυτικών ενδιάμεσων σε διάφορες βιοσυνθετικές οδούς, συμπεριλαμβανομένων όσων παράγουν νουκλεοτίδια και τα αμινοξέα. Αυτό

διευκολύνει, στη συνέχεια, τη βιοσύνθεση των μακρομορίων και των οργανιδίων που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση νέων κυττάρων (Σχήμα 16).⁸



Σχήμα 16: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αναερόβιας γλυκόλυσης και της αερόβιας γλυκόλυσης (φαινόμενο Warburg).¹⁰⁰

Η τροποποίηση στον μεταβολισμό της ενέργειας αποδεικνύεται ότι είναι τόσο διαδεδομένη στα καρκινικά κύτταρα, όπως πολλά από τα άλλα γνωρίσματα που σχετίζονται με τον καρκίνο, και έχουν γίνει αποδεκτά ως “χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου” (Hallmarks of cancer). Η διαπίστωση αυτή εγείρει το ερώτημα του κατά πόσον η απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού της ενέργειας αποτελεί ουσιώδη χαρακτηριστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων που είναι τόσο θεμελιώδης όσο τα έξι καθιερωμένα βασικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι: 1) αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης, 2) έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα που αναστέλλουν την ανάπτυξη, 3) αντίσταση στην απόπτωση, 4) αγγειογένεση, 5) διήθηση στον ιστό και μετάσταση, και 6) απεριόριστο αντιγραφικό δυναμικό. Στην πραγματικότητα, ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού της ενέργειας ενορχηστρώνεται σε μεγάλο βαθμό από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται με τον ένα ή τον άλλο τρόπο στον προγραμματισμό των βασικών χαρακτηριστικών του καρκίνου. Από αυτήν την άποψη, η αερόβια γλυκόλυση είναι απλά ένας άλλος φαινότυπος που έχει προγραμματιστεί από τα ογκογονίδια που επάγουν τον πολλαπλασιασμό. Αυτή η εξάρτηση από την γλυκόλυση μπορεί να οξυνθεί περαιτέρω κάτω από συνθήκες υποξίας που λειτουργούν μέσα σε πολλούς όγκους: το σύστημα απόκρισης υποξίας λειτουργεί πλειοτροπικά για να γίνει

αυξορρύθμιση των μεταφορέων γλυκόζης και πολλών ενζύμων του γλυκολυτικού μονοπατιού.⁸

Συμπερασματικά, η σταδιακή επαγωγή έκφρασης του γονιδίου p21 με απουσία της p53 στα κύτταρα Saos2-TetON p21 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή γήρανσης στα κύτταρα αυτά, η οποία έφτασε στο αποκορύφωμά της την 10^η ημέρα. Περαιτέρω ενεργοποίηση της p21 είχε ως αποτέλεσμα την διαφυγή γήρανσης και την επιβίωση υποπληθυσμού κυττάρων. Η υπερμικροσκοπική μελέτη αυτών των κυττάρων έδειξε ότι έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά γενωμικής αστάθειας και επιθετικής συμπεριφοράς.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας ανοίγουν το δρόμο για περαιτέρω βιοχημική διερεύνηση των μονοπατιών που οδηγούν τα κύτταρα Saos2-TetON p21 σε διαφυγή γήρανσης και στη συνέχεια στην επιβίωση υποπληθυσμού κυττάρων τα οποία έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά επιθετικών καρκινικών κυττάρων.

Συγκεκριμένα, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί απομόνωση των μιτοχονδρίων στα τέσσερα χρονικά διαστήματα καλλιέργειας των κυττάρων (0,6,10,26 ημέρες) και στη συνέχεια βιοχημική κλασματοποίηση στα συστατικά τους ώστε να γίνει δυνατή η μελέτη των διαφορετικών πρωτεϊνών σε κάθε διαφορετικό μιτοχονδριακό διαμέρισμα για κάθε διαφορετικό χρονικό διάστημα.¹⁰¹ Επιπλέον, το mtDNA των Saos2-TetON p21 κυττάρων θα μπορούσε απομονωθεί και εν συνεχεία να αναλυθεί με την τεχνική Next Generation Sequencing (NGS). Δεδομένου του σημαντικού ρόλου των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό της ενέργειας και στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών, οι μεταλλάξεις στο mtDNA είναι πιθανό να επηρεάσουν την ικανότητα του κυττάρου για παραγωγή ενέργειας, να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες και να προκαλέσουν βλάβη στο πυρηνικό DNA λόγω παραγωγής ROS. Έτσι, ο ρόλος των μεταλλάξεων του mtDNA στην ανάπτυξη του καρκίνου και τη γενωμική αστάθεια θα μπορούσε να γίνει αντικείμενο έρευνας στο μέλλον.

