



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

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία”

**Η υπερμικροσκοπική μελέτη των κυττάρων Li-
Fraumeni σε διάφορα χρονικά διαστήματα
επαγωγής του $p21^{WAF1/CIP1}$**

Αντωνίου Νικόλαος

AM: 20160395

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Κουτσιλιέρης Μιχάλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Αθηνών, Διευθυντής Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας

Χαβάκη Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Αθηνών, Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας (Επιβλέπουσα)

Πατέρας Ιωάννης, Παθολογοανατόμος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

ΑΘΗΝΑ, 2018








ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ιπποκρατικός Όρκος	σελ 6
Ευχαριστίες	σελ 7
Περίληψη	σελ 8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ 12
1.1 Καρκίνος	σελ 13
1.1.1 Ορισμός-Φύση του καρκίνου	σελ 14
1.1.2 Διάκριση των όγκων σε καλοήθεις και κακοήθεις	σελ 15
1.1.3 Διάκριση των καρκινικών όγκων με βάση την εμβρυική προέλευση και την ιστολογία	σελ 16
1.1.4 Σταδιοποίηση και διαφοροποίηση των όγκων	σελ 18
1.1.5 Καρκινογένεση	σελ 18
1.1.6 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης	σελ 22
1.1.7 Βιολογικά χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων	σελ 27
1.2 Κυτταρικός Κύκλος	σελ 28
1.2.1 Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου και σημεία ελέγχου	σελ 29
1.2.2 Κυκλίνες και ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	σελ 30
1.2.3 Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, αναστολείς και ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	σελ 33
1.2.4 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από ογκοκατασταλτικά γονίδια	σελ 33
1.3 Εισαγωγή στη γήρανση	σελ 35
1.3.1 Κυτταρική γήρανση	σελ 37
1.3.2 Τα είδη της κυτταρικής γήρανσης	σελ 40
1.3.2.1 Αντιγραφική γήρανση (Replicative senescence)	σελ 41
1.3.3 Εξελικτικές θεωρίες περί γήρανσης	σελ 44

1.3.4 Φαινοτυπικά γνωρίσματα των κυττάρων σε γήρανση	σελ 45
1.3.5 Χαρακτηριστικά λειτουργίας των γηρασμένων κυττάρων	σελ 47
1.3.5.1 Αναστολή της ανάπτυξης	σελ 47
1.3.5.2 Αντίσταση στην απόπτωση	σελ 48
1.3.5.3 Αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση	σελ 49
1.3.5.4 Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση, SASP	σελ 50
1.3.6 Αιτίες κυτταρικής γήρανσης	σελ 51
1.3.6.1 Μείωση του μήκους των τελομερών	σελ 51
1.3.6.2 Γενωμική βλάβη	σελ 53
1.3.6.3 Διαταραχή της χρωματίνης – Επιγενωμική βλάβη	σελ 55
1.3.6.4 Κυτταρική γήρανση προκαλούμενη από ογκογονίδια (OIS)	σελ 57
1.3.7 Δείκτες γήρανσης	σελ 59
1.3.8 Σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης	σελ 62
1.3.9 Κυτταρική γήρανση και Καρκίνος	σελ 64
1.3.9.1 Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην ογκογένεση	σελ 65
1.3.9.2 Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην ογκοκαταστολή	σελ 67
1.4 Σύνδρομο Li-Fraumeni	σελ 69
1.4.1 Η γενετική αιτιολογία του συνδρόμου Li-Fraumeni	σελ 70
1.4.2 Φάσμα μεταλλάξεων TP53, τύπος και συχνότητα	σελ 70
1.4.3 LFS-συνδεδεμένη Καρκινογένεση	σελ 74
1.5 Γενωμική αστάθεια	σελ 76
1.5.1 Τα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια	σελ 78
1.5.2 Μοντέλο αντιγραφικού στρες του DNA επαγόμενο από ογκογονίδιο	σελ 78
1.5.3 Η πρωτεΐνη p21	σελ 79
1.5.4 Επιδράσεις της p21 τόσο στην μετάβαση G1/S όσο και στην G2/M του κυτταρικού κύκλου	σελ 82

1.5.5 Η πρωτεΐνη p21 ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό κύκλο	σελ 82
1.5.6 Η φωσφορυλίωση της p21	σελ 83
1.5.7 Απορρύθμιση της p21 στον καρκίνο	σελ 84
1.5.8 Διπλός ρόλος της πρωτεΐνης p21 στην καρκινογένεση	σελ 85
1.6 Σκοπός εργασίας	σελ 89
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ 90
2.1 Κυτταροκαλλιέργειες	σελ 91
2.1.1 Συλλογή υλικού	σελ 92
2.2 Το σύστημα Tet-ON	σελ 92
2.2.1 Οφέλη από τα tet επαγωγίμα συστήματα	σελ 95
2.2.2 Μειονεκτήματα των tet επαγωγίμων συστημάτων	σελ 95
2.3 Η κυτταρική σειρά MDAH-041	σελ 95
2.4 Χώρος καλλιιεργειών	σελ 97
2.4.1 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	σελ 100
2.4.2 Αναλώσιμα για καλλιιεργεια Li-Fraumeni p21 Tet-On	σελ 101
2.5 <i>In Vitro</i> τεχνικές	σελ 102
2.5.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από κύτταρα	σελ 102
2.5.2 Στύπωμα Western ή Ανοσοαποτύπωση (Western Blot ή Immunoblot)	σελ 102
2.5.2.1 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου	σελ 103
2.5.2.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF	σελ 103
2.5.2.3 Επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα	σελ 103
2.5.2.4 Εμφάνιση της μεμβράνης με χημειοφωταύγεια	σελ 103
2.5.2.5 Πρωτογενή αντισώματα	σελ 105

2.6 <i>In Situ</i> τεχνικές	σελ 105
2.6.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IF) σε κύτταρα	σελ 105
2.6.2 Ιστοχημική χρώση με τη χημική ένωση GL13 για την ανίχνευση κυτταρικής γήρανσης	σελ 106
2.6.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	σελ 107
2.6.3.1 Υλικά ηλεκτρονικής μικροσκοπίας	σελ 108
2.6.3.2 Πειραματικός σχεδιασμός για ηλεκτρονική μικροσκοπία	σελ 108
2.6.3.3 Ανακαλλιέργεια (splitting)	σελ 109
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ 116
3.1 Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 ύστερα από ενεργοποίηση του επαγωγίμου συστήματος TetONp21 σε ινοβλάστες Li-Fraumeni	σελ 117
3.2 Παρατήρηση σε πεδίο αντίθεσης φάσης της μορφολογίας των κυττάρων Li-Fraumeni TetON p21	σελ 119
3.3 Ανίχνευση κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα Li-Fraumeni ON 6days με τη χημική ένωση GL13	σελ 124
3.4 Παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης της υπερμικροσκοπικής δομής των κυττάρων Li-Fraumeni TetON p21	σελ 125
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ 141
Συζήτηση	σελ 142
Συμπεράσματα	σελ 148
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ 149
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	σελ 167
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: Σύγκριση της έκφρασης της κυκλίνης E ανάμεσα σε Li-Fraumeni OFF και ON 6days	σελ 171

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα ευχαριστώ από καρδιάς στην Επίκουρη Καθηγήτρια Σοφία Χαβάκη, υπεύθυνη της μεταπτυχιακής μου εργασίας, που όλο αυτό το διάστημα με το μοναδικό μεράκι και πάθος για τη δουλειά της, μου προσέφερε γνώση, βοήθεια, ένα άψογο περιβάλλον εργασίας και ευκαιρία να ασχοληθώ με τον “κόσμο” της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που πραγματικά παρουσιάζει ένα εξαιρετικό ενδιαφέρον . Ελπίζω και εύχομαι να συνεχίσει να προσφέρει με τον ίδιο ρυθμό στο Τμήμα Ιατρικής, καθώς και να δίνει γνώση και ευκαιρίες και σε επόμενους φοιτητές.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Πειραματικής Φυσιολογίας κ. Μιχάλη Κουτσιλιέρη τόσο για την τιμή που μου έκανε να είναι μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής όσο και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ενταχθώ στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα που βρίσκεται υπό τη δική του διεύθυνση και να αποκομίσω μέσα από αυτό πολλές και χρήσιμες γνώσεις για την μελλοντική μου επιστημονική διαδρομή.

Ένα επίσης μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κ. Ιωάννη Πατέρα για τη τιμή να είναι στη Συμβουλευτική Επιτροπή, καθώς και για τις συμβουλές του όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον Καθηγητή κ. Βασίλη Γοργούλη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής, ο οποίος συνέβαλε ουσιαστικά στην εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Εκτός του ότι παρείχε το χώρο στον οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, μου έδωσε τη δυνατότητα να βάλω και εγώ το “λιθαράκι” μου σε ένα ευρύτερο project του οποίου είναι και ο εμπνευστής και στο οποίο ανήκει η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφερθώ σε όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας “Μοριακής Καρκινογένεσης “ του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας , τα οποία με στήριξαν σε αυτό το ταξίδι και έκαναν την κάθε μου μέρα στο εργαστήριο ξεχωριστή.

Μεγάλο ευχαριστώ στην Dr. Ισμήνη Κλουκίνα και την Καθηγήτρια κ. Γ. Καπετανάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών για την άδεια χρήσης του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης χωρίς το οποίο δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Πάνω από όλα όμως θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στην αδερφή μου. Σε αυτούς τους ανθρώπους που με στήριξαν και μου έδωσαν την ευκαιρία και την

ελευθερία να προσπαθώ να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα. Για αυτό και αφιερώνω την εργασία αυτή σε εκείνους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μελέτης της επαγώγιμης έκφρασης του γονιδίου p21^{CIP1/WAF1} (p21 χάριν συντομίας) σε κύτταρα MDAH041 (ινοβλάστες από δέρμα ασθενούς με το σύνδρομο Li-Fraumeni) προς περαιτέρω διερεύνηση προηγούμενων παρατηρήσεων του εργαστήριού μας. Στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου TP53 λείπει τελείως ενώ το άλλο φέρει μια μετάλλαξη που τροποποιεί το πλαίσιο ανάγνωσης με αποτέλεσμα να προκύπτει μια κολοβωμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 με τελείως διαφορετική στερεοδιάταξη. Το επαγώγιμο κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Li-Fraumeni-TetON p21 στο οποίο η μεταγραφή ενεργοποιείται αντιστρεπτά παρουσία του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (doxycycline).

Ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDK1 και CDK2, p21 εκδηλώνει αντι-πολλαπλασιαστικές δραστηριότητες μέσω p53-εξαρτώμενης και p53-ανεξάρτητης οδού. Ωστόσο, η πρωτεΐνη p21 μπορεί επίσης να προωθήσει την ογκογένεση. Σε όγκους με μεταλλαγμένο pRb/p53 παρατηρήθηκε ένας αριθμός από μεγάλα καρκινικά κύτταρα που παραδόξως παρουσίαζαν κοινή έκφραση (συνεντόπιση) του p21 και του μιτωτικού δείκτη Kι67. Έγινε η υπόθεση ότι η παρατεταμένη έκφραση του p21 οδήγησε σε μια επιλεκτική διαδικασία που επιτρέπει στα κύτταρα αυτά να ανακτήσουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Αυτό το βιολογικό παράδοξο μεταφέρθηκε αρχικά για μελέτη στο κυτταρικό σύστημα Saos2-TetON p21 και στη συνέχεια στο σύστημα Li-Fraumeni-TetON p21. Κατά την έκφραση του p21, τα κύτταρα απέκτησαν ένα φαινότυπο γήρανσης που κορυφώθηκε κατά τη 10^η ημέρα στα Saos2 και την 6^η ημέρα στα MDAH041 (σύνδρομο Li-Fraumeni). Περαιτέρω παρατεταμένη έκφραση και στις δύο κυτταρικές σειρές οδήγησε στην ανάδυση ενός υπο-πληθυσμού πολλαπλασιαζόμενων p21 θετικών κυττάρων (**κύτταρα “escaped”**) με πιο επιθετικό φαινότυπο από ότι προηγουμένως (Galanos, Vougas et al. 2016). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η υπερμικροσκοπική μελέτη των Li-Fraumeni σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα επαγώγιμης έκφρασης του p21 (0, 6 και 12 ημερών) καθώς η τελευταία οδηγεί τα κύτταρα αυτά σε φάση γήρανσης κατά την 6^η μέρα και σε διαφυγή από αυτήν κατά τη

12^η μέρα σύμφωνα με τους Galanos et al 2016. Για την υλοποίηση αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της κυτταροκαλλιέργειας και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Αρχικά πιστοποιήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης p21 κατόπιν επαγωγής με το αντιβιοτικό δοξυκυκλίνη, στον επιλεγμένο κλώνο των κυττάρων Li-Fraumeni που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού στην οποία ως control χρησιμοποιήθηκαν τα MDAH041 χωρίς την προθήκη της δοξυκυκλίνης (**Li-Fraumeni OFF**) και συγκρίθηκαν ως προς εκείνα ύστερα από την έναρξη της επαγωγής διάρκειας 6 και 12 ημερών (**Li-Fraumeni ON 6days και ON 12days** αντίστοιχα). Όντως διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της p21 τόσο στα κύτταρα με επαγωγή έκφρασης του γονιδίου για 6 ημέρες όσο και στα κύτταρα με διάρκεια μεταγραφικής ενεργοποίησης του για 12 ημέρες (**κύτταρα “escaped”**) σε σχέση με τα Li-Fraumeni OFF όπου δεν υπήρξε καθόλου έκφραση (Ενότητα 3.1).

Μετά από μια αρχική παρατήρηση των κυττάρων στις τρεις διαφορετικές βιολογικές καταστάσεις σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης διαπιστώθηκε μια αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων Li-Fraumeni ON 6days, τα οποία φαίνεται να είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος, να έχουν μεγαλύτερη αναλογία κυτταροπλάσματος και πυρήνα, με ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους και να έχουν ένα αρκετά κοκκιώδες κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα κύτταρα OFF τα οποία παρουσιάζονται να είναι πιο ατρακτοειδή και επιμήκη, μερικά με πιο πεπλατυσμένο σχήμα, να έχουν λιγότερο ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους και να είναι πιο μικρά σε μέγεθος (Ενότητα 3.2). Στην πλειοψηφία των κυττάρων Li-Fraumeni ON 6days ταυτοποιήθηκε γηρασμένος φαινότυπος με την ανίχνευση σωματιδίων λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα μέσω της ανοσοϊστοχημικής χρώσης **GL13** (SenTraGor) ενώ παρόμοια εικόνα δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα OFF (Ενότητα 3.3). Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόκληση της γήρανσης οφείλεται αποκλειστικά στην υπέρ-έκφραση του p21 και είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του p53 το οποίο είναι μεταλλαγμένο και δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί τόσο με στύπωμα κατά Western όσο και με ανοσοφθορισμό στα μελετώμενα κύτταρα (Galanos, Vougas et al. 2016). Κατόπιν χορήγησης δοξυκυκλίνης για 12 μέρες η πλειοψηφία των κυττάρων “escaped” παρουσιάζονται μικρά σε μέγεθος και

ατρακτοειδή, με ένα πιο ευμεγέθη κυτταρικό σώμα, ευδιάκριτους πυρήνες και πολυάριθμους πυρηνίσκους (Ενότητα 3.2). Τα γηρασμένα κύτταρα είναι πολύ λιγότερα κατά τη 12^η μέρα υπερέκφρασης του p21 σε σχέση με την 6^η ημέρα όπου κυριαρχεί ο γηρασμένος φαινότυπος. Επίσης συνήθης εικόνα στο ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης μετά από 12 μέρες επαγωγίμης έκφρασης του p21 είναι ότι γύρω από γηρασμένα κύτταρα αναπτύσσονται άλλα με εντελώς διαφορετική μορφολογία τα οποία εκφράζουν το p21, επικοινωνούν μέσω αποφυάδων με τα γειτονικά γηρασμένα και έχουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν πιο πάνω (Κεφάλαιο 3.2).

Η υπερμικροσκοπική μελέτη των κυττάρων Li-Fraumeni σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης κατέδειξε τα εξής: **Τα κύτταρα OFF** είναι κυρίως ατρακτοειδούς μορφολογίας, φέρουν αρκετά κυστίδια στο κυτταρόπλασμα τους ενώ φαίνεται κάποια από αυτά να τα ενδοκυτταρώνουν μέσω λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών. Επιπλέον, στα πλαίσια της επικοινωνίας, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν σφαιρικές προσεκβολές του κυτταροπλάσματος οι οποίες εγκλείουν μικροκυστίδια και κάποιες από αυτές απελευθερώνονται στο διακυτταρικό χώρο, προοριζόμενες πιθανώς για γειτονικά κύτταρα. Περισσότερο σπάνια είναι η ύπαρξη αυτοφαγοσωμάτων ενώ ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η καθολική παρουσία ελαττωματικής μορφολογίας μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται επιμήκη με ανώμαλη διάταξη των ακρολοφιών τους (Ενότητα 3.4).

Από την άλλη πλευρά στα **Li-Fraumeni ON 6days** κυριαρχούν οι μεγάλοι και πολυλοβωτοί πυρήνες, το εκτεταμένο-δισταλμένο ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ περισσότερα είναι τα μιτοχόνδρια που έχουν απολέσει τις ακρολοφίες τους και είναι περισσότερο διογκωμένα και αποστρογγυλεμένα σε σχέση με εκείνα των κυττάρων OFF. Η αυτοφαγία είναι επίσης ιδιαίτερα έντονη καθώς παρατηρούνται σε πολλά κύτταρα αυτοφαγοσώματα ποικίλων σταδίων διαμόρφωσης ενώ η παρουσία της ενισχύεται και από τον αυξημένο αριθμό λυσοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα. Ο εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (**SASP**) είναι ένα ακόμη εμφανές χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους είτε μέσω λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών είτε μέσω διακυτταρικών γεφυρών στο σχηματισμό των οποίων πιθανόν μετέχουν μικροσωληνίσκοι (Ενότητα 3.4).

Τα κύτταρα “**escaped**” είναι πιο αποστρογγυλεμένα σε σχέση με τα ON 6days και χαρακτηρίζονται από πολυλοβωτούς πυρήνες με πολυάριθμους πυρηνίσκους. Παρατηρούνται λιγότερα αυτοφαγοσώματα σε σχέση με τα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης υποδεικνύοντας μειωμένη αυτοφαγική δραστηριότητα. Τα μιτοχόνδριά τους είναι σφαιρικά στην πλειοψηφία τους, διογκωμένα με αποδιαταγμένες ή και εντελώς απούσες τις ακρολοφίες τους. Παρατηρείται το φαινόμενο συσσώρευσής τους στην περιφέρεια των κυττάρων και η εγκόλπωση τους σε κυτταροπλασματικές προσεκβολές οι οποίες φαίνεται να αποκόβονται από το κυτταρικό σώμα (mitoptotic bodies). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **μιτόπτωση** και αφορά την απαλλαγή των κυττάρων από τα μη φυσιολογικής μορφολογίας και λειτουργίας μιτοχόνδρια μέσω ενός προγραμματισμένου μιτοχονδριακού θανάτου (Tinari, Garofalo et al. 2007, Mijaljica, Prescott et al. 2010, Jangamreddy and Los 2012). Τέλος, πιθανόν να λαμβάνει χώρα στα συγκεκριμένα κύτταρα και η διαδικασία σύντηξης των μιτοχονδρίων (fusion) με σκοπό ίσως τον περιορισμό της αυτοφαγίας-μιτοφαγίας, την επαναφορά της αναπνευστικής δεινότητας των μιτοχονδρίων και τη διατήρηση της ομοιογένειας του γενετικού τους υλικού (Pernas and Scorrano 2016, Bordi, Nazio et al. 2017). Αυτά συνηγορούν επομένως στην επιβίωση ακολούθως της διαφυγής από τη γήρανση και της απόκτησης καρκινικών ιδιοτήτων από το συγκεκριμένο αναδυόμενο κυτταρικό υποπληθυσμό (Galanos, Vougas et al. 2016).

Abstract

The current dissertation was conducted in the frame of the study of our laboratory regarding the oncogenic effect of the prolonged induction of $p21^{CIP1/WAF1}$ gene (abbreviated p21) on Li-Fraumeni cell line, clone MDAH041 (fibroblasts which arise from skin biopsy of a Li-Fraumeni syndrome patient), for further ultrastructural study. In this specific clone MDAH041 of the Li-Fraumeni cell line the one allele of TP53 is absent, while the other one carries a mutation which alters the open reading frame of this gene resulting in the production of a truncated p53 protein with a totally different conformation. The utilized cellular induction system was Li-Fraumeni-TetON p21 where transcription is inversely activated in the presence of the antibiotic doxycycline (Dox). The cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{WAF1/CIP1}$ manifests anti-proliferative activities through p53-dependent and p53-independent pathways. However, p21 can also promote tumorigenesis. In pRb/p53 mutant tumors a detected number of large cancer cells unexpectedly presented mutual expression of p21 and the mitotic marker Ki67. Based on a possible hypothesis that was made, prolonged expression of p21 may lead to a selective procedure which allows these cells to retrieve their proliferative capacity. This biological paradox was initially transferred for study on the cellular system Saos2-TetON p21 and then on the system Li-Fraumeni-TetON p21. Upon the induction of p21, cells inserted in a senescence phase which was peaked in the 10th day in Saos2 and in the 6th day in MDAH041 (Li-Fraumeni syndrome). Prolonged induction of p21 on both these cell lines drove to the emergence of a sub-population of proliferating p21-positive cells ("escaped" cells) with a more aggressive phenotype than before (Galanos, Vougas et al. 2016). The aim of this study was the ultra-structural study of Li-Fraumeni cells on three different time-points of p21 inducing expression (0, 6 and 12 days), since p21 forces cells to senescence during the 6th day and to escape from senescence during the 12th day according to Galanos et al. 2016. For the materialization of this aim, cell culture and electron microscopy techniques were applied.

Initially, in the selected Li-Fraumeni clone employed for the experiments of optical and electronic microscopy, the expression of p21 was confirmed through the immunofluorescence technique. Specifically, MDAH041 cells without Dox treatment were used as control cell line (**Li-Fraumeni OFF**) and were compared to cells treated with Dox for 6 and 12 days (**Li-Fraumeni ON 6days and ON 12days** respectively). Indeed, increased p21 protein expression was detected both in Li-Fraumeni ON 6days ("**senescent**" cells) and 12days ("**escaped**" cells) in contrast with Li-Fraumeni OFF where there was no visible signal (Section 3.1).