Επιπλέον, η παρουσία ευμεγεθών μιτοχονδρίων στα κύτταρα Saos2-TetON p21 κυρίως κατά την 26^η ημέρα ενεργοποίησης του γονιδίου p21 εγείρει το ερώτημα του κατά πόσον η αύξηση στο μιτοχονδριακό μέγεθος συνδέεται με την λειτουργική αποδοτικότητα των οργανιδίων αυτών. Η κυκλοοξυγενάση (COX), που αποτελεί αναπόσπαστη διαμεμβρανική πρωτεΐνη της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, είναι το τερματικό ένζυμο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου, που εντοπίζεται με χρήση διαμινοβενζιδίνης (DAB) σε ιστοχημική τεχνική, θεωρείται σήμερα ότι είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της μιτοχονδριακής μεταβολικής ικανότητας, δηλαδή της ικανότητας του μιτοχονδρίου να παρέχει επαρκείς ποσότητες ATP.¹⁰²

Ο συνδυασμός του γεγονότος ότι η παρουσία μιτοχονδρίων με αλλοιωμένη μορφολογία στο κύτταρο οδηγεί στην αύξηση των ROS και της παρατήρησης της παρούσας εργασίας ότι τα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε παρατεταμένη έκφραση του γονιδίου p21 διέφυγαν της γήρανσης, αποτελεί πολύ ενδιαφέρον

αντικείμενο μελλοντικής έρευνας. Ειδικότερα, θα μπορούσαν να δοθούν απαντήσεις στα παρακάτω ερωτήματα: Ποιος είναι ο ρόλος των ενεργών ριζών οξυγόνου, οι οποίες συσσωρεύονται κατά τη γήρανση, στην διαφυγή της γήρανσης και στη συνέχεια στον μετασχηματισμό υποπληθυσμού κυττάρων σε καρκινικά με πιο επιθετική συμπεριφορά; Επίσης, υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ROS και των επιπέδων της p21; Για τη μελέτη των παραπάνω, θα μπορούσε να γίνει μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS στα κύτταρα Saos2-TetON p21 π.χ. με tet-ρυθμιζόμενη έκφραση της p21 με χρώση των κυττάρων με διοξική 2,7-διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF), η οποία είναι ένας φθορίζον δείκτης της κυτταρικής οξειδωτικής παραγωγής. Επιπροσθέτως, θα μπορούσε να γίνει μέτρηση των επιπέδων της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης, η οποία αποτελεί δείκτη του οξειδωτικού στρες.¹⁰³

Επίσης, λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς Saos2 είναι μεσεγχυματικής προέλευσης και στηριζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες που συσχετίζουν την γήρανση με την αυτοφαγία σε ινοβλάστες σχετιζόμενους με τον καρκίνο (cancer-associated fibroblasts), θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της αυτοφαγίας (βρίσκεται στο αποκορύφωμά της τη 10^η μέρα) στην παρατηρούμενη διαφυγή γήρανσης στα κύτταρα Saos2-TetON p21. Σύμφωνα με μελέτη των Carrarelli et. al., (2012), η αυτοφαγία και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προκαλούν μια καταβολική κατάσταση στις ινοβλάστες που σχετίζονται με το καρκίνο, με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλής ενέργειας μιτοχονδριακών “καυσίμων” (όπως L-γαλακτικό, κετονοσώματα, γλουταμίνη και ελεύθερα λιπαρά οξέα). Αυτά τα καύσιμα στη συνέχεια, μεταφέρονται στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα για να ικανοποιήσουν τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις τους. Ενδεχομένως, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στα κύτταρα Saos2-TetON p21 που έχουν διαφύγει τη γήρανση, να προσδίδει σε αυτά ανάλογα μεταβολικά προϊόντα προκειμένου να ικανοποιηθούν οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις τους.¹⁰⁴

Επιπλέον, το γονίδιο p21, του οποίου η έκφραση ενεργοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, δρα ως ογκογονίδιο ύστερα από παρατεταμένη έκφραση και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αυτοφαγία μπορεί να συμβάλει στην καταστολή του όγκου ελέγχοντας τον φαινότυπο της γήρανσης. Ωστόσο, αν παρακαμφθεί η γήρανση τότε δρα ενισχυτικά για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο,

θεωρείται σημαντικό να διερευνηθούν μελλοντικά τα βιοχημικά μονοπάτια, μέσα από τα οποία η αυτοφαγία συμβάλλει στην ενίσχυση της επιβίωσης του υποπληθυσμού των κυττάρων Saos2-TetON p21.

5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 2: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Doxycycline	Δοξυκυκλίνη
Escaped	«Κύτταρα που έχουν διαφύγει της γήρανσης»
Ageing	Γήρανση
Loss-of-function	«ελαττωματική» λειτουργικότητα
Gain-of-function	«επικερδής» λειτουργικότητα
Cellular senescence	Κυτταρική γήρανση
Stasis	Στάση
γ-foci	«Εστίες βλάβης του DNA»
Negative feedback	Αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση
Base excision repair	Επιδιόρθωση εκτομής βάσεων
Cyclin-dependent kinase inhibitors	Αναστολείς κινάσης εξαρτώμενης από κυκλίνη
Cyclin-dependent kinases	Κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη
Chromosomal instability	Χρωμοσωμική αστάθεια
DNA Damage Response	Απόκριση σε βλάβη του DNA
Epithelial-mesenchymal transition	Επιθηλιομεσεγγυματική μετάβαση
Double-strand breaks	Δικλωνικές θραύσεις
E26 transformation-specific	E26 ειδικών στο μετασχηματισμό
Granulocyte-macrophage colony stimulating factor	Παράγοντας διεγέρσεως αποικιών κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων
Growth-regulated oncogene	Ογκογονίδιο ρυθμιζόμενο από την ανάπτυξη

Human dermal fibroblasts	Ανθρώπινες διπλοειδείς ινοβλάστες
Inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins	Πρωτεΐνες αναστολείς της δέσμευσης/διαφοροποίησης DNA
Insulin-like growth factor-binding Protein 7	Δεσμευτική πρωτεΐνη ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 7
Mortality phase	Φάση θνησιμότητας
Mitogen-activated protein kinase	Πρωτεϊνική κινάση που επάγεται από μιτογόνο
Methyl-accepting chemotaxis protein	Πρωτεΐνες χημειοελκτικών μονοκυττάρων
Macrophage inflammatory proteins	Φλεγμονώδεις πρωτεΐνες μακροφάγων
Matrix metalloproteinase	Μεταλλοπρωτεΐνάση μήτρας
Mitochondrial DNA	Μιτοχονδριακό DNA
Micronuclei	Μικροπυρήνες
Membrane-bound	Δεσμευμένα σε μεμβράνη
Plasminogen activator inhibitor-1	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1
Proliferating cell nuclear antigen	Πολλαπλασιαστικό πυρηνικό αντιγόνο
Phosphatase and tensin homolog	Ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης
Retinoblastoma	Ρετινοβλάστωμα
Replication Licensing Factors	Αδειοδοτικοί παράγοντες της αντιγραφής του DNA
Replication origins	Σημεία εκκίνησης της αντιγραφής
Senescence associated heterochromatin foci	Εστίες ετεροχρωματίνης σχετιζόμενες με τη γήρανση

Senescence-associated secretory phenotype	Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση
Senescence-associated β-galactosidase	Σχετιζόμενη με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάση
Stress induced premature senescence	Επαγόμενη από στρες πρόωρη γήρανση
S-phase kinase-associated protein 2	Πρωτεΐνη 2 που σχετίζεται με κινάση της φάσης S
Transmission electron microscope	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης
Transforming Growth Factor B	Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β
Telomere reverse transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης
Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
Intercellular canaliculi	Διακυτταρικά κανάλια
Microvesicles	Μικροκυστίδια
Multilamellar bodies	Πολυμεμβρανικά σωματίδια
Autophagic vacuoles AV-I	Πρώιμα αυτοφαγικά κενοτόπια
Multilobular nuclei	Πολύλοβοι πυρήνες
Aliquots	Κλάσματα
Reactive oxygen species	Ενεργές ρίζες οξυγόνου

6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 3: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
BER	Base Excision Repair
CDKIs	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors
CDKs	Cyclin-Dependent Kinases
CIN	Chromosomal Instability
DDR	DNA Damage Response
Dox	Doxycycline
DSBs	Double-Strand Breaks
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ETS	E26 Transformation-Specific
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GRO	Growth-Regulated Oncogene
HDAi	Histone Deacetylase Chemical Inhibition
HDFs	Human Dermal Fibroblasts
HLH	Helix-Loop-Helix
ID	Inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins
IGFBP7	Insulin-like Growth Factor–Binding Protein 7
M0	Mortality phase 0