Under phase contrast inversion microscope, a change in morphology of Li-Fraumeni ON 6days was observed, having larger size and proportion of cytoplasm/nucleus. They also seem to contain pronounced nuclei and nucleoli along with a granulated cytoplasm compared to Li-Fraumeni OFF. The latter are presented more spindle and elongated, some of them with a more flattened shape. Furthermore, they seem to have less pronounced nuclei, nucleoli and be smaller in size (Section 3.2).

In the majority of Li-Fraumeni ON 6days, a senescent phenotype was identified due to the detection of lipofuscin bodies in their cytoplasm by means of **GL13** histo-immunohistochemical stain (SenTraGor), whereas no similar detection was observed in the OFF cells (Section 3.3). It is worth noting that the induction of aging is due solely to overexpression of p21 and is independent of the presence of p53, which is mutated and could not be detected by both Western blot and immunofluorescence in the studied cells (Galanos, Vougas et al. 2016). After Dox administration for 12 days, the majority of escaped cells are smaller in size compared to senescent cells and spindle, with a sub-rounded cell body, distinct nuclei and numerous nucleoli approaching the morphology of the OFF cells (Section 3.2). Senescent cells are much less at day 12 overexpression of p21 compared to day 6 where the aging phenotype is predominant. In addition, after 12 days of inducible expression of p21, a specific distribution pattern of cells was observed under phase contrast, where giant-senescent cells were surrounded by escaped cells (having the morphological characteristics described above). The latter seem to communicate with the neighboring senescent cells via cytoplasmic projections (Section 3.2).

According to the ultrastructural study of Li-Fraumeni cells in Transmission Electron Microscope (TEM) the **OFF cells** are mainly spindle, they host a lot of vesicles in their cytoplasm while it seems that some of them are engulfed via thin cytoplasmic extensions. Moreover, these cells form spherical protrusions of the cytoplasm which encompass microvesicles. Some of them seem to be released to the intercellular space, probably addressed to neighboring cells, in the context of communication. The observed autophagosomes are few, while a quite interesting finding is the predominant presence of mitochondria with abnormal morphology. In particular, mitochondria appear elongated with irregular arrangement of their cristae (Section 3.4).

On the other hand, large and multi-lobular nuclei, as well as the extended-dilated endoplasmic reticulum predominate in **Li-Fraumeni ON 6days** cells. In addition, much more mitochondria appear more swollen and rounded and are deprived of cristae in comparison to those in OFF cells. Autophagy seems to be increased due to the elevated number of autophagosomes observed in various formation stages. Increased autophagy is further supported by the augmented number of lysosomes in the cytoplasm. Senescence-associated secretory phenotype (**SASP**) is another profound feature of these cells which communicate each other via either thin cytoplasmic projections or intercellular bridges in the formation of which microtubules may be implicated (Section 3.4).

“Escaped” cells are more rounded than ON 6days cells and are characterized by multi-lobular nuclei with numerous nucleoli. Fewer autophagosomes are observed compared to senescent cells indicating reduced autophagic activity. Their mitochondria are spherical in their majority, swollen –some of them giant- with disorganized or completely absent cristae. Interestingly, there was observed their accumulation at the periphery of the cells and their encapsulation in cytoplasmic vesicles, which probably appear to be removed from the rest of the cellular body (mitoptotic bodies). This phenomenon is named “mitoptosis” (programmed mitochondrial death) whereby cells dispose of mitochondria with deregulated morphology and function (Tinari, Garofalo et al. 2007, Mijaljica, Prescott et al. 2010, Jangamreddy and Los 2012). Furthermore, the enlarged/giant size of the observed mitochondria may indicate that fusion is occurred possibly between mitochondria in these cells in order to limit the autophagy-mitophagy,

restore the respiratory capacity of mitochondria and preserve the homogeneity of their genetic material (Pernas and Scorrano 2016, Bordi, Nazio et al. 2017). Therefore, the above indications support survival following escape from senescence and the acquisition of cancerous properties by the particular emerging cell subpopulation (Galanos, Vougas et al. 2016).

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή



1.1 Καρκίνος

Ο **καρκίνος** αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, καταλαμβάνοντας την δεύτερη θέση μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Σύμφωνα με τα επίσημα στατιστικά στοιχεία της Διεθνούς Επιτροπής για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, IARC), το 2012 διαγνώστηκαν 14,1 εκατομμύρια νέων περιστατικών και σημειώθηκαν 8,2 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως λόγω της ασθένειας. Η επίπτωση της νόσου εμφανίζεται συνεχώς αυξανόμενη, εξαιτίας της αύξησης, αλλά και της γήρανσης του πληθυσμού της γης (αύξηση μέσου όρου ζωής), καθώς επίσης και λόγω της επικράτησης παραγόντων που αποδεδειγμένα εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου, όπως το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η έλλειψη σωματικής άσκησης και η αλλαγή στα πρότυπα αναπαραγωγής που σχετίζονται με την αστικοποίηση και την οικονομική ανάπτυξη. Με το πέρασμα των χρόνων, το φορτίο έχει μετατοπιστεί προς τις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, οι οποίες μετρούν το 57% των περιστατικών και το 65% των θανάτων παγκοσμίως. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στους άνδρες καρκινοπαθείς, τόσο στις περισσότερο, όσο και στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, και τελευταίως ξεπέρασε τον καρκίνο του μαστού ως την κυρίαρχη αιτία θανάτου λόγω της ασθένειας στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών. Ωστόσο, ο καρκίνος του μαστού παραμένει η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό των αναπτυσσόμενων περιοχών. Άλλοι τύποι καρκίνου με αυξημένη πιθανότητα θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου για τους άνδρες και τις γυναίκες και ο καρκίνος του προστάτη για τον ανδρικό πληθυσμό. Στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, ο καρκίνος του ήπατος και του στομάχου για τους άνδρες και ο καρκίνος του τραχήλου για τις γυναίκες βρίσκονται ανάμεσα στις κύριες αιτίες θανάτου. Αν και η πιθανότητα εμφάνισης οποιοδήποτε τύπου καρκίνου είναι σχεδόν διπλάσια στις περισσότερο σε σχέση με τις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, τα ποσοστά θανάτου είναι μόνο 8-15% υψηλότερα στις ανεπτυγμένες χώρες. Η ανομοιομορφία αυτή αντικατοπτρίζει εν μέρει γενετικές διαφορές, που έχουν σχέση με τους τύπους καρκίνου που εμφανίζονται, αλλά κυρίως διαφορές στον τρόπο ζωής, το εξωτερικό περιβάλλον, καθώς και τις υπάρχουσες δυνατότητες έγκαιρης διάγνωσης και εξελιγμένης θεραπείας, που συνδέονται άμεσα με το βαθμό ανάπτυξης κάθε χώρας. Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τους τύπους καρκίνου που κατέχουν τα ινία ως αιτίες θανάτου είναι το

κάπνισμα (καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του στομάχου και του ήπατος), η παχυσαρκία και η μειωμένη σωματική άσκηση (καρκίνος του μαστού και του παχέος εντέρου) και οι λοιμώξεις (καρκίνος του ήπατος, του στομάχου και του τραχήλου). Ένα σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων εμφάνισης καρκίνου και των επικείμενων θανάτων θα μπορούσε να αποφευχθεί με την ευρεία εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης, όπως ο περιορισμός του καπνίσματος, ο εμβολιασμός και η θέσπιση προληπτικών εξετάσεων για την εγκαίριότερη διάγνωση (Torre, Bray et al. 2015).

1.1.1 Ορισμός-Φύση του καρκίνου

Ο όρος **καρκίνος** περιλαμβάνει το σύνολο το περιπτώσεων κακοήθους νεοπλασίας. **Νεοπλασία** ονομάζεται ο αυτόνομος και άναρχος πολλαπλασιασμός εξαλλαγμένων κυττάρων που ανήκουν στον ίδιο τον οργανισμό. Η διεργασία αυτή είναι το αποτέλεσμα διαταραχών στους ελέγχους της αύξησης και διαφοροποίησης, αλλά και της απόπτωσης των κυττάρων και καταλήγει στη δημιουργία **νεοπλάσματος-όγκου**. Πρόκειται για μια αυξανόμενη μάζα κυττάρων που υπερβαίνει την ανάπτυξη των κανονικών ιστών και δεν συντονίζεται με αυτούς (Böcker, Denk et al. 2007, Weinberg 2007).

Αν και αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι οι καρκινικοί όγκοι ήταν το αποτέλεσμα μιας μόλυνσης του οργανισμού με κάποιον άγνωστο, ξένο προς το ανθρώπινο σώμα παράγοντα, στα τέλη του 19ου αιώνα, όντας δυνατή η ιστολογική παρατήρηση τομών από ανθρώπινο ιστό με μικροσκόπιο, έγινε κατανοητό ότι οι καρκινικοί όγκοι αποτελούνται επίσης από κύτταρα όπως και οι φυσιολογικοί ιστοί, εμφανίζουν όμως αλλοιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με τη συνειδητοποίηση, ότι όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού προέρχονται από το πρώτο εμβρυϊκό κύτταρο, έθεσαν τις βάσεις για την ανάπτυξη μίας νέας θεωρίας, σύμφωνα με την οποία τα καρκινικά κύτταρα προέρχονταν από τα φυσιολογικά κύτταρα του πάσχοντος ατόμου. Η οργάνωση και η μορφολογία των καρκινικών όγκων εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό παρουσιάζοντας μία μη φυσιολογική οργάνωση και κυτταρική μορφολογία, παρά με κάτι ξένο προς τον

οργανισμό. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε και αργότερα με την χρήση γενετικών μαρτύρων και δεικτών, που έδειχναν ότι σε πολλές περιπτώσεις, το γενετικά χαρακτηριστικά των κυττάρων ενός όγκου (π.χ. η κατάσταση ενός αλληλομόρφου για έναν συγκεκριμένο γενετικό τόπο) είναι ίδια με αυτά των φυσιολογικών κυττάρων του ίδιου οργανισμού (Weinberg 2007).

1.1.2 Διάκριση των όγκων σε καλοήθεις και κακοήθεις

Στην κλινική πράξη καθοριστικής σημασίας είναι η διάκριση των όγκων σε **καλοήθεις** και **κακοήθεις**.

Οι **καλοήθεις** όγκοι χαρακτηρίζονται κυρίως από βραδεία, επεκτατική-απωθητική αύξηση, δηλαδή η ενιαία και καλά περιγραφόμενη νεοπλασματική μάζα που σχηματίζεται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, οδηγεί σε απώθηση και συμπίεση των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών. Ιστολογικά εμφανίζουν υψηλό βαθμό **διαφοροποίησης**, δηλαδή έχουν μεγάλη ομοιότητα με τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό και, συνήθως, αποτελούνται από ομοιόμορφα (μονόμορφα) κύτταρα (Böcker, Denk et al. 2007).

Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις καλοήθων όγκων μπορεί να υπάρξει πλήρης ίαση εάν ο όγκος αφαιρεθεί εξ' ολοκλήρου χειρουργικά. Επομένως δεν είναι θανατηφόροι, εκτός των σπάνιων περιπτώσεων καταστροφικής συμπίεσης και ατροφίας ζωτικών οργάνων και ιστών του ασθενούς ή υπερπαραγωγής και έκκρισης ορμονών ή προϊόντων του μεταβολισμού σε ποσότητες που διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού (Weinberg 2007).

Ένας όγκος εμπίπτει στην κατηγορία του καρκίνου μόνο εφόσον είναι **κακοήθης**. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό γνώρισμα των κακοήθων όγκων είναι η ικανότητά τους να

διδεισδύουν στους παρακείμενους ιστούς και να τους καταστρέφουν μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται **διήθηση**. Η ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων για διηθητική ανάπτυξη, οδηγεί επιπλέον στην είσοδό τους μέσα σε λεμφοφόρα και αιμοφόρα αγγεία. Με τον τρόπο αυτό, συμπλέγματα νεοπλασματικών κυττάρων είναι

δυνατόν αν παρασυρθούν σε απομακρυσμένες θέσεις και να αναπτυχθούν εκεί εγκαθιδρύοντας λεμφογενείς ή αιματογενείς **μεταστάσεις** (Böcker, Denk et al. 2007).

Ιστολογικά, οι κακοήθεις όγκοι εμφανίζουν εντονότερες πυρηνικές και κυτταροπλασματικές μεταβολές, τις καλούμενες ατυπίες, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι εξής:

1. Κυτταρική πολυμορφία
2. Ανισοπυρήνωση
3. Πυρηνική πολυμορφία
4. Πυρηνική υπερχρωμασία
5. Μιτώσεις
6. Μεγέθυνση των πυρηνίσκων
7. Μετατόπιση της σχέσης πυρήνα-κυτταροπλάσματος υπέρ του πυρήνα
8. Αυξημένη βασεοφιλία του πρωτοπλάσματος των νεοπλασματικών κυττάρων.

1.1.3 Διάκριση των καρκινικών όγκων με βάση την εμβρυική προέλευση και την ιστολογία

Ανάλογα με το εμβρυικό δερματικό στρώμα, από το οποίο προέρχονται τα κύτταρα που τους απαρτίζουν, οι καρκινικοί όγκοι διακρίνονται σε **ενδοδερμικής** προέλευσης (γαστροεντερικής οδού, πνεύμονα, παγκρέατος, ήπατος, χοληδόχου κύστης, ουροδόχου κύστης), **μεσοδερμικής** προέλευσης (αίματος, συνδετικού ιστού, ωοθηκών) και **εξωδερμικής προέλευσης** (δέρματος, νευρικού ιστού) (Weinberg 2007).

Με βάση τη μορφολογία των κυττάρων που τους απαρτίζουν και τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, οι καρκινικοί όγκοι διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες (Weinberg 2007):

1. Επιθηλιακούς ή **καρκινώματα**, οι οποίοι προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα

και διακρίνονται περαιτέρω: **α)** σε αυτούς που προέρχονται από **πλακώδη κύτταρα**, τα κύτταρα δηλαδή που δημιουργούν το προστατευτικό στρώμα των κοιλοτήτων και αυλών του σώματος ή μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντος, όπως το δέρμα, και **β)** σε **αδενοκαρκινώματα**, που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία επιπροσθέτως εκκρίνουν ένα προστατευτικό στρώμα βλέννας (όπως π.χ. το επιθήλιο του στομάχου και του πνεύμονα). Τα καρκινώματα συνολικά αποτελούν την πλειοψηφία των καρκινικών όγκων και περιλαμβάνουν όγκους, που προέρχονται από κύτταρα με προέλευση και από τα τρία εμβρυικά στρώματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα).

2. Όγκους μη-επιθηλιακής προέλευσης που περιλαμβάνουν:

- Τα **σαρκώματα**, που προέρχονται από κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου (ινοβλάστες, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα, λιποκύτταρα) και μεσοδερμικής προέλευσης, που σχηματίζουν διάφορους τύπους συνδετικού και υποστηρικτικού ιστού και περιλαμβάνουν ινοβλαστώματα, οστεοσαρκώματα, μυοσαρκώματα και λιποσαρκώματα).
- Τις **κακοήθεις παθήσεις του αιμοποιητικού**, που προέρχονται από κύτταρα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος και διακρίνονται περαιτέρω: **α)** σε **λευχαιμίες**, οι οποίες προέρχονται από κύτταρα της κυκλοφορίας του αίματος, πρόδρομα ερυθροκύτταρα, πρόδρομα B- και T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα του μυελού των οστών, καθώς και **β)** σε **λεμφώματα**, που προέρχονται από B- και T-λεμφοκύτταρα, τα οποία σχηματίζουν συνήθως συμπαγείς μάζες στους λεμφαδένες.
- Τους όγκους **νευροεξωδερμικής** προέλευσης, που προέρχονται από κύτταρα του νευρικού συστήματος και περιλαμβάνουν γλοιώματα, γλοιοβλαστώματα, νευροβλαστώματα κ.α.

Υπάρχουν, ωστόσο, και κάποιες μορφές όγκων, που δεν εμπίπτουν στις παραπάνω κατηγορίες, όπως το μελάνωμα, που προέρχεται από έναν ειδικό τύπο κυττάρων, τα μελανοκύτταρα και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, που αποτελείται από κύτταρα, που παρουσιάζουν ανάμεικτα χαρακτηριστικά επιθηλιακών και ενδοκρινικών κυττάρων. Μία ιδιαίτερη επίσης κατηγορία όγκων είναι οι **αναπλαστικοί**, των οποίων τα

κύτταρα φαίνεται να έχουν αποδιαφοροποιηθεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε να είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του ιστού προέλευσής τους.

1.1.4 Σταδιοποίηση και διαφοροποίηση των όγκων

Για την καλύτερη πρόγνωση και θεραπεία του καρκίνου έχουν αναπτυχθεί συστήματα καθορισμού του βαθμού διαφοροποίησης (**διαβάθμιση**) και της έκτασης διασποράς (**σταδιοποίηση**) ενός όγκου. Η **διαβάθμιση (grading)** ενός νεοπλασματος σχετίζεται με την επιθετικότητά του και τα κριτήρια βαθμονόμησης αφορούν στο βαθμό **διαφοροποίησης** των καρκινικών κυττάρων, τις πυρινικές ατυπίες και τον αριθμό των μιτώσεων μέσα στον όγκο (Böcker, Denk et al. 2007). Οι κακοήθεις όγκοι εμφανίζουν ποικίλου βαθμού απώλεια της κυτταρικής και ιστικής τους διαφοροποίησης. Αυτή η απώλεια διαφοροποίησης μπορεί να είναι τόσο εξεσημασμένη, ώστε να προκύπτουν πλήρως αδιαφοροποίητοι (**αναπλαστικοί**) όγκοι που δε διατηρούν καμία ομοιότητα με το μητρικό ιστό, ο οποίος δεν μπορεί να προσδιοριστεί, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Η **σταδιοποίηση (staging)** των κακοήθων όγκων καθορίζει την καταλληλότερη θεραπεία για τον ασθενή. Το πιο διαδεδομένο σύστημα σταδιοποίησης είναι το **TNM** (Tumor-Node-Metastasis) που ορίζεται από το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (**T**), την έκταση διασποράς ή μη του όγκου στους επιχώριους λεμφαδένες (**N**) και την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (**M**) (Kumar, Abbas et al. 2012).

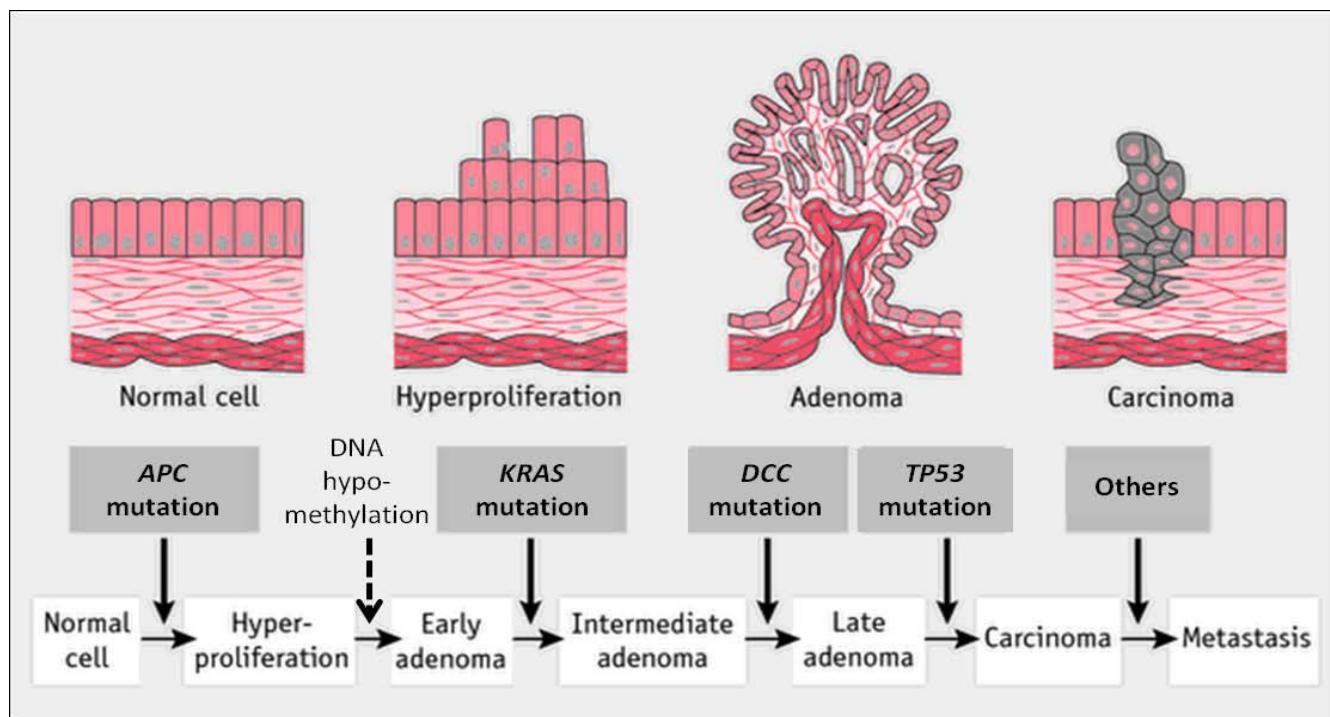
1.1.5 Καρκινογένεση

Όπως γίνεται κατανοητό, παρά το μεγάλο εύρος διαφορετικών μορφών καρκίνου, όλοι μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό: όλοι προέρχονται από κύτταρα κάποιου φυσιολογικού ιστού. Εφόσον τα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από φυσιολογικά, θα πρέπει να μεσολαβεί μία διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε

καρκινικό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **καρκινικός μετασχηματισμός** ή **καρκινογένεση**.

Μετά από δεκαετίες εντατικής έρευνας έχει αποκαλυφθεί ότι η **καρκινογένεση** είναι ένα πολυσταδιακό φαινόμενο που απαιτεί τέσσερα ως επτά στοχαστικά γεγονότα, καθένα από τα οποία αντικατοπτρίζει γενετικές αλλαγές που οδηγούν στην προοδευτική μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε αναπλαστικό. Η ανακάλυψη αλλοιώσεων που αποτελούν ενδιάμεσα στάδια στη νεοπλασματική διαδικασία και η αύξηση της επίπτωσης πολλών τύπων καρκίνου αναλογικά με την ηλικία συνηγορούν υπέρ αυτή της άποψης (**Εικόνα 1.1**).

Σύμφωνα με μία συνολική θεώρηση, η ανάπτυξη του όγκου προάγεται μέσω μιας διαδικασίας ευθέως ανάλογης με τη **δαρβινική εξέλιξη**: Το γονιδίωμα των κυττάρων μεταβάλλεται σταθερά σε πολλαπλές θέσεις υποκείμενο σε αλλοιώσεις τόσο αδιόρατες όσο μια σημειακή μεταλλαγή ή τόσο εμφανείς όσο χρωμοσωμικές μεταβολές. Πολλές από τις μεταβολές δεν επιδρούν στα κύτταρα, άλλες οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, ενώ κάποιες προσφέρουν κάποιο πλεονέκτημα αύξησης σε σχέση με τα γειτονικά τους. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται κλωνικότητα (clonal evolution) και μέσα από αυτήν τα καρκινικά κύτταρα εξελίσσονται σε πιο επικίνδυνες μορφές, ενώ αποκτούν και ανθεκτικότητα στα φάρμακα (Luo, Solimini et al. 2009).



Εικόνα 1.1: Ακολουθία γεγονότων ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος στο παχύ έντερο σύμφωνα με το μοντέλο των Fearon και Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990).

Ένα στάδιο στο οποίο τα κύτταρα αποκλίνουν μόνο ελάχιστα από τα φυσιολογικά είναι η **υπερπλασία**. Ο υπερπλαστικός ιστός διαφέρει από τον φυσιολογικό στον υπερβολικά αυξημένο αριθμό κυττάρων, ενώ κατά τα άλλα εμφανίζει φυσιολογική μορφολογία και οργάνωση. Έτσι, χαρακτηρίζεται καλοήθης αλλοίωση, η οποία δεν απειλεί τη ζωή του ασθενούς, εκτός αν η αύξηση του αριθμού των κυττάρων επιδρά στη φυσιολογική λειτουργία του ιστού.

Μία ιδιαίτερη μορφή προκαρκινικής αλλοίωσης είναι η **μεταπλασία**, κατά την οποία ένας τύπος πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων αντικαθίσταται από ένα άλλο επίσης πλήρως διαφοροποιημένο κυτταρικό τύπο που δεν εντοπίζεται φυσιολογικά στο εν λόγω σημείο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταπλασίας αποτελεί το σύνδρομο του οισοφάγου Barrett, όπου το φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο της κατώτερης περιοχής του οισοφάγου, αντικαθίσταται από αδενικά επιθηλιακά κύτταρα, που παρατηρούνται φυσιολογικά στο στομάχι.

Επόμενος βαθμός αλλοίωσης είναι η **δυσπλασία**, η οποία χαρακτηρίζεται από κυτταρική ατυπία. Τα κύτταρα παρουσιάζουν ποικιλομορφία στο μέγεθος και στο

σχήμα, υπερχρωμασία, αύξηση του πυρήνα σε βάρος του κυτταροπλάσματος, περισσότερες μιτώσεις και έλλειψη κυτταροπλασματικών στοιχείων που σχετίζονται με τα φυσιολογικά κύτταρα του ιστού. Οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις, παρ' όλες τις μορφολογικές και ανατομικές διαταραχές, δεν αναπτύσσονται πέρα από τη βασική μεμβράνη, που διαχωρίζει το επιθήλιο από το υποκείμενο στρώμα στηρικτικού ιστού και για το λόγο αυτό θεωρούνται καλοήθεις, αλλά προκαρκινικές.

Ανάλογα με το βαθμό και την έκταση των μορφολογικών αλλοιώσεων αλλά και το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων, οι δυσπλασίες διακρίνονται σε περαιτέρω στάδια από χαμηλού έως υψηλού βαθμού. Οι πολύ υψηλού βαθμού δυσπλασίες αντιστοιχούν στον όρο **καρκίνωμα *in situ***, που θεωρείται ως το τελευταίο βήμα πριν την διάρρηξη της βασικής μεμβράνης από τον καρκινικό ιστό και επομένως μία μεταβατική κατάσταση μεταξύ καλοήθους και κακοήθους αλλοίωσης (προδιηθητικό νεόπλασμα).

Όταν στα χαρακτηριστικά των δυσπλαστικών κυττάρων προστίθεται η ικανότητα διήθησης της βασικής μεμβράνης και εισβολής στους παρακείμενους ιστούς, το νεόπλασμα ονομάζεται **διηθητικό** και θεωρείται πλέον κακοήθεια (Weinberg 2007).

Το τελικό στάδιο κακοήθειας και πιο απειλητικό για τη ζωή του ασθενούς είναι ο **μεταστατικός** καρκίνος. Στο στάδιο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν τη δυνατότητα να εισέρχονται στα αγγεία και στην κυκλοφορία του αίματος, να μεταφέρονται σε απομακρυσμένα, ως προς τον αρχικό όγκο, ανατομικά μέρη του σώματος, να εγκαθίστανται σε νέους ιστούς και να δημιουργούν εκεί όγκους. Η δυνατότητα μετάστασης είναι μία πολύπλοκη διαδικασία, που απαιτεί την απόκτηση πολλών και ιδιαίτερων χαρακτηριστικών από τα καρκινικά κύτταρα, με τους σχετικούς μηχανισμούς να παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστοι (Kumar, Abbas et al. 2012).

1.1.6 Μοριακοί μηχανισμοί καρκινογένεσης

Η μελέτη των μηχανισμών, που οδηγούν στην καρκινογένεση ξεκινάει φυσικά από την ανάλυση των παραγόντων που την προκαλούν. Ο καρκίνος θεωρείται μία πολυπαραγοντική νόσος στη δημιουργία της οποίας εμπλέκονται περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες.

Επιδημιολογικές μελέτες στα νεότερα χρόνια καταδεικνύουν τον πρωταρχικό ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων και του τρόπου ζωής, αφού παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση συγκεκριμένων μορφών καρκίνου σε πληθυσμούς που βρίσκονται σε διαφορετικές χώρες. Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις η μετανάστευση κάποιων πληθυσμών είχε σαν αποτέλεσμα την προσαρμογή των δεικτών εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου στις επόμενες γενιές, στα ποσοστά που παρατηρούνται στη χώρα υποδοχής, γεγονός που ενισχύει την σημασία της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων σε σχέση με αυτή της κληρονομικότητας. Φυσικά υπάρχουν και κληρονομικές μορφές καρκίνου, οι οποίες όμως αποτελούν μειοψηφία (Jemal, Bray et al. 2011).

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που βλάπτουν τη σταθερότητα του γενετικού υλικού προκαλώντας αλλοιώσεις σε αυτό και, επομένως, συμβάλουν στην καρκινογένεση μπορούν να ομαδοποιηθούν στις εξής κατηγορίες: α) ακτινοβολίες, β) χημικά μεταλλαξογόνα, και γ) ιοί.

Ένας βασικός αλλά πολύ γενικός μηχανισμός δημιουργίας καρκινικών κυττάρων, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι οι αλλαγές λόγω μεταλλάξεων από εξωγενείς παράγοντες, στο γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων. Οι αλλαγές αυτές ή τουλάχιστον ορισμένες από αυτές, έστω και αν έχουν προκληθεί τυχαία, εμφανίζονται κατ' επανάληψη σε πολλούς όγκους, υποδεικνύοντας ότι είναι καθοριστικές για τον καρκινικό μετασχηματισμό. Πράγματι, οι έρευνες σε μοριακό και γενετικό επίπεδο έδειξαν ότι η πλειοψηφία των γονιδίων που βρίσκονται αλλοιωμένα στον καρκίνο, ελέγχουν και ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες που έχουν άμεση σχέση με τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιες λειτουργίες είναι ο **κυτταρικός πολλαπλασιασμός** και η **αύξηση**, ο **έλεγχος της κυτταρικής διαίρεσης**, ο **προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος** (απόπτωση) και η **κυτταρική γήρανση**, καθώς επίσης και η **ανίχνευση και επιδιόρθωση βλαβών του DNA**.

Τα γονίδια που επηρεάζονται περισσότερο από τις αλλοιώσεις του γενετικού υλικού, διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (Hanahan and Weinberg 2011, Kumar, Abbas et al. 2012):

1. **Ογκογονίδια (oncogenes)**. Η αύξηση της έκφρασής τους (ενεργοποίηση), προωθεί την καρκινογένεση, μέσω ενίσχυσης σηματοδοτικών μονοπατιών, που οδηγούν σε αυξημένο και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανεξάρτητα από την παρουσία των αντίστοιχων σημάτων. Η ανακάλυψή τους έγινε αρχικά στο γονιδίωμα ιών, που είχαν την ικανότητα να προκαλούν όγκους σε ζώα, ενώ στη συνέχεια ομολογά τους αλλά και νέα ογκογονίδια βρέθηκαν σε καρκίνους του ανθρώπου.

Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των ογκογονιδίων περιλαμβάνουν:

- **Σημειακές μεταλλάξεις** (αρκεί μετάλλαξη σε ένα αλληλόμορφο). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η το ογκογονίδιο *RAS*, το οποίο φέρει μία μετάλλαξη σε μεγάλο ποσοστό καρκίνων παγκρέατος και παχέος εντέρου, η οποία καθιστά το μιτογόνο μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει μόνιμα ενεργό, προωθώντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.
- **Γονιδιακή ενίσχυση**. Αύξηση των αντιγράφων ενός γονιδίου ή μιας χρωμοσωμικής περιοχής που οδηγεί σε υπερέκφραση ογκογονιδίων. Παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *ERBB2*, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (human epidermal growth factor receptor, HER2) και βρίσκεται συχνά ενισχυμένο στον καρκίνο του μαστού συσχετιζόμενο με κακή πρόγνωση.
- **Χρωμοσωμική αναδιάταξη**. Περιλαμβάνει αμοιβαίες συνήθως μετατοπίσεις περιοχών μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή ακόμα και τη δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών με αλλοιωμένα χαρακτηριστικά. Καθίστανται περισσότερο συχνές σε κακοήθειες του αιμοποιητικού συστήματος, όπως λευχαιμίες και λεμφώματα, πιθανότατα εξαιτίας του αυξημένου ανασυνδυασμού που συμβαίνει στα κύτταρα αυτά, για την αναδιάταξη των αλυσίδων ανοσοσφαιρινών και τη δημιουργία διαφορετικών αντισωμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το χρωμόσωμα Philadelphia, το οποίο παρατηρήθηκε σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία και προκαλείται από μια μετάθεση μεταξύ του γονιδίου BCR, του χρωμοσώματος 22 και της κινάσης ABL, του χρωμοσώματος 9. Η μετάθεση αυτή

οδηγεί στην παραγωγή μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης (BCR-ABL), με αυξημένη ενεργότητα κινάσης.

2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumoursuppressorgenes). Η έκφραση των γονιδίων αυτών παρατηρείται συχνά μειωμένη ή και εξαφανισμένη στον καρκίνο, επομένως η δράση τους λειτουργεί ως εμπόδιο στην καρκινογένεση. Συμμετέχουν συνήθως σε κυτταρικά μονοπάτια που ελέγχουν και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των κυττάρων, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση προγραμμάτων απόπτωσης και γήρανσης.

Οι μηχανισμοί απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων περιλαμβάνουν:

- **Σημειακές μεταλλάξεις:** Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης ή σε απώλεια κάποιου τμήματος λόγω πρώιμου τερματισμού της μετάφρασης. Για την απώλεια της λειτουργίας ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, απαιτείται συνήθως μετάλλαξη και των δύο αλληλομόρφων. Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι συχνότερες ως μηχανισμός απώλειας ογκοκατασταλτικών γονιδίων (απώλεια λειτουργίας), παρά ως μηχανισμός ενεργοποίησης ογκογονιδίων (κέρδος λειτουργίας).

- **Ελλείψεις γονιδίων ή ευρύτερων χρωμοσωμικών περιοχών:** Η απώλεια ετεροζυγωτίας (απώλεια του ενός αλληλομόρφου) σε καρκινικά κύτταρα αποτελεί ισχυρή ένδειξη για την παρουσία ενός μόνο ογκοκατασταλτικού γονιδίου στην συγκεκριμένη περιοχή και είναι ένας χρήσιμος δείκτης για την ανίχνευση και ταυτοποίηση νέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

- **Επιγενετική αποσιώπηση:** Ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια εμφανίζουν αύξηση της μεθυλίωσης του υποκινητή τους στον καρκίνο, με αποτέλεσμα την μείωση ή και απώλεια έκφρασής τους. Τέτοια περίπτωση αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για αναστολέα κυτταρικού κύκλου p16^{INK4A}.

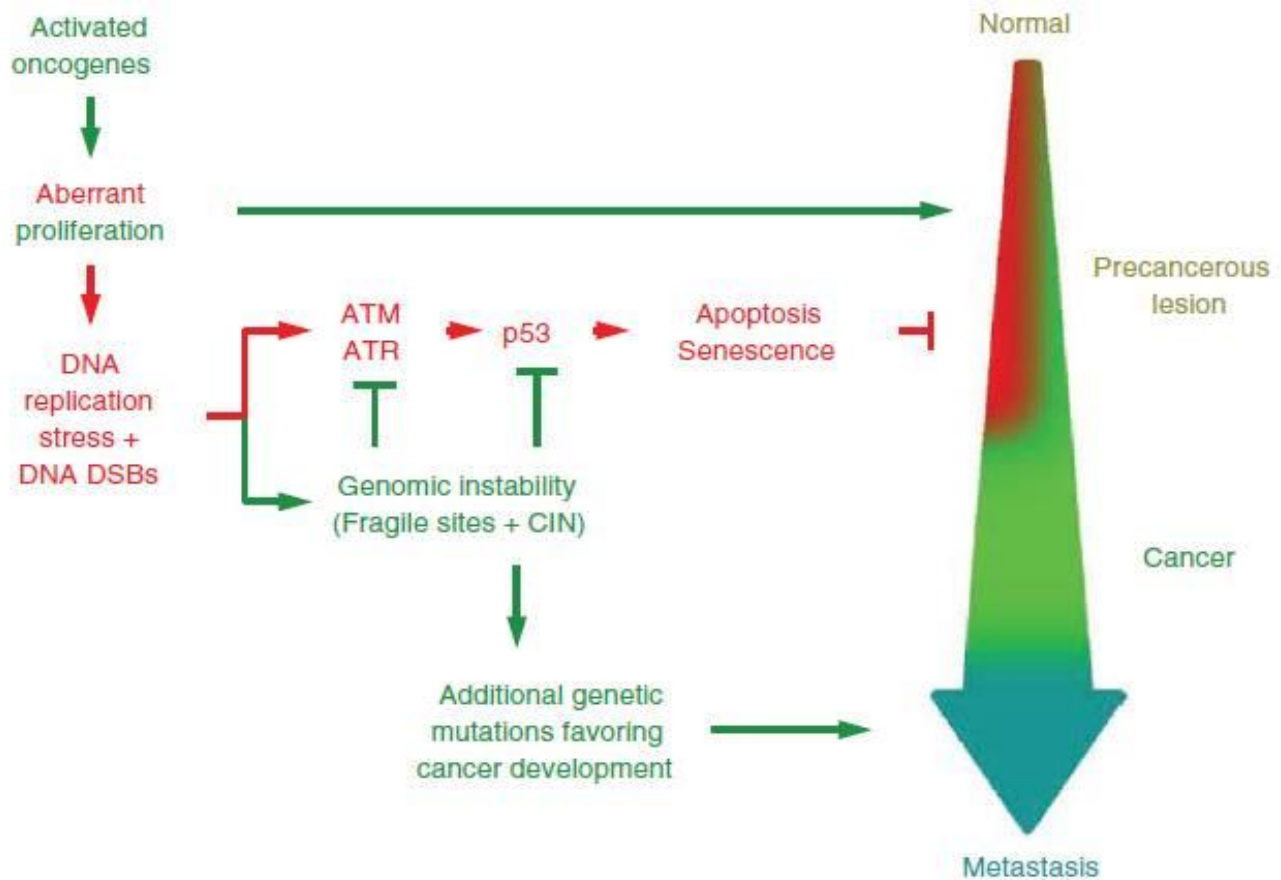
3. Τα γονίδια ελέγχου (“caretaker” genes). Τα γονίδια αυτά συνήθως συμμετέχουν σε μηχανισμούς, που εξασφαλίζουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος, όπως:

- Ανίχνευση βλαβών του DNA και ενεργοποίηση μονοπατιών επιδιόρθωσης (DNA Damage Response)

- Επιδιόρθωση βλαβών του DNA
- Απενεργοποίηση ή εξουδετέρωση παραγόντων, που προκαλούν αλλοιώσεις του DNA.

Οι διαταραχές στην έκφραση αυτών των γονιδίων ουσιαστικά επιταχύνει τη διαδικασία απόκτησης νέων μεταλλάξεων και συμβάλλει στην ανάπτυξη γενωμικής αστάθειας (genomic instability).

Σύμφωνα με το μοντέλο ανάπτυξης του καρκίνου λόγω των βλαβών που επάγονται από τη δράση ογκογονιδίων (oncogene-induced DNA damage model for cancer development), πρώτο βήμα στο πολυσταδιακό φαινόμενο της καρκινογένεσης είναι η ενεργοποίηση ογκογονιδίου. Αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού και το αντιγραφικό στρες με επακόλουθο βλάβες του DNA. Οι δικλωνικές θραύσεις οδηγούν σε ενεργοποίηση των μηχανισμών απόκρισης σε βλάβες του DNA (**DDR**) και την εμφάνιση των αντικαρκινικών φραγμών της κυτταρικής γήρανσης ή της απόπτωσης που χαρακτηρίζουν τις προκαρκινικές αλλοιώσεις. Παράλληλα, η αναδυόμενη γενωμική αστάθεια οδηγεί σε επιπρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις, όπως η απώλεια ογκοκατασταλτικών και γονιδίων που συμμετέχουν σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, προάγοντας την εμφάνιση επιθετικότερων χαρακτηριστικών και την ανάπτυξη του καρκίνου (**Εικόνα 1.2**).

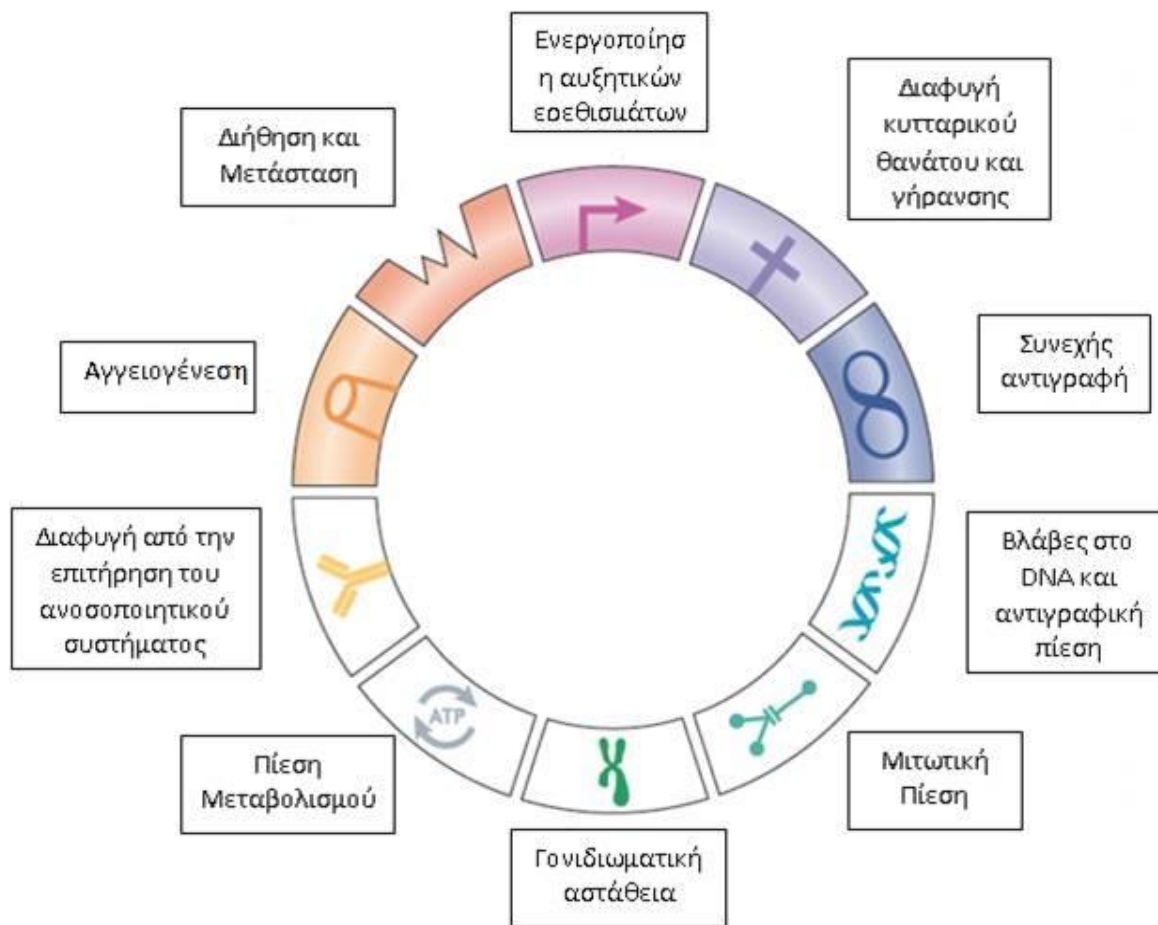


Εικόνα 1.2: Μοντέλο ανάπτυξης καρκίνου λόγω «των προκαλούμενων μέσω των ογκογονιδίων» βλαβών του DNA (oncogene-induced DNA damage model for cancer development). Η γενωμική αστάθεια και οι αντικαρκινικοί φραγμοί της απόπτωσης και της κυτταρικής γήρανσης είναι άμεσα αποτελέσματα του αντιγραφικού στρες που προκαλείται εξαιτίας της δράσης ογκογονιδίων και λαμβάνουν χώρα νωρίς στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η διαφυγή από τους αντικαρκινικούς φραγμούς, που οφείλεται συχνά σε μεταλλάξεις ή απώλεια της πρωτεΐνης p53, προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008).

1.1.7 Βιολογικά χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Σύμφωνα με το άρθρο των Hanahan and Weinberg το 2000 (Hanahan and Weinberg 2000) καθώς και με την ανανεωμένη του μορφή το 2011, τα βιολογικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που οδηγούνται σε κακοήθειες είναι: α) Ενεργοποίηση εσωτερικών ερεθισμάτων κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανεξάρτητα από τα εξωτερικά ερεθίσματα, β) Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μηνύματα αναστολής της ανάπτυξης, γ) Συνεχής κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαφυγή από το πρόγραμμα γήρανσης, δ) Αντιγραφική πίεση και Γενωμική αστάθεια, ε) Μιτωτική πίεση, στ) Μεταβολική πίεση, ζ) Διαφυγή από το πρόγραμμα απόπτωσης, η) Διαφυγή από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος, θ) Αγγειογένεση και ι) Διήθηση σε παρακείμενους ιστούς και μετάσταση (**Εικόνα 1.3**) (Negrini, Gorgoulis et al. 2010, Hanahan and Weinberg 2011). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του καρκίνου που συμβάλλει έμμεσα στην απόκτηση των παραπάνω ογκογενετικών ιδιοτήτων είναι η **φλεγμονή που σχετίζεται με τον όγκο** και η οποία έχει αναφερθεί ως ένα “επικουρικό χαρακτηριστικό” του καρκίνου (“enabling characteristic”) (Hanahan and Weinberg 2011).