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCPs	Methyl-accepting Chemotaxis Protein
MIPs	Macrophage Inflammatory Proteins
MMP	Matrix Metalloproteinase
mtDNA	Mitochondrial DNA
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Rb	Retinoblastoma
RLFs	Replication Licensing Factors
ROS	Reactive Oxygen Species
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype
SA- β gal	Senescence-Associated β -galactosidase
SAHFs	Senescence Associated Heterochromatin Foci
SFRP1	Secreted Frizzled Related Protein 1
SIPS	Stress Induced Premature Senescence
SKP2	S-phase Kinase-associated Protein 2
TEM	Transmission Electron Microscope
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

TGF	Transforming Growth Factor B
MV	Microvesicles
Saos-2	Sarcoma osteogenic-2
WNT	Wingless-type

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

A. Ρυθμιστικά διαλύματα

Φωσφορικό διάλυμα (PB) 0.2M, pH 7.4

Διάλυμα A: Μονόξινο φωσφορικό νάτριο	(Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	12.78g
Απεσταγμένο νερό	(dH ₂ O)	450mL
Διάλυμα B: Δισόξινο φωσφορικό νάτριο	(NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	10.80g
Απεσταγμένο νερό	(dH ₂ O)	450mL

Η ρύθμιση του pH γίνεται με πρόσθεση του διαλύματος B στο διάλυμα A.

Στα 500mL του τελικού διαλύματος προστίθενται:

Χλωριούχο μαγνήσιο	(MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0.403g
Χλωριούχο κάλιο	(KCl)	0.37g

Αλατούχο φωσφορικό διάλυμα (PBS) 0.01M, pH 7.4

Δισόξινο φωσφορικό νάτριο	(NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.39g
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο	(Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1.07g
Χλωριούχο νάτριο	(NaCl)	8.5g
Απεσταγμένο νερό	(dH ₂ O)	1000mL

PBS

1 ταμπλέτα σε 500mL dH₂O, και ακολουθεί αποστείρωση.

B. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Καλλιεργητικό μέσο

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (high glucose)	445 mL
10% FBS-Tet free	50mL
Penicillin/Streptomycin	5mL

Θρυψίνη (0.05% σε PBS)

5ml trypsin 0.5% (από το stock) + 45mL PBS αποστειρωμένο

Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 1 εβδομάδα, διατηρείται το διάλυμα στους 4°C, αλλιώς στους -20°C και αποψύχεται πριν τη χρήση.

Doxycyclin hyclate

Μητρικό διάλυμα:

Παρασκευή ποσότητας με συγκέντρωση **5mg/mL** σε ενέσιμο νερό. Μετά διήθηση με φίλτρο 0,22μm.

Φύλαξη στους 4°C σε erpendorf καλυμμένο με αλουμινόχαρτο (η Dox είναι φωτοευαίσθητη). Η ενεργότητα της Dox κρατάει για 2 εβδομάδες. Η προσθήκη της Dox στα τρυβλία γίνεται με κλειστό το φως του απαγωγού.

- ✓ Αραίωση στο τρυβλίο σε συγκέντρωση: **5μg/mL** του τελικού καλλιεργητικού μέσου.
- ✓ Για να είναι ενεργοποιημένο το σύστημα, η Dox προστίθεται 1 φορά κάθε 48 ώρες, περίπου την ίδια ώρα.
- ✓ Μετά την προσθήκη της Dox και, μετά από 6 ώρες αρχίζει η έκφραση του γονιδίου, ενώ μετά από 12 ώρες το γονίδιο βρίσκεται στη μέγιστη έκφραση και στη συνέχεια, ο ρυθμός γίνεται βραδύτερος.

Γ. Άλλα Υλικά κυτταροκαλλιεργειών

Για την πραγματοποίηση των καλλιεργειών, εκτός από τα μηχανήματα που αναφέρθηκαν (Κεφάλαιο 2), χρησιμοποιήθηκαν αρκετά υλικά τα οποία είναι αποστειρωμένα και αναφέρονται παρακάτω:

- Ποδονάρια
- Γάντια
- Χειρουργικές μάσκες
- Γάζες
- Διάλυμα αιθανόλης 70%
- Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 mL, 10 mL, 25 mL και 50 mL (Corning, 4101)
- Πιπέτα Gilson όπου εφαρμόζονται οι πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης
- Σωλήνες Falcon των 15mL και των 50mL

- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 35mm (Corning, 430165)
- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 100mm (Greiner, 664160)
- ACLAR Embedding Film (EMS)
- Μηχανική πιπέτα 1000μL, 200μL και 10μL
- Αποστειρωμένα tips με φίλτρο για την μηχανική πιπέτα
- Σωλήνες Eppendorf του 1,5 mL (Greiner)
- Σωλήνες Eppendorf του 0,5 mL (Greiner)
- Φυγόκεντρος Eppendorf (miniSpin, Eppendorf)
- Ξύστρες κυττάρων (scraper)
- Parafilm

Δ. Αναλώσιμα για καλλιέργεια Saos p21 Tet-On:

Penicillin/Streptomycin (5,000 U/mL)

Κωδικός: 15070-063, Gibco

Φυλάσσεται στην κατάψυξη. Μετά την πρώτη απόψυξη, παρασκευάζονται κλάσματα (aliquots) των 5mL και διατηρούνται στην κατάψυξη.

0.5% Trypsin-EDTA (10x)

Κωδικός: 15400-054, Gibco

Φυλάσσεται στην κατάψυξη. Μετά την πρώτη απόψυξη, παρασκευάζονται κλάσματα των 5mL και διατηρούνται στην κατάψυξη.

DMEM, high glucose, pyruvate (1x)

Κωδικός: 41966-029 Gibco

FBS-Tet free (500mL)

Κωδικός: 631101, Clontech (Lab Supplies)

Doxycycline hyclate

Κωδικός: D9891-1G, Sigma

Ε. Υλικά έγκλεισης σε μίγμα εποξικών ρητινών Epon/Araldite

- αιθυλική αλκοόλη άνυδρη (#10107, BDH, UK)
- δισαππεσταγμένο νερό (dH₂O)
- τετροξειδίο του οσμίου (OsO₄) (#0223A-5, Polysciences, USA)
- οξειδίο του προπυλενίου (propylene oxide) (#82065, Ferak, Germany)
- Araldite CY212 (#13824, Serva, Germany)
- γλυκιδυλαιθέρας 100 (#21045, Serva, Germany)
- DDSA (2-Dodecenylsuccinic acid anhydride) (#20755, Serva, Germany)
- φθαλικός διβουτυλεστέρας (#32805, Serva, Germany)
- DMP-30 [2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol] (#36975, Serva, Germany)
- γυάλινα φιαλίδια των 5ml (Rollrand-Schnappdeckel, Germany)
- επίπεδα ελαστικά εκμαγεία (#02615, Polysciences, USA)
- βελόνα ανατομίας
- κλίβανος στους 60°C
- μηχανήμα περιστροφής φιαλιδίων (Snijders, Germany)

Πίνακας 4: Παρασκευή μίγματος ρητινών: Σε καθαρό και στεγνό ποτήρι ζέσεως ζυγίζουμε τα τέσσερα πρώτα συστατικά και στη συνέχεια αναδεύουμε ήπια με γυάλινη ράβδο μέχρι το μίγμα να γίνει ομοιόμορφο. Στο τέλος προσθέτουμε την ποσότητα του επιταχυντή DMP-30 και αναδεύουμε πολύ καλά με τη γυάλινη ράβδο. Το μίγμα των εποξικών ρητινών φυλάγεται σε σύριγγες, από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί τυχόν φυσαλίδες αέρος, στους -30°C για τρεις μήνες περίπου.

Ρητίνες	Ποσότητα
Glycid ether 100	15.12 g
Araldite CY212	8.70 g
DDSA	26.34 g
Dibutyl phthalate (πλαστικοποιητής)	1 mL
DMP-30 (επιταχυντής)	37 σταγόνες

Z. 7.5% αλκοολικό διάλυμα οξικού ουρανυλίου (#2760078, Merck)

0.375g οξικού ουρανυλίου διαλύονται σε 5mL απεσταγμένου νερού για 20-30min περίπου, έχοντας το ποτήρι ζέσεως καλυμμένο με αλουμινόχαρτο. Στην συνέχεια, στο διάλυμα προστίθενται 2.5mL απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σύριγγα, καλυμμένη με αλουμινόχαρτο, σε RT για μία εβδομάδα περίπου. Πριν τη χρήση του διηθείται με φίλτρο με μέγεθος πόρου 0.2μm.