Παρ’ όλο που όλα τα παραπάνω χαρακτηρίζουν τον καρκίνο, πολλές περιπτώσεις κακοηθειών δεν είναι απαραίτητο να χαρακτηρίζονται από όλα αυτά. Για παράδειγμα στην περίπτωση των λευκών αιμοσφαιρίων επειδή αυτά ήδη βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος δεν χρειάζονται διηθητική ικανότητα για να δημιουργήσουν λευχαιμίες. Επίσης τα διαφορετικά βήματα δεν σημαίνουν αναγκαστικά ότι θα πρέπει να συμβούν μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια. Όταν καταστέλλεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο της πρωτεΐνης p53 προκαλείται γονιδιακή αστάθεια, διαφυγή απόπτωσης και αύξηση της αγγειογένεσης (Negrini, Gorgoulis et al. 2010, Hanahan and Weinberg 2011).



Εικόνα 1.3: Βιολογικά χαρακτηριστικά καρκινικών κυτάρων (Negrini, Gorgoulis et al. 2010, Hanahan and Weinberg 2011).

1.2 Κυτταρικός Κύκλος

Σύμφωνα με τη μία από τις δύο θεμελιώδεις αρχές της Βιολογίας, την Κυτταρική Θεωρία (η άλλη είναι η Θεωρία της Εξέλιξης), κάθε κύτταρο προέρχεται από τη διαίρεση ενός προϋπάρχοντος κυττάρου. Η διαδικασία διαιώνισης της γενετικής πληροφορίας από κύτταρο σε κύτταρο και από γενιά σε γενιά γίνεται με μια σειρά διαδοχικών φάσεων που είναι αυστηρά ελεγχόμενες. Μεταξύ των φάσεων, υπάρχουν μηχανισμοί ελέγχου οι οποίοι διασφαλίζουν την επιτυχή ολοκλήρωση της προηγούμενης φάσης, πριν προχωρήσουν στην επόμενη. Με αυτό τον τρόπο διαφυλάσσεται η ακεραιότητα του γενετικού υλικού, των κυττάρων και του οργανισμού, στον οποίο αυτά ανήκουν και λειτουργούν. Η απώλεια ελέγχου οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη και καρκίνο.

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων, δηλαδή το χρονικό διάστημα από τη δημιουργία τους μέχρι τη διαίρεσή τους σε θυγατρικά κύτταρα, συνίσταται από τη μεσόφαση, που διακρίνεται περαιτέρω στις φάσεις G1, S και G2, και την μίτωση (M) (**Εικόνα 1.4a**). Η G1 (first gap) φάση αποτελεί την «φάση ηρεμίας» του κυττάρου. Σε αυτήν το κύτταρο επιβιώνει, επικοινωνεί με το περιβάλλον του, εκφράζει γονίδια ανάλογα με τις ανάγκες και τη λειτουργία του και προετοιμάζεται ώστε να προχωρήσει στην S φάση, με διασφαλισμένες τις σωστές συνθήκες. Στην S (synthesis) φάση πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA, με τους απαραίτητους ελέγχους, ώστε όταν ακολουθήσει η επόμενη φάση να είναι εξασφαλισμένη η ακεραιότητα του γενετικού του υλικού. Παράλληλα, διπλασιάζεται το κεντροσωμάτιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό της ατράκτου και των διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στην M φάση. Ακολουθεί η G2 (second gap) φάση, όπου ελέγχεται η σύνθεση των απαραίτητων πρωτεϊνών για τον αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (μίτωση) και την διαίρεση του μητρικού κυττάρου (κυτοκίνηση). Στην M (mitosis) φάση, μια σειρά 5 διακριτών βημάτων (πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση) οδηγούν στο σωστό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και του πυρήνα, ενώ παράλληλα η κυτοκίνηση εξασφαλίζει τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος και των υποκυτταρικών οργανιδίων, ώστε να παραχθούν δύο νέα κύτταρα όμοια γενετικά μεταξύ τους και με το αρχικό. Όπως στις προηγούμενες φάσεις, έτσι και σε αυτήν υπάρχει μηχανισμός ελέγχου, που διασφαλίζει την σωστή πορεία των βημάτων (Alberts, Johnson et al. 2008).

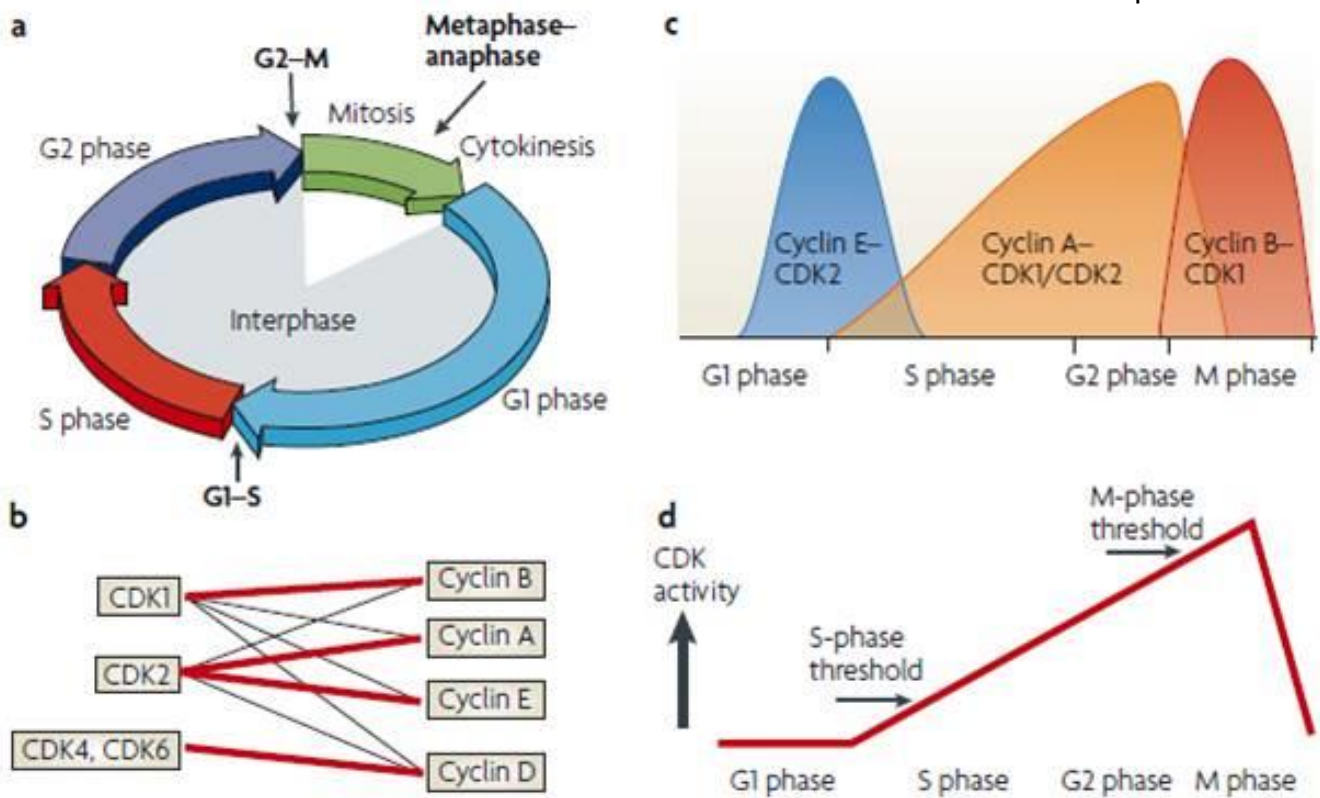
1.2.1 Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου και σημεία ελέγχου

Κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιούνται μηχανισμοί, οι οποίοι ελέγχουν το πέρασμα στην επόμενη φάση. Ο έλεγχος είναι απαραίτητος, γιατί οποιαδήποτε διαταραχή του οδηγεί σε απορρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας και συχνά σε καρκινογένεση. Τα σημεία ελέγχου εμφανίζονται στις εναλλαγές των φάσεων, με εξέχουσας σημασίας ρόλο να διαδραματίζουν αυτά μεταξύ G1/S και G2/M. Οι κυριότεροι μεσολαβητές σε αυτά, είναι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες **CDKs** (cyclin-dependent kinases) και οι κυκλίνες (cyclins). Οι CDKs είναι ένζυμα, που προσθέτουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες σε άλλα μόρια, καθοδικούς τους στόχους (φωσφορυλίωση). Το μήνυμα μέσα στο κύτταρο μεταδίδεται μέσω αυτής της

φωσφορυλίωσης. Οι CDKs ενεργοποιούνται μετά την αλληλεπίδρασή τους με κυκλίνες. Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται και αποικοδομούνται αυστηρά κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Μέσω της σύνδεσης ή αποσύνδεση τους από τις CDKs, επιτρέπουν την είσοδο ή την έξοδο από κάποια φάση. Υπάρχουν αδρά τέσσερις κατηγορίες κυκλινών (λεπτομέρειες στην επόμενη παράγραφο). Αυτές που συμμετέχουν στη G1 φάση (G1 cyclins), στη G1/S μετάβαση (G1/S cyclins), την S φάση (S cyclins) και τη μίτωση (mitotic cyclins). Οι G1 και G1/S κυκλίνες προσδένονται στις CDKs στην G1 φάση σηματοδοτώντας την έξοδο από την φάση αυτή και την είσοδο στην S. Μόλις το κύτταρο ελέγξει το μέγεθός του και τις συνθήκες που επικρατούν, τότε οι κυκλίνες αποικοδομούνται, οι CDKs απενεργοποιούνται και το κύτταρο εισέρχεται στην S φάση. Οι S κυκλίνες συνδέονται με τις CDKs και σηματοδοτούν την έναρξη σύνθεσης του DNA. Οι κυκλίνες της μίτωσης αυξάνονται σταδιακά στην G2 φάση. Όταν βρεθούν σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης, συνδέονται με τις CDKs, σχηματίζοντας το σύμπλεγμα του παράγοντα επαγωγής της μίτωσης (mitosis promoting factor, **MPF**) παρέχοντας στο κύτταρο τη δυνατότητα εισόδου στην M φάση. Μόλις οι κυκλίνες αποικοδομηθούν και ο MPF απενεργοποιηθεί, τότε το κύτταρο διαιρείται και τα νέα κύτταρα εισέρχονται στην G1 φάση (Alberts, Johnson et al. 2008).

1.2.2 Κυκλίνες και ρύθμιση κυτταρικού κύκλου

Οι κυκλίνες ομαδοποιούνται σε τάξεις, ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου που συμμετέχουν και ανάλογα με τα επίπεδά τους, επιτρέποντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 1.4: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. a) Τα κύτταρα υποβάλλονται σε τρεις σημαντικές μεταβάσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού τους κύκλου. Η αρχή της φάσης S σηματοδοτείται από την έναρξη της αντιγραφής του DNA, η έναρξη της μίτωσης (M) συνοδεύεται από διάσπαση του πυρηνικού περιβλήματος και συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, ενώ ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων σηματοδοτεί τη μετάβαση από τη μετάφαση στην αναφάση. Οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) ενεργοποιούν τη μετάβαση από τη φάση G1 σε S και από φάση G2 σε M με φωσφορυλίωση διακεκριμένων ομάδων υποστρωμάτων. **b)** Οι CDK1 και CDK2 δεσμεύονται σε διάφορες κυκλίνες (A, B, D και E), ενώ οι CDK4 και CDK6 σχηματίζουν σύμπλοκο μόνο με κυκλίνες D. Οι έντονες κόκκινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τον προτιμώμενα ζεύγη. **c)** Τα ετεροδιμερή κυκλίνη D-CDK4 ή κυκλίνη D-CDK6 ρυθμίζουν τα γεγονότα στην πρώιμη φάση G1, το ετεροδιμερές κυκλίνη E-CDK2 πυροδοτεί τη φάση S, τα σύμπλοκα κυκλίνη A-CDK2 και κυκλίνη A-CDK1 ρυθμίζουν η ολοκλήρωση της φάσης S και το σύμπλοκο κυκλίνη B-CDK1 είναι υπεύθυνο για τη μίτωση. **d)** Η αύξηση της ενεργότητας των CDKs σηματοδοτεί την είσοδο στην S φάση, ενώ η μείωση τη μετάβαση στη μίτωση (Hochegger, Takeda et al. 2008).

Οι **κυκλίνες D** (D1, D2 και D3) συμμετέχουν στην G1 φάση και ρυθμίζουν την έξοδο από την G0 στην G1 φάση. Ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες και εξωτερικά ερεθίσματα, μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης RAS GTPase. Η κυκλίνη D συνδέεται με τις κινάσες **CDK4** και **CDK6** και οδηγεί το κύτταρο στην είσοδό του στην S φάση (Κιτράκη και Τρούγκος 2006). Το σύμπλεγμα κυκλίνη D/CDK4 υποφωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη RB οδηγώντας σε ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F, οι οποίοι επάγουν γονίδια της S φάσης, όπως κυκλίνες A και E, CDK2, CDC6 (cell division cycle 6) και CDT1 (cell division cycle 10-transcript 1) (Alberts, Johnson et al. 2008). Οι κυκλίνες E και A συνδέονται ανεξάρτητα με την **CDK2** και επάγουν την είσοδο στην S φάση. Τα δύο συμπλέγματα υπερφωσφορυλιώνουν την RB. Η **κυκλίνη E** διεγείρει τη συγκρότηση του συμπλέγματος αντιγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής, **CDC6**. Η **κυκλίνη A** ενεργοποιεί την σύνθεση DNA και καταστέλλει την συγκρότηση νέων συμπλεγμάτων αντιγραφής. Οι **κυκλίνες B1 και B2** αποτελούν τις κυκλίνες της M φάσης. Αυτές σε συνδυασμό με την κινάση **CDK1** αποτελούν τον παράγοντα **MPF**, ρυθμίζοντας την δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου και την σωστή τοποθέτηση των αδελφών χρωματίδων σε αυτήν (Hochegger, Takeda et al. 2008) (**Εικόνα 1.4**).

Η αποικοδόμηση των κυκλινών, πραγματοποιείται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, μέσω συμπλεγμάτων λιγασών ουβικουΐνης. Τα κυριότερα από αυτά είναι το **SCF** (Skp, Cullin, F-box containing complex), που ρυθμίζει την μετάβαση από την G1 φάση στην S φάση και το σύμπλεγμα **APC/C** (anaphase promoting complex/cyclosome), που ρυθμίζει τα επίπεδα των κυκλινών της M φάσης. Ένας από τους βασικότερους ρόλους του τελευταίου, καθίσταται η ασφαλής μετάβαση από την μετάβαση στην ανάφαση (Κιτράκη και Τρούγκος 2006).

1.2.3 Κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, αναστολείς και ρύθμιση κυτταρικού κύκλου

Η ρύθμιση της ενεργότητας των κινασών CDKs επεκτείνεται μέσω της αλληλεπίδρασης τους με πρωτεΐνες καταστολείς. Μια από τις πιο σημαντικές κινάσες καταστολείς είναι η WEE1, ενώ η φωσφατάση CDC25 απομακρύνει της φωσφορικές ομάδες, που οδηγούν σε καταστολή. Η δράση αυτών των δύο ρυθμιστικών ενζύμων αφορά κυρίως σε αυτές τις κυκλίνες της μίτωσης (B1 και B2) (Perry and Kornbluth 2007). Οι πρωτεΐνες, που συνδέονται και καταστέλλουν το σύμπλεγμα κυκλινών-CDKs, ονομάζονται πρωτεΐνες αναστολείς των CDK (CDK inhibitory proteins, CIP). Διακρίνονται δύο τάξεις, οι CIPs που καταστέλλουν τις CDK1, CDK2, CDK4 και CDK5, και οι INK4s που καταστέλλουν τις CDK4 και CDK6 (Κιτράκη και Τρούγκος 2006). Στις CIPs ανήκουν οι p21^{WAF1/CIP1}, p27KIP1 και p57KIP2. Η καθεμία ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένες φάσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η p21 δρα σε περίπτωση απόκρισης βλαβών του DNA αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο, κυρίως στη φάση G1, υπό τον έλεγχο της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Στις INK4s ανήκουν οι p14INK4/ARF, p15INK4B, p16INK4A και p18INK4C, οι οποίες αναστέλλουν τα συμπλέγματα των CDK4 και CDK6 (Κιτράκη και Τρούγκος 2006).

1.2.4 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα προϊόντα τους ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και επεμβαίνουν σε περιπτώσεις βλαβών, ώστε το κύτταρο να πραγματοποιήσει τις απαραίτητες επιδιορθώσεις και να προχωρήσει σε επόμενα στάδια. Η απουσία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή των προϊόντων τους, οδηγεί σε πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ανεξάρτητα από τις πιθανές βλάβες που φέρει το γενετικό υλικό, με ενδεχόμενη την ανάπτυξη καρκίνου. Δύο από τις πιο χαρακτηριστικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, είναι η πρωτεΐνη RB και η πρωτεΐνη p53. Η πρώτη αποτρέπει την έξοδο από την G1 φάση και η δεύτερη καταστέλλει την πρόοδο της S φάσης και την είσοδο στην G2 φάση. Όπως προαναφέρθηκε, ο μεταγραφικός παράγοντας E2F επάγει την έκφραση των κυκλινών A και E, καθώς και της κινάσης CDK2, που είναι απαραίτητες για την διεξαγωγή της S φάσης. Όταν ο E2F συνδεθεί με

την RB, τότε καταστέλλεται η δράση του ως μεταγραφικός παράγοντας, αφού μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Η φωσφορυλίωση της RB μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης της με τον E2F, συνεισφέροντας στην μεταγραφική του δραστηριότητα. Στη περίπτωση της κυτταρικής διαφοροποίησης, η RB εμφανίζεται υποφωσφορυλιωμένη. Φυσιολογικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, στην αρχή της S φάσης εμφανίζει τη μέγιστη φωσφορυλίωση και την χαμηλότερη στη μίτωση και στην αρχή της G1 φάσης. Το σύμπλεγμα G1-CDK φωσφορυλιώνει την RB, ώστε ο παράγοντας E2F να δράσει στα γονίδια στόχους του. Όταν ο τελευταίος ενεργοποιήσει το σύμπλεγμα SCDK, αυτό διατηρεί την φωσφορυλίωση της pRB, ώστε το κύτταρο να προχωρήσει στον διπλασιασμό του γενετικού του υλικού (Κιτράκη και Τρούγκος 2006). Η πρωτεΐνη p53 ελέγχει την σωστή διεξαγωγή της αντιγραφής του DNA και ενεργοποιείται στην περίπτωση βλαβών του DNA. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα χαμηλά επίπεδα της, ελέγχονται από την σύνδεση της με την πρωτεΐνη MDM2, η οποία ευνοεί την αποικοδόμηση της. Κατά την απόκριση σε βλάβη του DNA, η p53 ενεργοποιείται από τις κινάσες ATM (ataxia-telangiectasia mutated) και CHK2 (checkpoint kinase 2), οι οποίες φωσφορυλιώνουν την p53, αποτρέποντας την αλληλεπίδρασή της με τη λιγάση ουβικουΐνης, MDM2. Η p53 επάγει την έκφραση του γονιδίου CDKN1A, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21, η οποία αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Από την ανάλυση του ρόλου των δύο ογκοκατασταλτικών γονιδίων διαφαίνεται η υψίστη σημασία τους, στην διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού. Οποιαδήποτε αδυναμία δράσης αυτών των μηχανισμών είναι δυνατόν να οδηγήσει σε διαταραγμένο κυτταρικό κύκλο και ανάπτυξη καρκίνου (Sherr 2006).

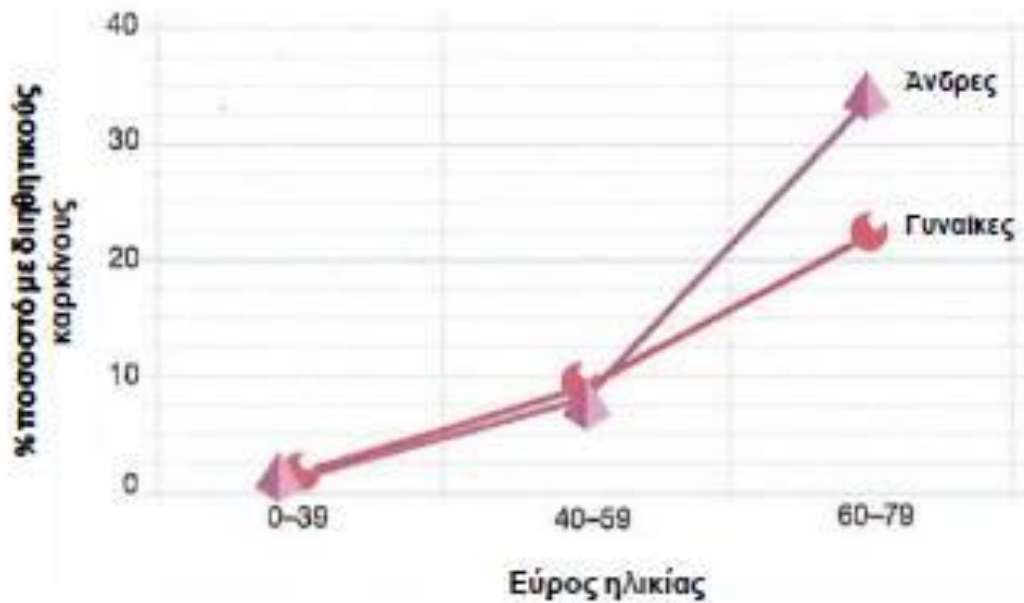
1.3 Εισαγωγή στη γήρανση

Κατά την αναπτυξιακή πορεία όλων των οργανισμών, παρατηρούνται αλλαγές σε μοριακό, βιοχημικό, κυτταρικό και ανατομικό επίπεδο, οι οποίες είναι μη-αντιστρεπτές. Το φαινόμενο της αλληλοδιαδοχής αυτών των αλλαγών κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού, με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο, ονομάζεται **βιολογική γήρανση** (ageing) (Μαργαρίτης, Γαλανόπουλος et al. 2004).

Η εμφάνιση της γήρανσης σχετίζεται με τη σταδιακή συσσώρευση βλαβών στα βιομόρια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της ζωής, στις οποίες συμβάλλουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013, Trougakos, Sesti et al. 2013). Οι ενδογενείς παράγοντες αφορούν κυρίως στη γενωμική αστάθεια, δηλαδή ανακατατάξεις της χρωματίνης, βλάβη του DNA, καθώς και σμίκρυνση του μήκους των τελομερών. Στους εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με το γήρας περιλαμβάνεται το περιβαλλοντικό στρες, καθώς και ο τρόπος ζωής, όπως η διατροφή και το κάπνισμα (Trougakos, Sesti et al. 2013). Ωστόσο, για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι μηχανισμοί συντήρησης της ομοιοστασίας του κυττάρου διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα τις βλάβες στα βιομόρια απομακρύνοντας ή επιδιορθώνοντας τις βλάβες. Όμως, η «μάχη» της συντήρησης της ομοιοστασίας τελικά χάνεται, καθώς ο οργανισμός γηράσκει, με αποτέλεσμα σταδιακά να δυσλειτουργούν και τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιοστασίας. Εν τέλει, προκύπτει απορρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση βλάβης που τελικά οδηγεί στην εμφάνιση του γηρασμένου ιστού, καθώς και ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας, όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ο καρκίνος (Campisi 2005, Niccoli and Partridge 2012).

Η γήρανση επομένως αποτελεί τον μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου καθώς και διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών, η εμφάνιση των οποίων αυξάνει εκθετικά συναρτήσσει της ηλικίας, ξεκινώντας στο μέσο περίπου της ζωής (DePinho 2000, Balducci and Ershler 2005). Έτσι, σημαντική αύξηση της ανάπτυξης του καρκίνου στον άνθρωπο εμφανίζεται σε ηλικία 50-60 χρόνων (**Εικόνα 1.5**). 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 (Campisi 2013).



Εικόνα 1.5: Εμφάνιση του καρκίνου συναρτήσει της ηλικίας (DePinho 2000).

1.3.1 Κυτταρική γήρανση

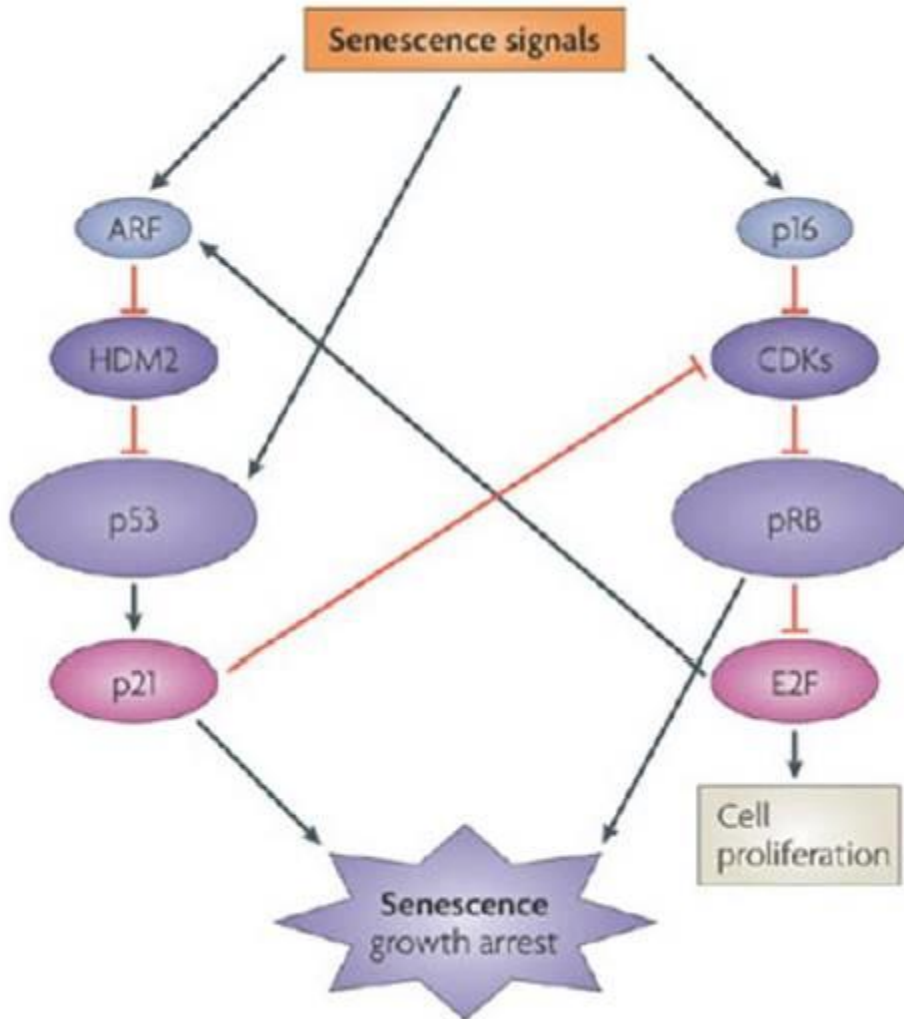
Πρώτοι οι Hayflick et al το 1961 διαπίστωσαν ότι τα ανθρώπινα κύτταρα διαθέτουν πεπερασμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, δουλεύοντας σε ανθρώπινους ινοβλάστες παρατήρησαν ότι τα κύτταρα σταματούσαν να πολλαπλασιάζονται μετά από 50 κυτταρικές διαιρέσεις, όριο το οποίο ονομάστηκε «**όριο Hayflick**» ή όπως ονομάζεται πια «αντιγραφική γήρανση». Τα μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα παρέμειναν ζωντανά για πολλές εβδομάδες, αλλά ήταν ανίκανα να αναπυχθούν παρά τις καλές συνθήκες καλλιέργειας (Hayflick and Moorhead 1961). Τα κύτταρα που εισέρχονται σε γήρανση εγκαταλείπουν τον κυτταρικό κύκλο με περιεχόμενο DNA αυτό της φάσης G1 στους πυρήνες τους. Η προσθήκη BrdU (ανάλογο θυμιδίνης) στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειών και η επακόλουθη ανοσοϊστοχημική χρώση δεν βάφει τα γηρασμένα κύτταρα, αφού αυτά αδυνατούν να εισέλθουν σε φάση S και να συνθέσουν DNA. Η μη αντιστρεπτή διακοπή της εισόδου στον κυτταρικό κύκλο στα γηρασμένα κύτταρα ελέγχεται από την υπερέκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών του κυτταρικού κύκλου (CDKIs – Cyclin dependent Kinase Inhibitors): p16, p21 (Stein, Drullinger et al. 1999, Mirzayans, Andrais et al. 2010) και από την ενεργότητα της p53 (Serrano, Lin et al. 1997, Collado and Serrano 2010) (**Εικόνα 1.6**). Έτσι το γηρασμένο κύτταρο συνεχίζει να αυξάνεται σε μέγεθος και παραμένει μεταβολικά ενεργό, αλλά δεν μπορεί να περάσει το σημείο ελέγχου G1/S και να συνεχίσει την κυτταρική διαίρεση παρά την ύπαρξη ισχυρών μιτογονικών ερεθισμάτων (Blagosklonny 2003).

Η γήρανση όπως και η απόπτωση είναι μια ακραία απόκριση στο κυτταρικό στρες και αποτελεί έναν σημαντικό ογκοκατασταλτικό μηχανισμό κατά της πρώιμης κακοήθους εξαλλαγής (Larsson 2011). Σε αντίθεση με την απόπτωση, όμως, στην οποία τα κυτταροτοξικά σήματα συγκλίνουν σε έναν κοινό μηχανισμό, η γήρανση είναι τυπικά μια καθυστερημένη απόκριση στο στρες που περιλαμβάνει πολλαπλούς εκτελεστικούς μηχανισμούς. Ωστόσο δεν είναι πλήρως σαφές τι είναι αυτό καθορίζει εάν τα κύτταρα θα ακολουθήσουν το ένα ή το άλλο μονοπάτι. Ένας καθοριστικός παράγοντας θα μπορούσε να είναι ο κυτταρικός τύπος μιας και οι κατεστραμμένοι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα τείνουν να γερνούν, ενώ τα κατεστραμμένα λεμφοκύτταρα τείνουν να υποβάλλονται σε απόπτωση (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Η φύση και η

ένταση της βλάβης ή του στρες μπορεί επίσης να είναι σημαντικοί παράγοντες. Ωστόσο, είναι σαφές ότι τα ρυθμιστικά συστήματα γήρανσης και απόπτωσης επικοινωνούν μεταξύ τους, χρησιμοποιώντας τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα p53 ως κοινό ρυθμιστή αμφοτέρων των οδών. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο το p53 μπορεί ίσως να θεωρηθεί ως ο μεγαλύτερος ρυθμιστής της κυτταρικής μοίρας (Li, Kon et al. 2012).

Επιπλέον, η βιολογική γήρανση (ageing) αποτελεί μια ακόμα συνέπεια της κυτταρικής γήρανσης μιας και η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων μπορεί να μεγιστοποιήσει τα συμπτώματα της γήρανσης σε έναν οργανισμό. Μάλιστα η στόχευση των γηρασμένων κυττάρων σε πρόωρα γηρασμένα ποντίκια έχει δείξει ότι βελτιώνει τα συμπτώματα του γήρατος (Baker, Perez-Terzic et al. 2008, Baker, Wijshake et al. 2011).

Πρόσφατες παρατηρήσεις καταδεικνύουν έναν αναδυόμενο ρόλο των γηρασμένων κυττάρων ως έναν ευρύτερο μηχανισμό μάλλον παρά ως διαδικασίες καταστολής του όγκου ή προώθησης της βιολογικής γήρανσης και μόνο. Η κυτταρική γήρανση μπορεί να συμμετάσχει σε πολλούς φυσιολογικούς μηχανισμούς όπως για παράδειγμα στην ιστική επιδιόρθωση, στην επούλωση τραυμάτων καθώς και στην εμβρυογένεση (Xue, Zender et al. 2007, Krizhanovsky, Yon et al. 2008, Munoz-Espin, Canamero et al. 2013, Storer, Mas et al. 2013).



Εικόνα 1.6: Η κυτταρική γήρανση ενεργοποιεί πολλά σήματα που εμπλέκονται στη μόνιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

Ερεθίσματα που σχετίζονται με την εμφάνιση γήρανσης όπως οι γενωμικές βλάβες, η μείωση του μήκους των τελομερών και η υπερέκφραση ογκογονιδίων οδηγούν σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p16, ενός αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKI) ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος οδηγώντας σε γήρανση. Επιπροσθέτως, η αύξηση της p14ARF εμποδίζει την αλληλεπίδραση της p53 με τον αρνητικό της ρυθμιστή Mdm2, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών p53 και p21 οι οποίες τελικά επάγουν τη γήρανση (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

1.3.2 Τα είδη της κυτταρικής γήρανσης

Η γήρανση (senescence) προέρχεται από τη λέξη *senex*, μια λατινική λέξη που σημαίνει γέρος ή γήρας (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Η κυτταρική γήρανση συμβαίνει κυρίως *in vitro* και διακρίνεται σε αντιγραφική (**replicative senescence**) και πρόωρη γήρανση (**premature senescence**). Στα πλαίσια της αντιγραφικής γήρανσης διπλοειδικά κύτταρα χάνουν μη αντιστρεπτά την ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης που οφείλεται στη μείωση του μήκους των τελομερών. Ωστόσο, τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά και βιώσιμα για χρόνια (Cristofalo, Lorenzini et al. 2004). Από την άλλη πλευρά πρόωρη γήρανση προκύπτει όταν ένα κύτταρο με φυσιολογικό μήκος τελομερών γηράσκει εξαιτίας διαφορετικών ερεθισμάτων. Στα ερεθίσματα αυτά μπορεί να ανήκουν οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS – **stress-induced premature senescence**, SIPS), φυσικοί ή χημικοί παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA και χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά (**therapy-induced senescence**, TIS) ή η ενεργοποίηση ογκογονιδίων (**oncogene-induced senescence**, OIS) (Schmitt, Fridman et al. 2002, Collado, Gil et al. 2005, Michaloglou, Vredeveld et al. 2005, Coppe, Patil et al. 2008). Σε όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις η ενδεχόμενη διαφυγή από την γήρανση λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων σχετίζεται με την απόκτηση νέων χαρακτηριστικών (Abbadie, Pluquet et al. 2017).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η κυτταρική γήρανση είναι μία διαδικασία που συμβαίνει και *in vivo* σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους συσχετιζόμενη με το γήρας και τις σχετικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Campisi, Andersen et al. 2011, Childs, Durik et al. 2015).

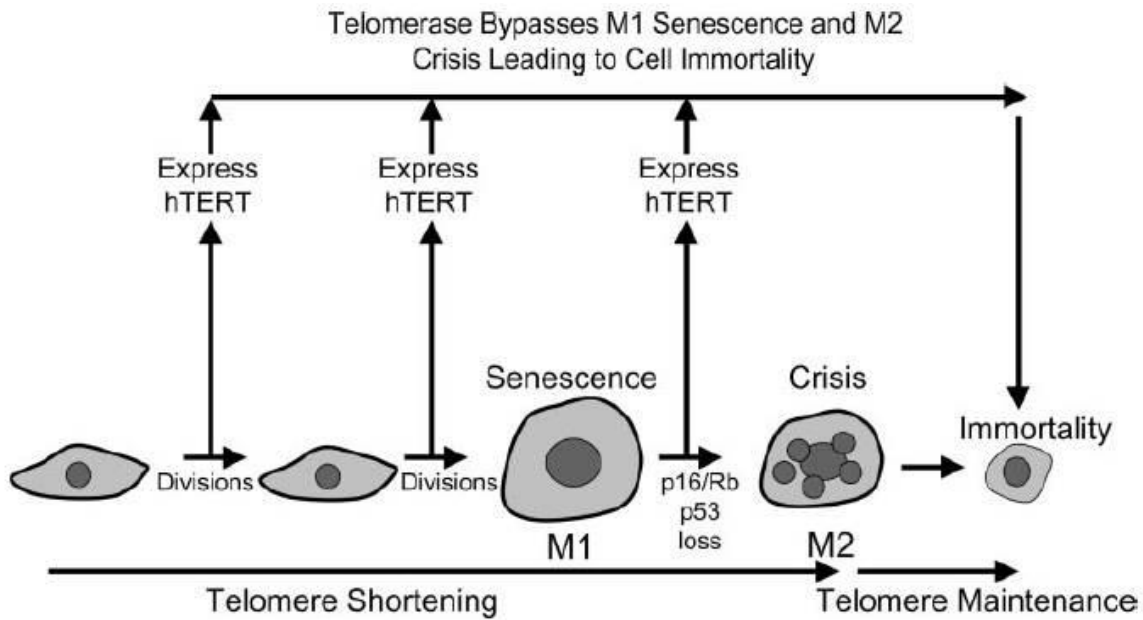
1.3.2.1 Αντιγραφική γήρανση (Replicative senescence)

Η αναζήτηση του μοριακού μηχανισμού που καταγράφει τον αριθμό των διπλασιασμών κάθε φυσιολογικού κυττάρου ξεκίνησε το 1976, όταν ο Hayflick και οι συνεργάτες του - χρησιμοποιώντας τεχνικές εκπηρήνωσης (**enucleation**) και σύντηξης (**fusion**) που τους επέτρεπαν να ανταλλάξουν τους πυρήνες των φυσιολογικών με τα γηρασμένα κύτταρα- διαπίστωσαν ότι το «μιτωτικό ρολόι» εντοπιζόταν στον πυρήνα του κυττάρου (Muggleton-Harris and Hayflick 1976). Ποικίλα δεδομένα καταδεικνύουν το μήκος των τελομερών ως το ενδογενές σύστημα μέτρησης του αριθμού των διαιρέσεων (Blasco 2005). Το μήκος των τελομερών μειώνεται κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων, μέχρις ότου ο μηχανισμός απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) οδηγήσει σε υπερέκφραση των CDKIs, οι οποίοι με τη σειρά τους προκαλούν γήρανση (Cristofalo, Lorenzini et al. 2004). Κατά τη διάρκεια της γήρανσης τα κύτταρα συνεχίζουν να επιτελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, αλλά δε διαιρούνται. Το επόμενο στάδιο χαρακτηρίζεται από καρυοτυπικές ανωμαλίες και εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο (**crisis state**). Σπάνια, κάποια κύτταρα (1 στα 10^7) επιβιώνουν από αυτή την κατάσταση και διαθέτουν πλέον απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού (**αθανατοποίηση**) (**Εικόνα 1.7**). Η πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων που καλλιεργούνται είναι αθανατοποιημένα. Προφανώς πρόκειται για μια διαδικασία που συμβαίνει *in vivo* κατά τη διάρκεια της καρκινικής εξαλλαγής και είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της κακοήθειας (Hayflick 1997).

Τελομερή ονομάζονται οι εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις (**TTAGGG**) στα άκρα των χρωμοσωμάτων, οι οποίες ασκούν προστατευτική δράση συνδεδεμένες με ειδικές πρωτεΐνες (Hemann and Greider 1999). Η προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών σε κάθε νέα κυτταροδιαίρεση οφείλεται σε αδυναμία των DNA πολυμερασών να αντιγράψουν τα 3' άκρα. Ύστερα από ένα κρίσιμο σημείο βράχυνσης των τελομερών, τα άκρα των χρωμοσωμάτων μένουν ακάλυπτα, σχηματίζονται συχνά δικεντρικά χρωμοσώματα και προκύπτουν κύτταρα με ανώμαλο καρυότυπο. Η κατάσταση γίνεται αντιληπτή ως βλάβη του γενωμικού υλικού, τα κύτταρα παύουν να διαιρούνται και τελικά αποπύπτουν (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003).

Έχει δειχθεί πως μετά από την αποκατάσταση της δραστηριότητας της ανάστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (**TERT**) μέσω έκτοπης έκφρασης της, φυσιολογικά διπλοειδικά ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να διαφύγουν της γήρανσης, ενώ διατηρούν ένα φυσιολογικό καρυότυπο (Shay and Wright 2005).

Επίσης τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι ξεπερνούν τον φραγμό του πεπερασμένου αριθμού διαιρέσεων με την ενεργοποίηση της τελομεράσης (human telomerase reverse transcriptase, hTERT). Πρόκειται για μια ειδικευμένη DNA πολυμεράση που προσθέτει τελομερικές επαναλήψεις στα άκρα των χρωμοσωμάτων, είναι απύσχα στα φυσιολογικά μη-αθανατοποιημένα κύτταρα, αλλά λειτουργική στην πλειονότητα (ως 90%) των σποραδικά αθανατοποιημένων καρκινικών κυττάρων. Η παρουσία ενεργούς τελομεράσης σχετίζεται με αντίσταση στην επαγωγή αντιγραφικής γήρανσης και απόπτωσης (Hanahan and Weinberg 2011). Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως όντως η μείωση του μήκους των τελομερών αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για την πρόκληση της αντιγραφικής γήρανσης.



Εικόνα 1.7: Ο ρόλος της τελομεράσης στη διαφυγή από τη γήρανση. Η έκτοπη έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας του hTERT έχει ως αποτέλεσμα την αθανατοποίηση ανθρώπινων κυτάρων εφόσον τα τελομερή λειτουργούν περιοριστικά ως προς το ρυθμό με τον οποίο πραγματοποιείται ο συνεχής κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Τα τελομερή είναι επομένως σημαντικά τόσο στη γήρανση (M1) όσο και στην κρίση (M2) καθώς η εισαγωγή της hTERT πριν από την φάση M1 ή μετά από αυτήν έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική αθανατοποίηση. Εάν η εισαγωγή της hTERT δεν έχει ως αποτέλεσμα την αθανατοποίηση, αυτό αντικατοπτρίζει έναν άλλο τύπο διακοπής της ανάπτυξης που είναι ανεξάρτητος από τα τελομερή και είναι πιθανό να αντικατοπτρίζει ανεπαρκής συνθήκες καλλιέργειας που οδηγούν σε STASIS ή αυτό που ονομάζεται πρόωρη γήρανση ή καλλιεργητικό σοκ (Shay and Wright 2005).

1.3.3 Εξελικτικές θεωρίες περί γήρανσης

Παρότι ο φαινότυπος της γήρανσης είναι φυλογενετικά διασπαρμένος υπάρχουν και περιπτώσεις ειδών όπου δεν παρατηρείται μείωση της γονιμότητας ή αύξηση θνησιμότητας λόγω γήρανσης γεγονός που σημαίνει ότι ο φαινότυπος της γήρανσης δεν μπορεί να εξηγηθεί σαν ένα αναπόφευκτο βιολογικό γεγονός. Έτσι λοιπόν και δεδομένου ότι θεωρητικά η γήρανση είναι επιβλαβής για το άτομο το ερώτημα είναι πως προέκυψε διαμέσου της εξέλιξης.

Μια αρχική εξήγηση για την εξέλιξη της γήρανσης είναι η **θεωρία προγραμματισμένου θανάτου**. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, που αναπτύχθηκε από τον Weismann, υπάρχει ένας προγραμματισμένος από τη φυσική επιλογή μηχανισμός θανάτου, με τελικό στόχο την απομάκρυνση των ώριμων και «φθαρμένων ατόμων», και την εκμετάλλευση ελεύθερων φυσικών πόρων από νεαρότερα άτομα. Η θεωρία αυτή σχετίζεται με το πεπερασμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Παρόλα αυτά, η θεωρία αμφισβητήθηκε, δεδομένου πως η εξάρτηση του ποσοστού θανάτων με την αύξηση της ηλικίας παρουσιάζει μια ομαλή και μονότονη διακύμανση χωρίς κανένα καθοριστικό σημείο («κρίσιμη ηλικία») πάνω από το οποίο να παρατηρείται απότομη αύξηση της θνησιμότητας (Gavrilov and Gavrilova 2002).