0,4% υδατικό διάλυμα κιτρικού μολύβδου (#81753, Ferak)

0.04g κιτρικού μολύβδου προστίθενται σε 10mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα γίνεται διαυγές με προσθήκη, κατά την ανάδευσή του, λίγων σταγόνων 10N NaOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σύριγγα στους 4°C, για δύο εβδομάδες περίπου. Πριν τη χρήση του διηθείται με φίλτρο με μέγεθος πόρου 0.2μm.

H. Εμφάνιση αρνητικού φιλμ ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

- Φιλμ Agfa Correx Pan AHU Tri13 (35mm) (#H6C2N, Belgium)
- Εμφανιστής D-19 (#5027065, Kodak, USA)
- Στερεωτής του φιλμ Sodium Fixer (#5221338, Kodak, USA)
- Απορρυπαντικό Photo-flo (#1464528, Kodak, USA)
- Κόκκινο φίλτρο λάμπας φωτισμού Safelight filter No1 (#1521509, Kodak, USA)
- Κίτρινο φίλτρο λάμπας φωτισμού Safelight filter OC (#1521483, Kodak, USA)
- Σάρωση των φιλμ με σαρωτή Scan Maker 9800 XL της Microtek σε ανάλυση 800 ppi.

Θ. Υλικά ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

- Χλωροφόρμιο (#100776B, BDH)
- Παστίλιες καυστικού νατρίου (NaOH) (#01147, Ferak)
- Ακετόνη
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- τρυβλία Petri
- Πλέγματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (grids)

- Χαρτί χωρίς ίνες για grids
- Χαρτί Whatman
- Διηθητικό χαρτί
- Κουτί αποθήκευσης πλεγμάτων HM (grid box)
- Βελόνα ανατομίας

I. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΚΩΔΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΑΣ

Αντιδραστήριο	Κωδικός παραγγελίας	Εταιρεία
Υδροξείδιο του Νατρίου	1.06498	Merck, Germany
Βορικό νάτριο	7460	Mallinckrodt Chemical Works, USA
Παραφορμαλδεΰδη	31628	Serva, Germany
Γλουταραλδεΰδη	23115	Serva, Germany
Τετροξείδιο του οσμίου	0223A-5	Polyscience, USA
Ακετόνη	1.00014.2511	Merck, Germany
Αιθυλική αλκοόλη απόλυτη	10107	BDH, UK
Χλωροφόρμιο	100776B	BDH, UK
Αναλώσιμα		
Grid box	03606	Polyscience, USA

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Μαργαρίτης, και συν. Κυτταρική γήρανση, Βιολογία κυττάρου, Αθήνα Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Τέταρτη έκδοση (2008).
2. Bowen, R. L. & Atwood, C. S. Living and Dying for Sex. *Gerontology* **50**, 265–290 (2004).
3. Weber, Georg F., Cellular Senescence, Molecular Mechanisms of Cancer Springer, 194–202 (2007).
4. Daniel, B. & Veterinaerplatz, V. V. The Evolution of Aging Aging is an Evolutionary Paradox The Force of Selection Declines with Age. *Knowl. Creat. Diffus. Util.* 1–7 (2011).
5. Fabian, D. & Flatt, T. The Evolution of Aging. *Nature Education Knowledge* 3(10):9(2011).
6. Kirkwood, T. B. & Austad, S. N. Why do we age? *Nature* **408**, 233–238 (2000).
7. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual review of physiology*;75:685-705 (2013).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
9. Balducci, L. & Ershler, W. B. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 655–662 (2005).
10. Campisi, J. & d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***8**, 729–740 (2007).
11. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
12. Blagosklonny, M. V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep.***4**, 358–362 (2003).
13. Mathon, N. F. & Lloyd, A. C. Milestones in Cell Division Cell Senescence and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 203–213 (2001).
14. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.***22**, 4212–4222 (2003).
15. Hwang, E. S., Yoon, G. & Kang, H. T. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell. Mol. Life Sci.***66**, 2503–24 (2009).