Μια δεύτερη θεωρία είναι αυτή της “**συσσώρευσης μεταλλαγών**” που προτείνει ότι στα λίγα άτομα που επιζούν δε μπορεί να δράσει η φυσική επιλογή έχοντας σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβερών γονιδίων (σκιά επιλογής) τα οποία είναι μη επιλεγμένα και έτσι η κατανομή τους στο πληθυσμό θα είναι εξαιρετικά ανομοιογενής. Για παράδειγμα ένα μεταλλαγμένο γονίδιο που μειώνει την ικανότητα επιβίωσης ενός νεογνού θα υποστεί ισχυρή αρνητική επιλογή. Αντίθετα ένα γονίδιο με παρόμοια δράση η οποία εντοπίζεται σε ηλικία μεγαλύτερη των 90 ετών δεν θα υποστεί επιλογή διότι οι φορείς του γονιδίου αυτού θα το έχουν ήδη κληρονομήσει στους απογόνους τους πριν η δράση του γίνει εμφανής. Έτσι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τα γονίδια που δρουν σε προχωρημένη ηλικία θα συσσωρεύονται έχοντας σαν αποτέλεσμα την αύξηση των ρυθμών θνησιμότητας με την αύξηση της ηλικίας. Τα γονίδια αυτά μπορεί και να ευνοούνται κατά την εξέλιξη αν τα αποτελέσματά τους είναι θετικά νωρίς στη ζωή ακόμη και αν έχουν αρνητικά αποτελέσματα σε μεγάλη ηλικία - ένας γενετικός μηχανισμός που

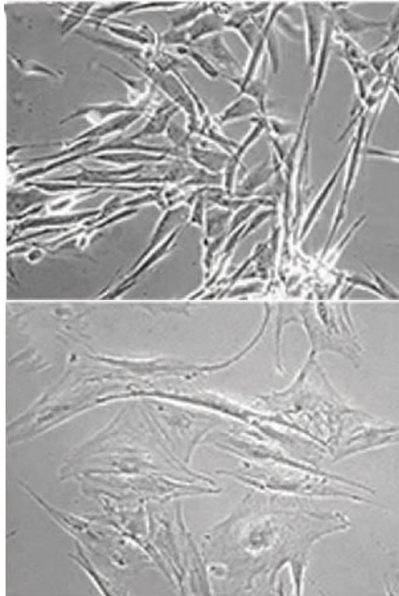
ονομάζεται “**ανταγωνιστικός πλειοτροπισμός**” (Kirkwood and Austad 2000, Campisi 2013).

Η εναλλαγή ανάμεσα στα οφέλη στην αρχή της ζωής και στις βλαβερές συνέπειες αργότερα, ερμηνεύτηκε από τον Dr. Kirkwood αρκετά χρόνια πριν με τη θεωρία του “**απορριπτέου σώματος**” (disposable soma). Η θεωρία αυτή συσχετίζει τη γήρανση με την ενέργεια που δαπανά ένας οργανισμός προκειμένου να αναπαραχθεί. Στηρίζεται στην ιδέα πως η φυλετική αναπαραγωγή συνοδεύεται από ένα κόστος στο προσδόκιμο ζωής του οργανισμού. Ο Kirkwood (1981) πρότεινε πως οι οργανισμοί επενδύουν ένα μέρος της ενέργειάς τους προκειμένου να διατηρήσουν το μεταβολισμό τους. Τα συσσωρευόμενα λάθη στις μεταβολικές διεργασίες οδηγούν στη φθορά του οργανισμού («φθαρτό σώμα») και τελικά στη γήρανση (Gavrilov and Gavrilova 2002). Η θεωρία αυτή εισάγει μια νέα κατηγορία μεταλλάξεων με ανταγωνιστικές πλειοτροπικές δράσεις: εξοικονόμηση ενέργειας για την αναπαραγωγική λειτουργία (θετική δράση) και εξασθένηση των μοριακών μηχανισμών επιδιόρθωσης και ακρίβειας στα σωματικά κύτταρα (αρνητική δράση). Η φυσική επιλογή ευνοεί τη διατήρηση και την επιδιόρθωση βλαβών στα γεννητικά κύτταρα, προκειμένου να γίνει η αναπαραγωγή, ενώ τα σωματικά κύτταρα συσσωρεύουν βλάβες, με τελικό αποτέλεσμα τη γήρανση και τον θάνατο (Kirkwood and Austad 2000).

1.3.4 Φαινοτυπικά γνωρίσματα των κυττάρων σε γήρανση

Αν και το παθογνωμονικό γνώρισμα της αντιγραφικής γήρανσης είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου παρουσία μιτογονικών ερεθισμάτων, τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται επιπλέον από πλήθος μορφολογικών, μοριακών και γονιδιακών αλλαγών (Beausejour, Krtolica et al. 2003). Από μορφολογικής πλευράς τα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης μπορούν να γίνουν μεγάλα, πεπλατυσμένα, με σύγχρονη αύξηση του λόγου κυτταροπλάσματος/πυρήνα (Cho, Ryu et al. 2004) (**Εικόνα 1.8**). Συχνά, εμφανίζουν κενोटόπια στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, περιέχουν πολλά 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 (Augert and

Bernag 2013). Στα χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων συγκαταλέγεται και η έκκριση μιας σειράς μορίων, όπως πρωτεάσες, κολλαγενάσες, ο ενεργοποιητής του ιστικού πλασμινογόνου και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες. Αντιθέτως, εκφράζουν χαμηλά επίπεδα των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνάσων και συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσία, όπως η ελαστίνη, η λαμινίνη και το κολλαγόνο. Αυτές οι ιδιότητες αποκαλύπτουν την αλλαγή στο φαινότυπο των κυττάρων από κύτταρα που συνθέτουν θεμέλια ουσία (matrix-synthesizing) σε κύτταρα που τη διασπούν (matrix-degrading) (Mavrogonatos, Pratsinis et al. 2017). Η πιο χαρακτηριστική ωστόσο ιδιότητα των γηρασμένων κυττάρων είναι η θετική χρώση που εμφανίζουν σε pH=6 μετά από επίδραση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση σχετιζόμενου με τη γήρανση (**senescence-associated β-galactosidase, SA-β-Gal**). Η χρώση στηρίζεται στην υδρόλυση του υποστρώματος X-gal από το ενδοκυττάριο ένζυμο β-γαλακτοσιδάση -μια λυσοσωματική υδρολάση- η οποία στα φυσιολογικά κύτταρα πραγματοποιείται σε pH=4, ενώ στα γηρασμένα κύτταρα μόνο σε pH=6. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει ακριβής βιοχημική εξήγηση του φαινομένου η παραπάνω μέθοδος αποτελεί μέχρι σήμερα μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους ανίχνευσης των γηρασμένων κυττάρων σε καλλιέργειες και ιστούς (Hwang, Yoon et al. 2009). Όσο αφορά την παρουσία ενδοκυττάριας δομής έχει αναφερθεί η ύπαρξη υποπυρηνικών δομών ετεροχρωματίνης που ονομάζονται **SAHFs** (Senescence Associated Heterochromatin Foci). Τα SAHFs περιλαμβάνουν μεταγραφικά ανενεργές ετεροχρωματινικές περιοχές του DNA όπως η μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης 3, η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) καθώς και η macroH2A μια παραλλαγή της ιστόνης H2A. Τα SAHFs πιστεύεται ότι διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην επαγωγή της γήρανσης καθώς σχηματίζονται πάνω σε υποκινητές γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό (πχ. κυκλίνης A) οδηγώντας τους σε αποσιώπηση. Η ύπαρξη τους αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα των γηρασμένων κυττάρων (Hwang, Yoon et al. 2009).



Εικόνα 1.8: Μορφολογική απεικόνιση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών (πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα πάνω έναντι γηρασμένων κάτω) (Yang, Rosen et al. 2006).

1.3.5 Χαρακτηριστικά λειτουργίας των γηρασμένων κυττάρων

1.3.5.1 Αναστολή της ανάπτυξης

Παρόλο που τα γηρασμένα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά και συνθέτουν RNA και πρωτεΐνες, αναστέλλουν την ανάπτυξή τους στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και δεν προχωράνε στη φάση S, καθώς δε συνθέτουν DNA, ακόμα κι όταν υπάρχουν τα κατάλληλα μιτογονικά ερεθίσματα. Αυτή η αναστολή της ανάπτυξής τους στη φάση G1 τα διαφοροποιεί από τα κύτταρα που δεν συνθέτουν DNA λόγω της αναστολής εξ' επαφής στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). 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 (Campisi 2013).

1.3.5.2 Αντίσταση στην απόπτωση

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (ή αλλιώς απόπτωση) αποτελεί ένα εξελικτικά διατηρημένο αμυντικό σύστημα για κάθε ξενιστή. Χαρακτηρίζεται ο “φύλακας άγγελος” ως προς την ακεραιότητα ενός ιστού συμβάλλοντας καθοριστικά στην απομάκρυνση των ακατάλληλων και τραυματισμένων κυττάρων χωρίς να προκαλείται φλεγμονή. Ωστόσο, η απόπτωση φαίνεται να είναι ένα δίκκοπο μαχαίρι, καθώς κατά τη διάρκεια έκθεσης σε χαμηλά επίπεδα χρόνιου στρες, όπως στη γήρανση, η αυξημένη αντοχή στην απόπτωση μπορεί να οδηγήσει στην επιβίωση λειτουργικά ανεπαρκών μετα-μιτωτικών κυττάρων με κατεστραμμένες “housekeeping” λειτουργίες (Salminen, Ojala et al. 2011). Όπως η γήρανση έτσι και η απόπτωση είναι απόκριση σε κυτταρικό στρες και είναι σημαντικός ογκοκατασταλτικός μηχανισμός (Vicencio, Galluzzi et al. 2008).

Η αντίσταση που αποκτούν τα γηρασμένα κύτταρα σε συγκεκριμένα προ-αποπτωτικά ερεθίσματα έχει περιγραφεί από το παρελθόν (Wang 1995, Seluanov, Gorbunova et al. 2001). Η αντίσταση αυτή ίσως να εξηγεί εν μέρει τη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στους ιστούς εκθετικά με την ηλικία (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Παρ'όλα αυτά, η παραμονή των γηρασμένων κυττάρων στους ιστούς μπορεί να ποικίλει, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο τους. Για παράδειγμα, γηρασμένα μελανοκύτταρα προερχόμενα από όγκους τύπου “naevii” μπορούν να παραμείνουν ακέραια για χρόνια (Michaloglou, Vredeveld et al. 2005). Από την άλλη πλευρά, τα γηρασμένα κύτταρα των καρκινωμάτων του ήπατος εξαλείφονται αμέσως μέσω φαγοκυττάρωσης (Xue, Zender et al. 2007).

1.3.5.3 Αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση

Τα κύτταρα που οδεύουν προς γήρανση υφίστανται εντυπωσιακές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων τους. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν μεταβολές στους αναστολείς ή ενεργοποιητές του κυτταρικού κύκλου. Δύο αναστολείς του κυτταρικού κύκλου που εκφράζονται συχνά σε γηρασμένα κύτταρα είναι οι κυκλινοεξαρτώμενοι αναστολείς κινασών (CDKIs) p21 και p16^{INK4A}. Αυτοί οι αναστολείς είναι μέρος των ογκοκατασταλτικών δικτύων που συνήθως ελέγχονται από τους παράγοντες μεταγραφής p53 και Rb αντίστοιχα. Τα δύο αυτά μονοπάτια μπορούν να οδηγήσουν στη διακοπή της ανάπτυξης κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης. Συχνά διαταράσσονται στον καρκίνο και κατά συνέπεια διαταράσσονται και οι σηματοδοτικές οδοί που διέπουν (Kubo and Kaye 2001, Muller and Vousden 2013).

Κατά τη διάρκεια της γήρανσης πολλά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καταστέλλονται όπως για παράδειγμα τα PCNA (proliferating-dependent cell nuclear antigen), E2F, και οι κυκλίνες A και B (Corpe, Desprez et al. 2010). Από την άλλη πλευρά υπάρχουν μεταβολές στη μεταγραφή γονιδίων που δεν συνδέονται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου αλλά με τον εκκριτικό φαινότυπο σχετιζόμενο με τη γήρανση (senescence-associated secretory phenotype, **SASP**). Πολλές μελέτες έχουν δείξει μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν εκκρινόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες πιθανώς θα μπορούσαν να τροποποιήσουν το μικροπεριβάλλον των ιστών όπου εκφράζονται. Ορισμένα κύτταρα σε φάση γήρανσης εκκρίνουν επίσης πρωτεΐνες που μπορούν να αλλάξουν τη δομή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ενισχύοντας ακόμη και μια φλεγμονώδη κατάσταση (Corpe, Desprez et al. 2010).

1.3.5.4 Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση, SASP

Η κυτταρική γήρανση συνήθως συνδέεται με την αλλαγή στην έκφραση αρκετών γονιδίων, η οποία οδηγεί στην έκκριση αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών και κυτοκινών (Kuilman, Michaloglou et al. 2010). Αυτός ο φαινότυπος είναι γνωστός ως εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP), ο οποίος παρατηρήθηκε αρχικά σε ινοβλάστες με αντιγραφική γήρανση (Kuilman, Michaloglou et al. 2010). Οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων έχουν διαφορετικά εκκρίματα, τα οποία είναι ειδικά για κάθε κύτταρο. Ο SASP είναι συνδυασμός βιολογικά δραστικών ενώσεων και έχει επίδραση στο μικροπεριβάλλον των γηρασμένων κυττάρων. Στα πλαίσια του SASP οι εκκρινόμενοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις (π.χ. οι ιντερλευκίνες 6 και 8) και μπορεί επίσης να διευκολύνουν την ανάπτυξη νέων όγκων (Corpe, Desprez et al. 2010). Η έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών δύναται να έχει επίδραση πάνω στη συμπεριφορά και στις αποκρίσεις των κυττάρων. Για παράδειγμα, η έκκριση υψηλών ποσοστών του παράγοντα GRO α (growth related oncogene alpha) από γηρασμένα κύτταρα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μαστού (Corpe, Desprez et al. 2010). Επίσης ο SASP μπορεί να προωθήσει τη μετανάστευση λεμφοκυττάρων και καρκινικών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους πιθανόν να προκαλέσουν καρκινικές μεταστάσεις (Mantovani 2004). Παραδείγματα γηρασμένων κυττάρων τα οποία είναι πολύ δραστικά και μπορούν να εκκρίνουν δραστικά μόρια είναι τα ηπατικά περικολποειδικά (αστεροειδή) κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Shelton, Chang et al. 1999, Schnabl, Purbeck et al. 2003). Επιπροσθέτως, τα επιθηλιακά κύτταρα των μαστικών αδένων και του προστάτη έχουν δείξει εξίσου αυξημένη έκκριση δραστικών ενώσεων κατά τη γήρανση (Schwarze, Fu et al. 2005, Corpe, Patil et al. 2008).

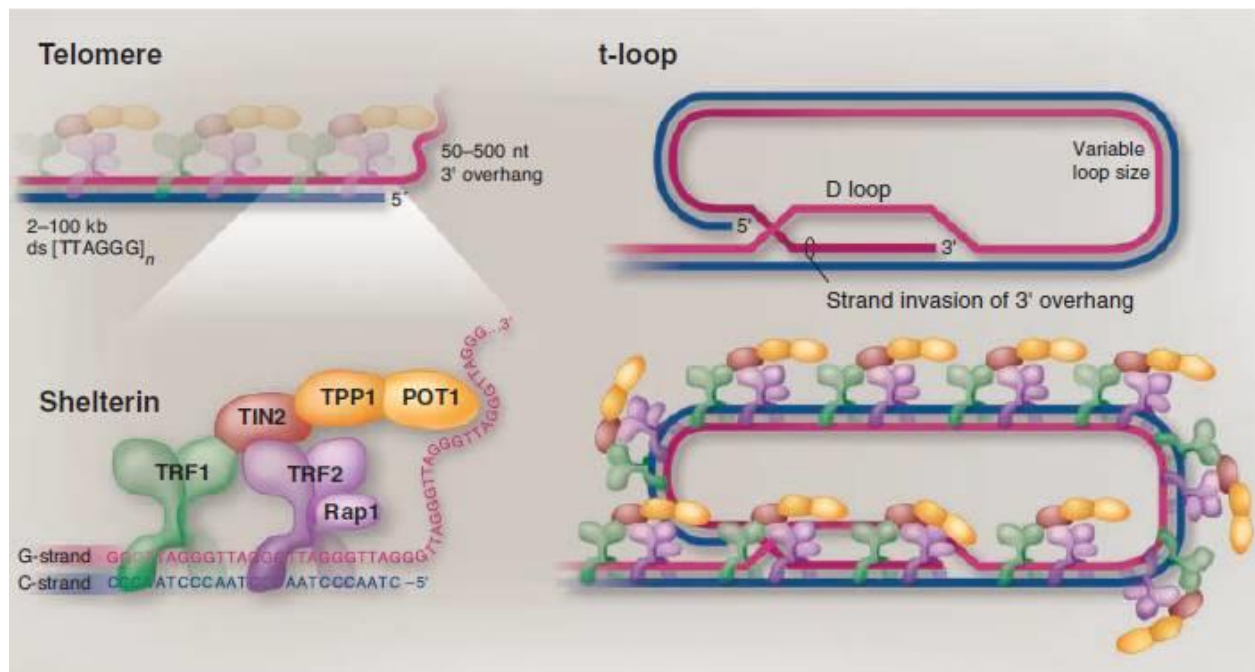
1.3.6 Αιτίες κυτταρικής γήρανσης

1.3.6.1 Μείωση του μήκους των τελομερών

Ο σχεδόν πάντα σταθερός αριθμός των αναδιπλασιασμών που επιτελεί κάθε τύπος ινοβλάστη, στην καλλιέργεια, μέχρι να γηράσει ανέδειξε την ιδέα της ύπαρξης ενός μηχανισμού μέτρησης (counting mechanism), ενός «μιτωτικού ρολογιού». Ήταν στις αρχές τις δεκαετίας του 1970 όταν ο Ολονίκον έκανε την υπόθεση ότι ο μηχανισμός μέτρησης και κύρια αιτία που οδηγεί στη γήρανση είναι η μείωση του μήκους των τελομερών μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση (Ολονίκον 1996).

Τα τελομερή είναι δομές DNA-πρωτεϊνών στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Αποτελούνται από πολλές χιλιάδες βάσεις της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας TTAGGG (15-20 kb στα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα) και προστατεύουν τα κύτταρα «αποτρέποντας» τα να «αναγνωρίζουν» τα άκρα των χρωμοσωμάτων ως δικλωνικές θραύσεις του DNA, εμποδίζοντας έτσι τη σύντηξη των χρωμοσωμάτων. Πρόσθετα, τα τελομερή συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες, όπως η TRF2 και TANK1, οι οποίες έχουν δραστικότητα πολυμεράσης της ADP-ριβόζης (PARP) (Campisi 1997), **Εικόνα 1.9**). Η τελευταία είναι υπεύθυνη για την προστασία του γονιδιώματος. Οι Ολονίκον και Watson ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν «το πρόβλημα της αντιγραφής των τελομερικών άκρων», δηλαδή την αδυναμία της DNA πολυμεράσης να αντιγράψει πλήρως τα άκρα των χρωμοσωμάτων. Κατά την αντιγραφή του DNA η 3'-5' αλυσίδα αντιγράφεται με συνεχή τρόπο από την DNA πολυμεράση ενώ η 5'-3' αλυσίδα αντιγράφεται κατά τμήματα, σχηματίζοντας μια σειρά κομματιών Okazaki και χρησιμοποιώντας μικρά μόρια RNA εκκινητές τα οποία αφαιρούνται κατά το τέλος της αντιγραφής από τη δραστικότητα 5'-3' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης. Η αφαίρεση του RNA εκκινητή από το 3' άκρο της μητρικής αλυσίδας (ατελής αντιγραφή) αφήνει το τελευταίο εκτεθειμένο στη δράση των νουκλεασών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μήκους του τελομερικού DNA σε κάθε κυτταρικό διπλασιασμό (Pfeiffer and Lingner 2013). Ο τύπος της κυτταρικής γήρανσης που προκαλείται από την προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών λόγω των συνεχών αναδιπλασιασμών καλείται αντιγραφική γήρανση (Cristofalo, Lorenzini et al. 2004).

Το πρόβλημα της πλήρους αντιγραφής των τελομερικών άκρων μπορεί να επιλυθεί μέσω της τελομεράσης. Αυτό το ένζυμο προσθέτει τελομερικές DNA επαναλήψεις απευθείας στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Περιέχει ένα συστατικό καταλυτικής πρωτεΐνης (αντίστροφη μεταγραφάση τελομεράσης) και ένα συστατικό RNA εκμαγείου, το οποίο βοηθά στην πρόληψη από την ενεργοποίηση του DDR (Collins and Mitchell 2002). Σε αντίθεση με τα κύτταρα τα οποία δεν είναι πλήρως διαφοροποιημένα, τα περισσότερα σωματικά κύτταρα δεν εκφράζουν το παραπάνω ένζυμο. Εντούτοις, η έκφραση της τελομεράσης στα γεννητικά και σε πολλά καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε σταθεροποίηση του μήκους των τελομερών και αποφυγή της γήρανσης, δηλαδή οδηγεί σε αθανατοποίηση (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).



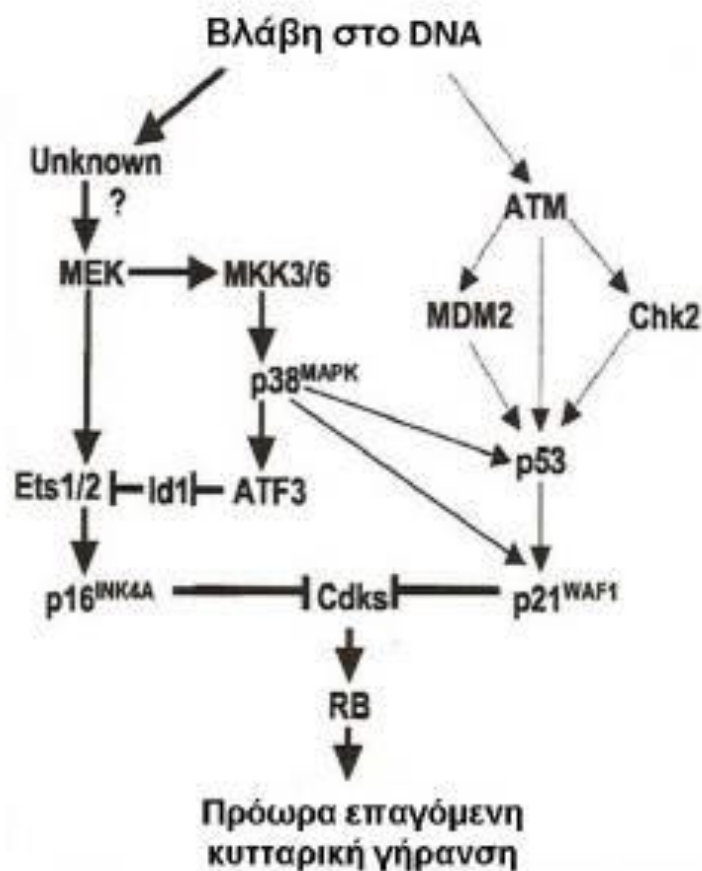
Εικόνα 1.9: Δομή ανθρώπινου τελομερούς (de Lange 2009).