16. Augert, A. & Bernar, D. Immunosenescence and Senescence Immunosurveillance: One of the Possible Links Explaining the Cancer . Incidence in Ageing Population. *Senescence and Senescence-Related Disord.* 158 (2013)
17. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.***24**, 2463–2479 (2010).
18. Ziegler, D. V., Wiley, C. D. & Velarde, M. C. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell* **14**, 1–7 (2015).
19. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 277–288 (2002).
20. Vicencio, J. M. *et al.* Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology* **54**, 92–99 (2008).
21. Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716 (2003).
22. Sherr, C. J. & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103–112 (2002).
23. Kuilman, T. & Peeper, D. S. SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* **9**(2):81-94. (2009).
24. Campisi, J., Andersena, J., Kapahia, P., and Melova S., Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol.* 21(6): 354–359 (2011)
25. Coppé Jean-Philippe, Pierre-Yves Desprez, Ana Krtolica, and J. C. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol.* 99–118 (2010).
26. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, a B., Greider, C. W. & Harley, C. B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.***225**, 951–960 (1992).
27. Cheung, A. L. M. & Deng, W. Department of Anatomy, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China. *In Vivo (Brooklyn).* 2075–2090 (2008).
28. Collins, K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr. Opin. Cell Biol.***12**, 378–383 (2000).
29. Cong, Y., Wright, W. E. & Shay, J. W. Human Telomerase and Its Regulation Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.***66**, 407 (2002).

30. Rodier, F., Kim, S.-H., Nijjar, T., Yaswen, P. & Campisi, J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *Int. J. Biochem Cell Biol.* **37**, 977–990 (2005).
31. Nakamura, A. J. *et al.* Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* **1**, 6 (2008).
32. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P. & Georgakilas, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* **711**, 193–201 (2011).
33. Correia-Melo, C., Hewitt, G. & Passos, J. F. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longev. Heal.* **3**, 1 (2014).
34. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).
35. Woo, R. A. & Poon, R. Y. C. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev.* **18**, 1317–30 (2004).
36. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–48 (2011).
37. Toledo, L. I., Murga, M., Gutierrez-Martinez, P., Soria, R. & Fernandez-Capetillo, O. ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes Dev.* **22**, 297–302 (2008).
38. de Jesus, B. B. & Blasco, M. a. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ. Res.* **111**, 97–109 (2012).
39. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367 (1995).
40. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–95 (2006).
41. Georgakopoulou, E. a. *et al.* 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 (2013).
42. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307 (2004).

43. Campisi, J., Andersen, J. K., Kapahi, P. & Melov, S. Seminars in Cancer Biology Cellular senescence : A link between cancer and age-related degenerative disease ? *Semin. Cancer Biol.* **21**, 354–359 (2011).
44. Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J. & Beauséjour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* **281**, 29568–29574 (2006).
45. Laberge, R., Awad, P., Campisi, J. & Desprez, P. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. 39–44 (2012).
46. Freund, A., Orjalo, A. V, Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* **16**, 238–46 (2010).
47. Hara, E. Cellular senescence as a tumor suppressor mechanism. *Biotherapy* **18**, 189–195 (2004).
48. Smith, G. H. & Boulanger, C. A. Mammary epithelial stem cells: transplantation and self-renewal analysis. *Cell Prolif.* **36**, 3–15 (2003).
49. Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M. & Green, M. R. Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363–374 (2008).
50. Yang, G. *et al.* The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16472–7 (2006).
51. Kortlever, R. M., Higgins, P. J. & Bernards, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat. Cell Biol.* **8**, 877–884 (2006).
52. Brown, J. P. Bypass of Senescence After Disruption of p21CIP1/WAF1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. *Science (80-)*. **277**, 831–834 (1997).
53. Shay, J. W., Wright, W. E. & Werbin, H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 1–7 (1991).
54. Poirier, M. G., Eroglu, S. & Marko, J. F. The bending rigidity of mitotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2170–2179 (2002).
55. Flombaum, J. & Santos, L. Rhesus monkeys attribute perceptions to others. *Curr. Biol.* **15**, 447–452 (2005).
56. Bringold, F. & Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp. Gerontol.* **35**, 317–329 (2000).
57. Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067–1070 (2001).

58. Hara, E. *et al.* Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.***269**, 2139–2145 (1994).
59. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.***13**, 1501–1512 (1999).
60. Zhang, J., Pickering, C. R., Holst, C. R., Gauthier, M. L. & Tlsty, T. D. p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res.***66**, 10325–10331 (2006).
61. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***11**, 220–228 (2010).
62. Halazonetis, T., Gorgoulis, V. & Bartek, J. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* **319**, 1352 –1355 (2008).
63. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. Jun; 9(6):400-14(2009).
64. Bartek, J. & Lukas, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.***19**, 238–245 (2007).
65. Nakanishi, M., Shimada, M. & Niida, H. Genetic instability in cancer cells by impaired cell cycle checkpoints. *Cancer Sci.* **97(10):984-9** (2006).
66. Eastman, A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J. Cell. Biochem.***91**, 223–31 (2004).
67. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Leder, P. Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675–684 (1995).
68. Brugarolas, J. *et al.* Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**, 552–557 (1995).
69. Roninson, I. B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.***179**, 1–14 (2002).
70. Iii, A. B. N. *et al.* Effects of p21 Cip1/Waf1 at Both the G1/S and the G2/M Cell Cycle Transitions : pRb Is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication. *Mol. Cell Biol.* **18**, 629–643 (1998)
71. Zhu, W., Abbas, T. & Dutta, A. Dna Replication and Genomic Instability. *Genome Instab. Cancer Dev.* 249–279 (2005).
72. Besson, A., Dowdy, S. F. & Roberts, J. M. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev. Cell* **14**, 159–169 (2008).