1.3.6.2 Γενωμική βλάβη

Το κύτταρο αποκρίνεται, με διάφορους μηχανισμούς, στην πρόκληση βλαβών του DNA. Οι μηχανισμοί αυτοί επιτρέπουν στο κύτταρο είτε να εξαλείψει ή να αντιμετωπίσει τη βλάβη, είτε να ενεργοποιήσει τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, στην περίπτωση όπου η βλάβη είναι εκτεταμένη. Μια από τις διαδικασίες απόκρισης σε βλάβη του DNA (DNA Damage Response, DDR) είναι και η ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών που καθυστερούν ή καθλώνουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (DNA damage checkpoints) (Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2004). Η πρωτεΐνη του μεταλλαγμένου γονιδίου της αταξίας-τηλαγγειεκτασίας, AT μεταλλαγμένη (ataxia-telangiectasia mutated, ATM) παίζει κρίσιμο ρόλο στην επαγόμενη από βλάβες στο DNA ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η ATM έχει αναδειχτεί ως κεντρικός «παίκτης» της απόκρισης του κυττάρου μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Kurz, Douglas et al. 2004). Είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης όμοιων με 3'-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (phosphatidylinositol 3-kinase-like serine/threonine protein kinases, PIKKs). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη αυτής της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών έτσι και η ATM φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης τα οποία συνοδεύονται από γλουταμίνη (Kim, Lim et al. 1999). Η ATM δρα ως αισθητήρας της βλάβης του DNA και φωσφορυλιώνει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 στο κατάλοιπο της σερίνης 15 (Ser15) καθώς επίσης και τις Chk1/Chk2 κινάσες (checkpoint kinase 1 και checkpoint kinase 2), οι οποίες, με τη σειρά τους, φωσφορυλιώνουν την p53 στο κατάλοιπο της σερίνης 20 (Ser20). Η φωσφορυλιωμένη p53 επάγει τη μεταγραφή της p21, η οποία προσδένεται στο σχηματισμένο σύμπλοκο της κυκλίνης E-Cdk2 και παρεμποδίζει τη δράση του με αποτέλεσμα η pRb να παραμένει υποφωσφορυλιωμένη και συνεπώς ο κυτταρικός κύκλος να καθλώνεται στη φάση G1 (Gadbois, Bradbury et al. 1997). Το γεγονός αυτό οδηγεί είτε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε σε γήρανση.

Επιπλέον, η ενεργοποίηση της κινάσης SAPK/p38 MAPK σε συνθήκες στρες και ειδικότερα μετά από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας, ενδεχομένως παίζει ρόλο στο μηχανισμό επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από έκθεση σε αυτήν

(Paradourou and Kletsas 2011). Το σηματοδοτικό μονοπάτι της p38 MAPK ξεκινά με την ενεργοποίηση της MEK1, η οποία ενεργοποιεί τις MKK3/6 και τελικά μέσω αυτών φωσφορυλιώνεται η p38 MAPK. Η ενεργοποιημένη (φωσφορυλιωμένη) p38 επάγει την έκφραση, μεταξύ άλλων, και του μεταγραφικού παράγοντα ATF3 που καταστέλλει την έκφραση του αναστολέα διαφοροποίησης Id1 (Inhibitor of differentiation, Id) με αποτέλεσμα την Ets1- ή την Ets2-εξαρτώμενη επαγωγή του αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p16^{INK4A} και συνεπώς την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (**Εικόνα 1.10**).



Εικόνα 1.10: Μηχανισμός πρόωρης κυτταρικής γήρανσης ως συνέπεια βλαβών στο DNA (Naka, Tachibana et al. 2004).

1.3.6.3 Διαταραχή της χρωματίνης – Επιγενωμική βλάβη

Η διαμόρφωση της χρωματίνης είναι αυτή που καθορίζει κατά πόσον κάποιο γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό (ευχρωματίνη) ή ανενεργό (ετεροχρωματίνη) και εξαρτάται κυρίως από τις τροποποιήσεις των ιστονών (π.χ. ακετυλίωση και μεθυλίωση) (Parry and Narita 2016). Τα μοτίβα τροποποιήσεων των ιστονών έχουν δυναμικό χαρακτήρα και υπόκεινται στη δράση διαφορετικών ενζύμων. Η πιο γνωστή συνεισφορά των τροποποιήσεων της χρωματίνης στην πρόκληση της γήρανσης σχετίζεται με αλλαγές που συμβαίνουν στο γενετικό τόπο INK4-ARF καθώς και με την παρουσία SAHF (Di Bernardo, Cipollaro et al. 2012, Campisi 2013, Corpet and Stucki 2014).

Όταν πρόκειται για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών μεταξύ φυσιολογικών κυττάρων και γηρασμένων κυττάρων, υπάρχει διαφορετική συμπεριφορά. Οι διαφορές μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες: αλλαγές επί του συνόλου του γονιδιώματος και στοχευμένες αλλαγές. Οι τελευταίες αφορούν εξ' ολοκλήρου ογκοκατασταλτικά γονίδια. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες INK4 και ARF παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη γήρανση. Μετά από αντιγραφικό ή ογκογόνο στρες, οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται, συμμετέχοντας ενεργά στην αναστολή της ανάπτυξης. Αυτό που συμβαίνει σε επίπεδο χρωματίνης είναι η απώλεια κατασταλτικών τροποποιήσεων (π.χ. μεθυλίωση ή από-ακετυλίωση) και η προώθηση της ακετυλίωσης με απώτερο σκοπό την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων του γενετικού τόπου INK4-ARF (Agherbi, Gausmann-Wenger et al. 2009, Simboeck, Ribeiro et al. 2011). Αυτή η διαδικασία ακολουθείται σε γενικές γραμμές για την ενεργοποίηση και άλλων ογκοκαταστολέων.

Σε μοριακό επίπεδο, έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες “Polycomb” συνδέονται με τον γενετικό τόπο INK4a / ARF ενώ διαχωρίζονται από αυτόν κατά τη γήρανση (Agherbi, Gausmann-Wenger et al. 2009, Di Bernardo, Cipollaro et al. 2012). Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ο γενετικός τόπος INK4 εμπλουτίζεται με τρεις μεθυλομάδες στη λυσίνη 27 της ιστόνης H3 (H3K27me3), λόγω της καταλυτικής υπομονάδας μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 του κατασταλτικού συμπλέγματος “Polycomb” 2 (PRC2) που αποκαθιστά τα επίπεδα των κατασταλτικών ρυθμίσεων σε αυτή τη γενετική περιοχή, οδηγώντας στην στρατολόγηση του κατασταλτικού συμπλέγματος “Polycomb” 1 (PRC1) στον τόπο INK4-ARF ο οποίος κατά συνέπεια διατηρείται

μεταγραφικά ανενεργός (Simboeck, Ribeiro et al. 2011, Overhoff, Garbe et al. 2014). Όταν συμβαίνει αντιγραφική γήρανση παρατηρείται μειωμένη έκφραση της υπομονάδας EZH2 και επιστράτευση της πρωτεΐνης JMJD3, που καταλύει την απομάκρυνση των μεθυλομάδων από τη λυσίνη 27 της ιστόνης H3. Η αφαίρεση των μεθυλομάδων σε συνδυασμό με την απομάκρυνση του κατασταλτικού συμπλέγματος PRC1 από το γενετικό τόπο INK4-ARF, προδιαθέτουν ως προς την ενεργοποίηση αυτού (Agherbi, Gausmann-Wenger et al. 2009, Simboeck, Ribeiro et al. 2011).

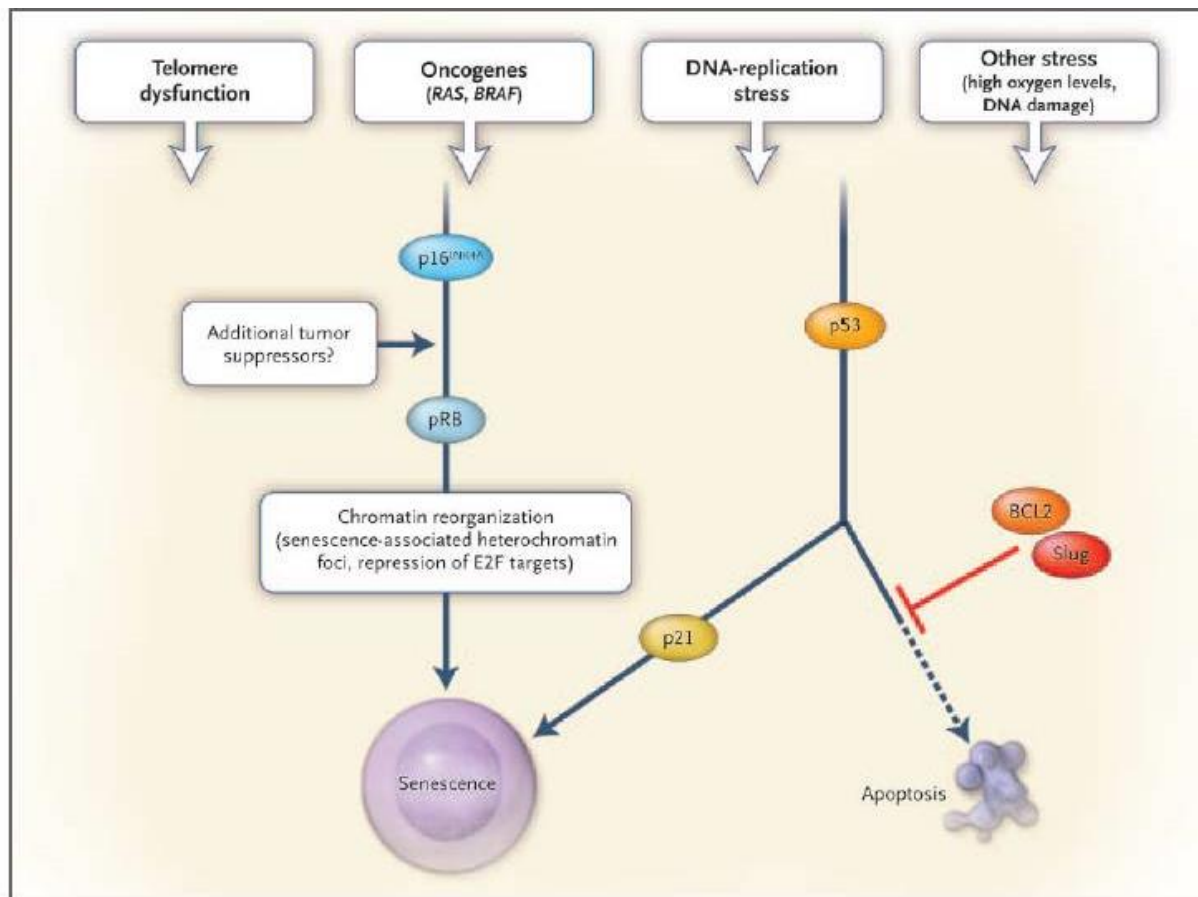
Επιπλέον, η πρωτεΐνη MLL1 (ειδική H3K4 μεθυλοτρανσφεράση) καταλύει την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4, η οποία σχετίζεται με ενεργή μεταγραφή. Τα πρότυπα μεθυλίωσης στις λυσίνες 4 και 27 της ιστόνης H3 έχουν συσχετιστεί με γονιδιακή ενεργοποίηση και καταστολή αντίστοιχα, διαδικασίες που ρυθμίζονται αυστηρά και αποδίδονται σε συγκεκριμένα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης (Mishra, Ansari et al. 2009, Hyun, Jeon et al. 2017).

Σε πιο σφαιρικό επίπεδο, οι τροποποιήσεις των ιστονών που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση έχουν κατασταλτικό χαρακτήρα. Αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση της τριμεθυλίωσης της ιστόνης 3 τόσο στη λυσίνη 9 όσο και στην λυσίνη 27 (H3K9me3 και H3K27me3), η τριμεθυλίωση της ιστόνης 4 στη λυσίνη 20 (H4K20) και η απώλεια της μεθυλίωσης στη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 και επακόλουθη ακετυλίωση (H3K4ac) (Decottignies and d'Adda di Fagagna 2011).

1.3.6.4 Κυτταρική γήρανση προκαλούμενη από ογκογονίδια (OIS)

Αυτού του τύπου η γήρανση θεωρείται ως “πρόωρη” γήρανση και προκαλείται όταν ενισχύεται η δράση ορισμένων τύπων ογκογονιδίων υπό την παρουσία φυσιολογικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αυτοί οι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες συνήθως δρουν ανοδικά σε σχέση με αυτά τα ογκογονίδια (Collado and Serrano 2010). Παραδείγματα τέτοιων ογκογονιδίων είναι τα Ras, PI3K, HIFα, E2F, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλονται από τα neurofibromin 1 (NF1), PTEN, VHL και RB αντίστοιχα (Collado, Blasco et al. 2007). Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση αυτών των ογκογονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση αντίστοιχων ογκοκατασταλτικών παραγόντων που δρουν καθοδικά και που μπορεί να οδηγήσουν σε γήρανση. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της αντιγραφικής και πρόωρης γήρανσης είναι η κρίσιμη συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών p53-p21 και pRB-p16^{INK4A} (**Εικόνα 1.11**).

Σε ανθρώπινους ινοβλάστες όπως οι IMK90, η p16 φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερο ζωτικό ρόλο στην επαγόμενη από ογκογονίδια γήρανση σε σχέση με την p53, καθώς τα κύτταρα αυτά βασίζονται κυρίως στην p16 για την επαγωγή γήρανσης (Serrano, Lin et al. 1997). Εν τούτοις, σε κύτταρα τρωκτικών όπως τα REF52, η p53 επέδειξε έναν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή γήρανσης μετά από ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Ras (Serrano, Lin et al. 1997). Αυτό δείχνει σαφώς ότι ο τύπος του κυττάρου είναι σημαντικός για τον προσδιορισμό του ογκοκατασταλέα που θα μπορούσε να είναι απαραίτητος για την πρόκληση γήρανσης εξαρτώμενης από ογκογονίδιο. Έκτοτε, ο μηχανισμός OIS έχει περιγραφεί σε αρκετές περιπτώσεις και θεωρείται ότι μπορεί να επιτελέσει διπλό ρόλο σε σχέση με τον καρκίνο, είτε αναστέλλοντας την πορεία της καρκινογένεσης μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου είτε προωθώντας την μέσω της αλληλεπίδρασης των γηρασμένων κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και την πρόκληση μιας χρόνιας φλεγμονής που οδηγεί σε διαφυγή από τη γήρανση (Gorgoulis and Halazonetis 2010, Liu, Ding et al. 2018).



Εικόνα 1.11: Στρεσογόνα ερεθίσματα που ενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά δίκτυα. Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών p53-p21 και pRB-p16^{INK4A} στην πρόκληση αντιγραφικής και πρόωρης γήρανσης (Mooi and Peerer 2006).

1.3.7 Δείκτες γήρανσης

Η κυτταρική γήρανση στηρίζεται στη σταθερή διακοπή του κυτταρικού κύκλου, έτσι η απουσία δεικτών πολλαπλασιασμού όπως για παράδειγμα η ενσωμάτωση της 5-βρωμοδεοξουριδίνης (**BrdU**) αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την πιστοποίηση του γηρασμένου φαινοτύπου (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Η BrdU αποτελεί ένα συνθετικό νουκλεοσίδιο και δομικό ανάλογο της θυμιδίνης. Αναγνωριζόμενο ως θυμιδίνη από τα κύτταρα, η BrdU ενσωματώνεται ως μέρος της σύνθεσης του DNA (κατά τη διάρκεια της S φάσης του κυτταρικού κύκλου). Τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται πρόκειται να ενσωματώσουν περισσότερο BrdU σε σχέση με εκείνα που δεν έχουν πολλαπλασιαστική ικανότητα. Με τον εντοπισμό του ενσωματωμένου χημικού αναλόγου, μπορεί να προσδιοριστεί ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Mead and Lefebvre 2014). Άλλη μέθοδος μέτρησης του πολλαπλασιασμού είναι η ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών όπως το **PCNA** και το **Ki-67**. Ωστόσο οι παραπάνω δείκτες δεν θεωρούνται ειδικοί για τη γήρανση, διότι δεν διακρίνουν μεταξύ κυττάρων σε γήρανση και κυττάρων που βρίσκονται σε ηρεμία ή διαφοροποιημένων μετα-μιτωτικών κυττάρων. Παρόλο που η απουσία τους, από μόνη της, δεν επιβεβαιώνει την ύπαρξη γήρανσης, πολλοί τύποι γηρασμένων κυττάρων χαρακτηρίζονται από αυτήν (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Οι καταρράκτες μεταγωγής σήματος p53 και p16^{INK4a}-Rb ενεργοποιούνται συνήθως σε γήρανση. Ο λόγος για τον οποίο έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως βιοδείκτες για την ταξινόμηση των κυττάρων σε γήρανση. Άλλες πρωτεΐνες που μετέχουν στις οδούς p16^{INK4a}-Rb και p53, όπως οι **p21** και **p15^{INK4b}**, συσσωρεύονται επίσης συχνά σε γηρασμένα κύτταρα και έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες ενεργοποίησης των δύο κύριων ογκοκατασταλτικών μονοπατιών της γήρανσης (Carnero 2013). Εντούτοις, η πρωτεΐνη p16^{INK4a}, για παράδειγμα, εκφράζεται από πολλά, αλλά όχι όλα, τα κύτταρα σε γήρανση ενώ εκφράζεται επίσης και από ορισμένα κύτταρα όγκου, ιδιαίτερα από εκείνα που έχουν χάσει τη λειτουργία της pRB. Για το λόγο αυτό δεν θεωρείται ειδικός δείκτης και δεν χρησιμοποιείται μεμονωμένα αλλά σε συνδυασμό και με την ανοσοεντόπιση και άλλων ογκοκατασταλτικών μορίων (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

Ο πρώτος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για τον πιο συγκεκριμένο προσδιορισμό των κυττάρων σε γήρανση ήταν η **SA-β-gal**. Αυτός ο δείκτης είναι ανιχνεύσιμος με

ιστοχημική χρώση στα περισσότερα κύτταρα σε γήρανση σε pH 6.0 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με άλλους συμπληρωματικούς μοριακούς δείκτες (Collado and Serrano 2010). Η SA-β-gal έχει παρατηρηθεί, ωστόσο, σε pH 6,0 και σε υψηλής πυκνότητας πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Yang and Hu 2005). Επιπλέον, η ενεργότητα της SA-β-gal έχει ανιχνευθεί και σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία (φάση G0) σε χαμηλή συγκέντρωση ορού (Yegorov, Akimov et al. 1998). Επιπλέον, η απουσία ορού και η προσθήκη H₂O₂ σε καλλιέργεια κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας της SA-β-gal σε pH 6.0 (Yang and Hu 2005). Τα μειονεκτήματα αυτά συνηγορούν στο γεγονός ότι η SA-β-gal δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα για την ανίχνευση της γήρανσης χωρίς συμπληρωματικούς δείκτες. Ένα ακόμη 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 μεταμιτωτικά κύτταρα. Ο συν-εντοπισμός της λιποφουσκίνης και της SA-β-gal στα γηρασμένα κύτταρα *in vitro* και *in vivo* (κρυο-διατηρημένου ιστού), υποστηρίζει σθεναρά 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 (Georgakourou, Tsimaratou et al. 2013). Πρόσφατα οι Evangelou et al παρουσίασαν μια πρωτοποριακή μέθοδο ανίχνευσης γηρασμένων κυττάρων από ένα ευρύ φάσμα βιολογικών υλικών (π.χ. κύτταρα σε καλλιέργεια, παγωμένο ή φρέσκο ιστό, αρχειακό υλικό) βασισμένη στο σχεδιασμό και τη σύνθεση ενός χημικού αναλόγου του SBB που ονομάζεται **GL13**. Η νέα αυτή χημική ένωση αποτελεί ένα ευέλικτο εργαλείο για την ανίχνευση της κυτταρικής γήρανσης με την ίδια ειδικότητα όπως και το SBB, αλλά με εξαιρετικά βελτιωμένη ευαισθησία και ενισχυμένη αναλογία ειδικού σήματος/θορύβου (Evangelou, Lougiakis et al. 2017).

Κατά τη διάρκεια της γήρανσης των κυττάρων, η δομή της χρωματίνης υφίσταται διάφορες μεταβολές που εμφανίζονται ως ένα κοκκιώδες μοτίβο. Οι μεταβολές αυτές κάνουν τα γηρασμένα κύτταρα λιγότερο ευαίσθητα στην πέψη από νουκλεάσες (Narita, Nuñez et al. 2003). Αντίθετα, η χρώση του DNA των αναπτυσσόμενων κυττάρων εμφανίζεται κανονικά ως ένα περίγραμμα ομοιόμορφου χρώματος. Ως εκ τούτου, ο φαινότυπος **SAHF** είναι ένα πολύ συγκεκριμένο χαρακτηριστικό της γήρανσης και δεν μπορεί να παρατηρηθεί στην αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, όπως η ηρεμία (Narita, Nuñez et al. 2003). Από την άλλη πλευρά, ο SAHF δεν είναι καθολικός δείκτης γήρανσης μιας και δεν μπορεί να παρατηρηθεί σε όλους τους τύπους κυττάρων που υποβάλλονται σε γήρανση. Σε προ-κακοήθεις βλάβες, τα γηρασμένα κύτταρα δεν σχηματίζουν πάντα SAHF (Kosar, Bartkova et al. 2011). Ωστόσο, παρατηρείται κυρίως κατά την αντιγραφική γήρανση καθώς και σε μερικά κύτταρα που υφίστανται γήρανση επαγόμενη από ογκογονίδια (OIS) (Narita, Nuñez et al. 2003). Επιπλέον, μερικοί ινοβλάστες που υποβάλλονται σε OIS δεν σχηματίζουν SAHF. Συνήθως παρατηρείται σε κύτταρα που εισέρχονται σε φάση γήρανσης προκαλούμενη από δοξορουβικίνη, βακτηριακή δηλητηρίαση και διάβρωση των τελομερών (Kosar, Bartkova et al. 2011).

Πρόσφατα, ο Swanson και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν την εμφάνιση γήρανσης σχετιζόμενης με τη χαλάρωση του ετεροχρωματινικού δορυφορικού DNA στα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων (**SADS**), η οποία αποτελεί διακριτό χαρακτήρα για όλους τους τύπους γήρανσης συμπεριλαμβανομένων των προ-γηρασμένων κυττάρων. Η αποκάλυψη του δορυφορικού DNA λαμβάνει χώρα στα αρχικά στάδια του σχηματισμού γήρανσης και διαφέρει από το φαινότυπο SAHF. Επίσης επηρεάζει τους p16 και p21- εξαρτώμενους μηχανισμούς της γήρανσης κάτι που καθιστά το φαινότυπο SADS ως ένα ειδικό δείκτη χρωματινικής αλλαγής σε κατάσταση γήρανσης (Swanson, Manning et al. 2013).