73. Tetsu, O. & McCormick, F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* **3**, 233–245 (2003).
74. Martín, A. *et al.* Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27Kip1 and p21Cip1. *Cancer Cell* **7**, 591–598 (2005).
75. Child, E. S. & Mann, D. J. The intricacies of p21 phosphorylation: Protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* **5**, 1313–1319 (2006).
76. Bornstein, G. *et al.* Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J. Biol. Chem.* **278**, 25752–7 (2003).
77. Brady, C. A. *et al.* Distinct p53 Transcriptional Programs Dictate Acute DNA-Damage Responses and Tumor Suppression. *Cell* **145**, 571–583
78. Barboza, J. a, Liu, G., Ju, Z., El-Naggar, A. K. & Lozano, G. P21 Delays Tumor Onset By Preservation of Chromosomal Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19842–7 (2006).
79. Efeyan, a, Collado, M., Velasco-Miguel, S. & Serrano, M. Genetic dissection of the role of p21Cip1/Waf1 in p53-mediated tumour suppression. *Oncogene* **26**, 1645–9 (2007).
80. Shen, K. C. ATM and p21 Cooperate to Suppress Aneuploidy and Subsequent Tumor Development. *Cancer Res.* **65**, 8747–8753 (2005).
81. Edmonston, T. B. *et al.* Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum. Pathol.* **31**, 1506–14 (2000).
82. Lever, E. & Sheer, D. The role of nuclear organization in cancer. *J. Pathol.* **220**, 114–125 (2010).
83. Bates, S., Ryan, K., Phillips, A. & Vousden, K. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21 Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* **1**, (1998).
84. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5547–5551 (1992).
85. Lontos, M. *et al.* Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior. *Cancer Res.* **67**, 10899–10909 (2007).
86. Velimezi, G. *et al.* Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer. *Nat. Cell Biol.* **15**, 967–977 (2013).

87. Karakaidos, P. *et al.* Overexpression of the Replication Licensing Regulators hCdt1 and hCdc6 Characterizes a Subset of Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Am. J. Pathol.* **165**, 1351–1365 (2004).
88. Kroemer, G. Mitochondria in cancer. *Oncogene* **25**, 4630–4632 (2006).
89. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
90. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **21**, 2861–2873 (2007).
91. Fevrier, B. & Raposo, G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 415–421 (2004).
92. Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. & Di Vizio, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 41–51 (2015)
93. Hariri, M. *et al.* Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol. Biol. Cell* **11**, 255–268 (2000).
94. Cerella, C., Grandjenette, C., Dicato, M., Diederich, M., Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr Drug Targets*; **17**(4):405-15 (2016)
95. Ros, S. & Schulze, A. Linking glycogen and senescence in cancer cells. *Cell Metab.* **16**, 687–688 (2012).
96. Biran, A. *et al.* Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes Dev.* **29**, 791–802 (2015).
97. Grasso, D. & Vaccaro, M. I. Macroautophagy and the oncogene-induced senescence. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 1–7 (2014).
98. Wiley, C. D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype Article Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 1–12 (2016).
99. Nelson, D. L. Lehninger principles of biochemistry. *Princ. Biochem.* **5** (2013).
100. Vander Heiden, M., Cantley, L. & Thompson, C. Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
101. Alberts, B., *et al.* Molecular Biology of the Cell., New York, Garland Science, 4th edition (2002).
102. Bertoni-Freddari, C. *et al.* Inverse correlation between mitochondrial size and metabolic competence: a quantitative cytochemical study of cytochrome oxidase activity. *Naturwissenschaften* **90**, 68–71 (2003).

103. Macip, S. *et al.* Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* **21**, 2180–2188 (2002).
104. Capparelli, C. *et al.* Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis, via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle* **11**, 2285–2302 (2012).