1.3.8 Σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης

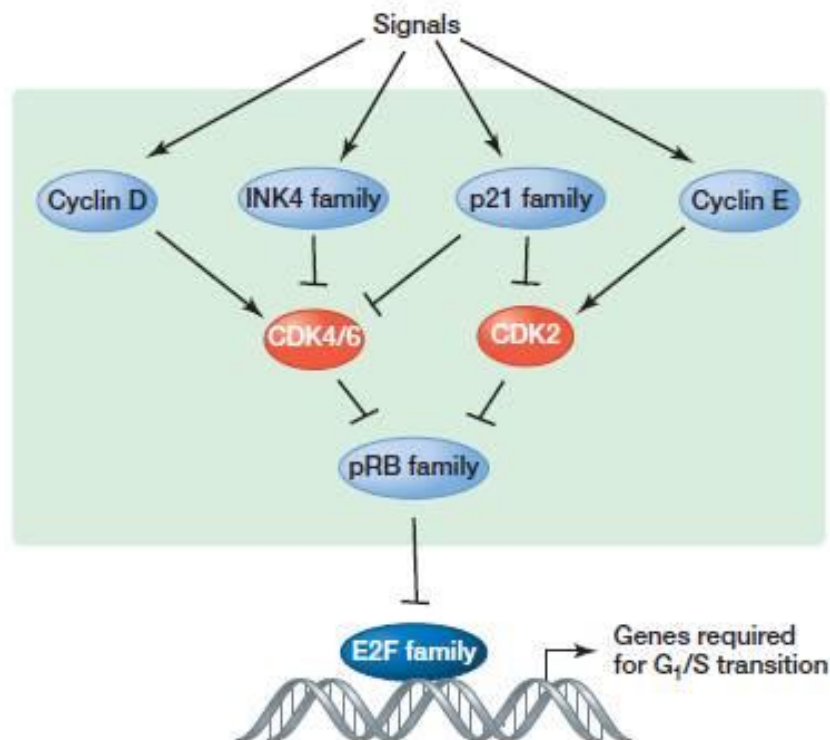
Μονοπάτια p16-pRb/p53-p21 και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Με τη διαδικασία της γήρανσης επιτυγχάνεται η καθήλωση του κυτταρικού κύκλου και κατά αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η μεταφορά των προκαλούμενων από τα διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα βλαβών στην επόμενη γενιά κυττάρων και συνεπώς περιορίζεται η πιθανότητα εμφάνισης κακοήθους μετασχηματισμού (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

Η πιο εντυπωσιακή μεταβολή στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα γηρασμένα κύτταρα είναι η αδυναμία τους να φωσφορυλιώσουν πλήρως την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, μετά από την επίδραση μιτογόνων ερεθισμάτων. Η φωσφορυλίωση της pRb και η ακόλουθη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα E2F αποτελεί κρίσιμο σημείο για τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η μετάβαση αυτή επιτυγχάνεται με την επαγόμενη από τον E2F έκφραση μιας σειράς γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στο μηχανισμό της σύνθεσης του DNA. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η φωσφορυλίωση της pRb επιτυγχάνεται μέσω των συμπλόκων των κυκλινών με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες. Πιο συγκεκριμένα, η κινάση Cdk2 δημιουργεί σύμπλοκα με τις κυκλίνες A και E, ενώ οι κινάσες Cdk4 και Cdk6 με την κυκλίνη D. Στα γηρασμένα κύτταρα, παρατηρείται υπερέκφραση της p16^{INK4A}. Η τελευταία αναστέλλει τη λειτουργία των συμπλόκων της κυκλίνης D με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες 4/6, εμποδίζοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της pRb και οδηγώντας στην αποσιώπηση του E2F, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την καθήλωση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Rayess, Wang et al. 2012) (**Εικόνα 1.12**).

Παράλληλα, στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται και υπερέκφραση της p19^{ARF} (στον άνθρωπο p14^{ARF}). Η p19 αναστέλλει την ογκοπρωτεΐνη MDM2 σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Ko, Han et al. 2016). Στο 50% των μορφών καρκίνου που εμφανίζονται στον άνθρωπο το γονίδιο της p53 είναι μεταλλαγμένο και η αντίστοιχη πρωτεΐνη είτε έχει αλλοιωμένη λειτουργικότητα είτε είναι

απενεργοποιημένη. Η δράση της p53, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφής του αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21. Η p21 είναι ένας καθολικός αναστολέας του κυτταρικού κύκλου, καθώς μπορεί να προσδένεται στα σχηματισμένα σύμπλοκα της κυκλίνης D-Cdk4/6, της κυκλίνης E-Cdk2 και της κυκλίνης A-Cdk2, και να παρεμποδίζει τη δράση τους με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος να παραμένει υποφωσφορυλιωμένη (Liu, Zhang et al. 2014, Georgakilas, Martin et al. 2017). Στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται υπερενεργοποίηση της p53 και υπερέκφραση της p21 (Qian and Chen 2013, Kim, Jee et al. 2017). Είναι ενδιαφέρον ότι η p21 μπορεί επίσης να προκαλέσει γήρανση μέσω ενός p53 ανεξάρτητου τρόπου μέσω του παράγοντα TGFβ (Wu, Cetinkaya et al. 2003).



Εικόνα 1.12: Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 από το μονοπάτι της pRb. Η συμβολή διαφόρων κυτταρικών διεργασιών στη λειτουργία αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού και επομένως στον έλεγχο της G1 φάσης επιτυγχάνεται κυρίως μέσω ρύθμισης της δράσης των κυκλινών και των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CKIs) (Duronio and Xiong 2013).

1.3.9 Κυτταρική γήρανση και Καρκίνος

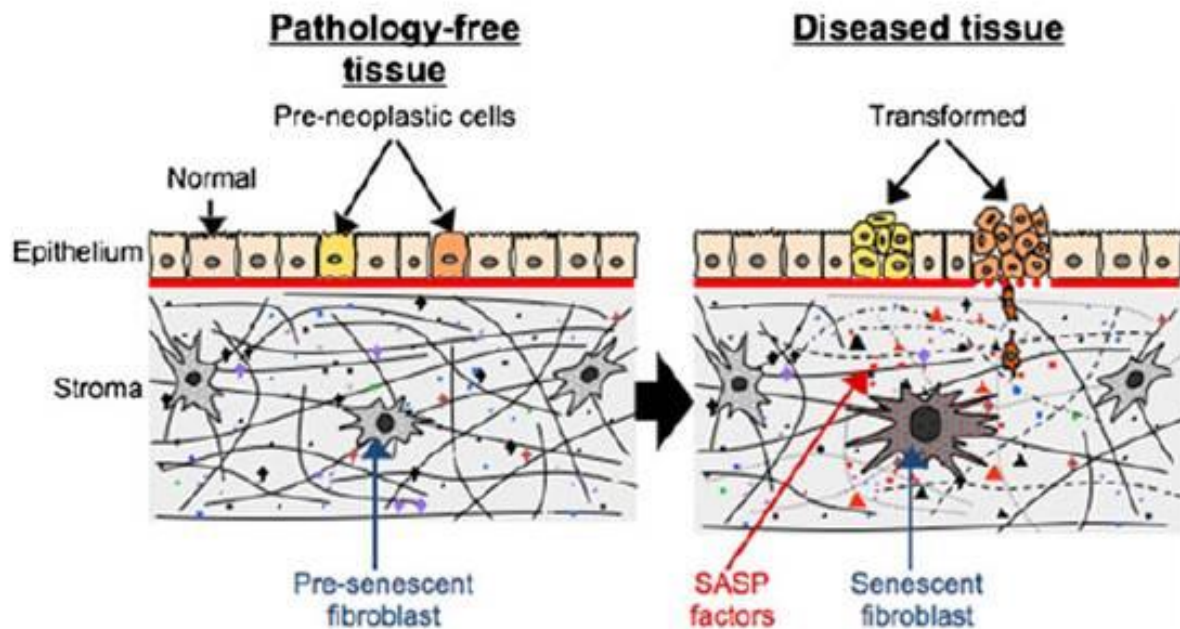
Όπως έχει ήδη αναφερθεί η κυτταρική γήρανση παίζει έναν κρίσιμο ρόλο ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας στην πορεία της καρκινογένεσης. Ιδιαίτερα σε προνεοπλασματικές βλάβες, περιορίζει περαιτέρω τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τεχνητά προκαλούμενη γήρανση μπορεί να προκύψει από την εφαρμογή αντικαρκινικών θεραπειών. Οι ογκοκατασταλτικοί μηχανισμοί είναι απαραίτητοι για την επιβίωση πολύπλοκων πολυκύτταρων οργανισμών. Ωστόσο, φαίνεται ότι δεν είναι αποκλειστικά επωφελείς και μάλλον αντιπροσωπεύουν ένα δίκκοπο μαχαίρι ως προς την εξελικτική πορεία του καρκίνου (Schosserer, Grillari et al. 2017).

Τα γηρασμένα κύτταρα, τα οποία συσσωρεύονται στους ιστούς, δεν έχουν πλέον σωστή λειτουργία ενώ συμβάλλουν και στην εξάντληση της ικανότητας των ιστών για αυτοανανέωση. Επιπροσθέτως, ο εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (SAPS) διαταράσσει την ομοιοστασία των ιστών μέσω της έκκρισης ενζύμων αποικοδόμησης και προφλεγμονοδών κυτοκινών τα οποία μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη παθολογιών σχετιζόμενων με την ηλικία (Schosserer, Grillari et al. 2017). Πράγματι, παρατηρήθηκε συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων σε θέσεις αθηροσκλήρυνσης σχετιζόμενης με την ηλικία (Chang and Harley 1995). Ακόμα πιο σημαντική είναι η συνεισφορά του SAPS στην ανάπτυξη του καρκίνου (Krtolica, Parrinello et al. 2001, Schosserer, Grillari et al. 2017). Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την παρατηρούμενη γενική αύξηση της μφάνισης του καρκίνου κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Meza, Jeon et al. 2008). Ο αντιφατικός ρόλος της γήρανσης μπορεί να εξηγηθεί με τη εξελικτική θεωρία της “ανταγωνιστικής πλειοτροπίας” που περιγράφηκε στην ενότητα 1.3.3 (Kirkwood and Austad 2000, Campisi 2013).

1.3.9.1 Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην ογκογένεση

Στο παρελθόν είχε διατυπωθεί η υπόθεση ότι η συσσώρευση, στους ιστούς των ηλικιωμένων ατόμων, γηρασμένων κυττάρων με τις λειτουργικές αλλαγές που φέρουν, όπως υπερέκκριση πρωτεασών, φλεγμονωδών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός επιτρεπτικού μικροπεριβάλλοντος για την ανάπτυξη επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων, γεγονός που συνεισφέρει στην αυξημένη καρκινογένεση κατά τη γήρανση (Campisi 1997). Η υπόθεση αυτή ήταν βασισμένη στο γεγονός ότι οι γηρασμένοι ινοβλάστες αποκτούν έναν ιδιαίτερο προ-φλεγμονώδη φαινότυπο που προσομοιάζει σε αυτόν των ενεργοποιημένων στρωματικών ινοβλαστών της περιοχής του όγκου. Αυτό σημαίνει ότι παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένη έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (matrix metalloproteinases, MMPs), των ενζύμων δηλαδή που αποικοδομούν το κολλαγόνο, και κατά συνέπεια αντί να συνθέτουν την εξωκυττάρια μήτρα την καταβολίζουν με αποτέλεσμα να αλλοιώνουν το τοπικό κυτταρικό μικροπεριβάλλον συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του όγκου *in vivo* (Campisi, Andersen et al. 2011). Άλλα συστατικά του SASP όπως IL-6, IL-8 και GRO προωθούν επίσης την εισβολή των κυττάρων του όγκου, ενώ ο VEGF προωθεί την όγκο-επαγόμενη αγγειογένεση (Coppe, Kauser et al. 2006, Campisi, Andersen et al. 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε συγκαλλιέργεια δερματικών ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων βρέθηκε ότι οι γηρασμένοι ινοβλάστες διεγείρουν εκλεκτικά την ανάπτυξη αθανатоποιημένων και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα, φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα δεν ευνοούνται από την παρουσία των γηρασμένων ινοβλαστών (Krtolica, Parrinello et al. 2001). Επίσης, πρόωρα γηρασμένοι ινοβλάστες μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία αλλά και πνευμονικοί στρωματικοί ινοβλάστες που υπέστησαν αντιγραφική γήρανση μετά από ένεση σε ανοσοκατασταλμένους ποντικούς “συνεργάστηκαν” με ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος και προκάλεσαν την ανάπτυξη μεγάλων και επιθετικών όγκων (Papadopoulou and Kletsas 2011). Όλα τα ανωτέρω, υποδεικνύουν ότι η γήρανση των κυττάρων του στρώματος αποτελεί έναν από τους παράγοντες που οδηγούν στην καρκινογένεση κυρίως μέσω του φαινοτύπου SASP (**Εικόνα 1.13**). Οι επιβλαβείς επιδράσεις του SASP στα επιθηλιακά κύτταρα συνοψίζονται στα εξής: 1) ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, 2) από-

διαφοροποίηση, 3) επιθηλιακός προς μεσεγχυματικό μετασχηματισμό (EMT), 4) μετάσταση και διείσδυση, 5) κυτταρική επιβίωση, 6) διαφυγή ανοσοεπιτήρησης (Davalos, Corpe et al. 2010).



Εικόνα 1.13: Προτεινόμενο μοντέλο για τη συνεισφορά της παρακρινούς δράσης των γηρασμένων ινοβλαστών του στρώματος στην καρκινογένεση. Κατά τη γήρανση του οργανισμού, γηρασμένα κύτταρα (γηρασμένοι ινοβλάστες) συσσωρεύονται και εκκρίνουν αποικοδομητικά ένζυμα και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αλλοιώνοντας τη δομή του ιστού και συνεπώς και τη λειτουργία του δημιουργώντας ένα “επιτρεπτικό μικροπεριβάλλον” για τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα την ογκογένεση (Davalos, Corpe et al. 2010).

1.3.9.2 Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην ογκοκαταστολή

Στη συγκρότηση όλων των ιστών των πολυκύτταρων οργανισμών συμμετέχουν κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να διαιρούνται (**mitotic cells**) και κύτταρα τα οποία έχουν απολέσει τη συγκεκριμένη ικανότητα (**postmitotic cells**). Στα θηλαστικά, για παράδειγμα, κύτταρα ικανά προς διαίρεση είναι τα επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα οργάνων όπως το δέρμα, το έντερο, το ήπαρ και τα νεφρά ενώ αντίθετα παράδειγμα κυττάρων τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού αποτελούν τα ώριμα νευρικά κύτταρα, τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς καθώς επίσης και τα λιποκύτταρα. Υπάρχουν μιτωτικά κύτταρα που διαιρούνται διαρκώς αλλά και μιτωτικά κύτταρα στα οποία η εκτέλεση κυτταρικής διαίρεσης υπαγορεύεται αυστηρά από τις ανάγκες του οργανισμού για αντικατάσταση των κυττάρων ή/και επιδιόρθωση του ιστού. Η ύπαρξη των μιτωτικών κυττάρων στους ιστούς των οργανισμών προσδίδει στους τελευταίους το πλεονέκτημα της ανανέωσης και της επιδιόρθωσης των ιστών όποτε απαιτείται. Παρόλα αυτά, κατά την διαδικασία της διαίρεσης του κυττάρου και λόγω του αναδιπλασιασμού του DNA ελλοχεύει ο κίνδυνος απόκτησης μεταλλάξεων οι οποίες αποτελούν τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου (Friedberg, Wagner et al. 2002, Thompson and Schild 2002, Kunkel 2004). Έτσι, κατά την εξελικτική τους πορεία, οι οργανισμοί με ανανεώσιμους ιστούς ανέπτυξαν αποτρεπτικούς μηχανισμούς απέναντι στην ανάπτυξη του καρκίνου. Οι εν λόγω μηχανισμοί διακρίνονται σε δυο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία ογκοκατασταλτικών μηχανισμών (caretaker tumor suppressors) δρα στο γονιδίωμα και συγγρατεί την εμφάνιση μεταλλάξεων αποτρέποντας ή επιδιορθώνοντας τις βλάβες στο DNA. Η δεύτερη κατηγορία ογκοκατασταλτικών μηχανισμών (gatekeeper tumor suppressors), σε αντίθεση με την πρώτη, δρα στα κύτταρα είτε οδηγώντας τα στο θάνατο (απόπτωση) είτε προκαλώντας τη μόνιμη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (κυτταρική γήρανση) (Kinzler and Vogelstein 1997). Η κυτταρική γήρανση επομένως, μέσω της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών που αναφέρθηκαν στην ενότητα 1.3.8, αποτελεί έναν πολύ ισχυρό ογκοκατασταλτικό μηχανισμό, τουλάχιστον στους νεαρούς οργανισμούς, γιατί αποτρέπει την ανάπτυξη των δυνητικά καρκινικών κυττάρων και διασφαλίζει την ομαλή λειτουργία των ιστών του οργανισμού (Campisi 2005).

Παρ' ότι πιστεύεται ότι ο φαινότυπος SASP μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη του όγκου και επίσης να μεταβάλλει το μικροπεριβάλλον που τον πλαισιώνει, πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει τον ρόλο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών λόγω SASP στην προώθηση της κυτταρικής γήρανσης και τη διακοπή της ανάπτυξης των όγκων. Ένα παράδειγμα αποτελεί η εκκρινόμενη πρωτεΐνη IGFBP7, η έλλειψη της οποίας σε χρόνιες βλάβες του δέρματος ευνοεί την πρόοδο του μελανώματος (Wajareyee, Serra et al. 2008). Επιπλέον οι Acosta et al έδειξαν ότι κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης λόγω της επίδρασης ογκογονιδίων εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR2 ο οποίος συμβάλλει στη διατήρηση του γηρασμένου φαινότυπου μέσω ενός αυτό-διεγειρόμενου μηχανισμού με τη βοήθεια των προσδετών του (Acosta, Banito et al. 2013). Αυτές οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν επίσης να δημιουργήσουν μια ανοσοαπόκριση έναντι των γηρασμένων κυττάρων με επακόλουθη εξάλειψη τους (Xue, Zender et al. 2007).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα γηρασμένα κύτταρα ελκύουν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι πλήρως κατανοητοί και θεωρείται ότι σχετίζονται με το φαινότυπο SASP. Οι Xue et al διεξήγαγαν την πρώτη μελέτη προκειμένου να δείξουν τη σχέση μεταξύ ανοσολογικής απάντησης και γηρασμένων κυττάρων. Βρήκαν ότι συγκεκριμένες προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες προερχόμενες από τα γηρασμένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τη φυσική ανοσολογική απόκριση η οποία μεσολαβεί για τη φαγοκυττάρωση των κυττάρων αυτών (Xue, Zender et al. 2007). Πρόσφατα, οι Kang et al διερεύνησαν την αλληλεπίδραση προ-καρκινικών γηρασμένων ηπατοκυττάρων με την επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Εκκρινόμενες κυτοκίνες και χημειοκίνες από αυτά τα κύτταρα ελκύουν CD4+ T λεμφοκύτταρα προς εκκαθάρισή τους. Γηρασμένα ηπατοκύτταρα τα οποία εξέφραζαν το ογκογονίδιο Nras^{G12v} εκκαθαρίστηκαν από συγκεκριμένα Th1 λεμφοκύτταρα πράγμα που σημαίνει ότι η “ανοσολογική παρακολούθηση της γήρανσης” βασίστηκε στην αποτελεσματική δράση το επίκτητου ανοσολογικού μηχανισμού (Kang, Yevsa et al. 2011). Προς υποστήριξη των παραπάνω ευρημάτων τα γηρασμένα κύτταρα που εξέφραζαν το ογκογονίδιο Nras^{G12v} σε ποντίκια χωρίς CD4+ T λεμφοκύτταρα ή με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια δεν υπέστησαν εκκαθάριση από το επίκτητο ανοσολογικό σύστημα. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου (Kang, Yevsa et al. 2011).

1.4 Σύνδρομο Li-Fraumeni

Τροποποιήσεις που αφορούν το γονίδιο TP53 αποτελούν το συχνότερο φαινόμενο στον ανθρώπινο καρκίνο. Γεννητικές μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 έχουν επίσης παρατηρηθεί στο σύνδρομο Li-Fraumeni, ένα μοναδικό σύνδρομο προδιάθεσης καρκίνου, το οποίο θα περιγραφεί. Περαιτέρω κατανόηση του ρόλου του TP53 έχει προέλθει από τη μελέτη της μεταλλαγμένης μορφής του στον ανθρώπινο καρκίνο.

Το 1969, οι Li και Fraumeni περιέγραψαν έναν σχηματισμό όγκων που υποδήλωνε ένα προηγουμένως μη αναγνωρισμένο αυτοσωμικό κυρίαρχο οικογενές σύνδρομο (Li and Fraumeni 1969). Αφού πραγματοποιήθηκε επιδημιολογική έρευνα σε 650 παιδιά με ραβδομυοσάρκωμα, αναγνωρίστηκαν 4 οικογένειες με το πιθανολογούμενο σύνδρομο. Άλλοι όγκοι, συμπεριλαμβανομένων των σαρκωμάτων μαλακών ιστών πρώιμης εκδήλωσης και των οστεοσαρκωμάτων, του καρκίνου του μαστού, των εγκεφαλικών όγκων και της λευχαιμίας, εντοπίστηκαν επίσης σε μέλη οικογένειας πρώτου βαθμού (Vulliamy, Marrone et al. 2004). Μέσα από μια μελέτη ίασης διαπιστώθηκε ότι σε μια περίοδο 12 ετών, 10 από τα 31 μέλη που επιβίωσαν ανέπτυξαν 16 επιπλέον καρκίνους, ξεπερνώντας κάθε πιθανότητα που εναπόκειται στην τύχη. Το 1988, οι Li και Fraumeni ανέφεραν 24 προσβεβλημένες οικογένειες που πληρούσαν τα ακόλουθα κριτήρια: 3 στενοί συγγενείς με τεκμηριωμένο καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου ενός ατόμου, που χαρακτηρίστηκε ως ο αρχικός ασθενής, με σάρκωμα πριν από τα 45 έτη, ένας πρώτου βαθμού συγγενή με καρκίνο σε αυτό το ηλικιακό εύρος και έναν στενό συγγενή (πρώτου ή δεύτερου βαθμού της ίδιας γενιάς) με καρκίνο σε αυτό το ηλικιακό εύρος ή σάρκωμα σε οποιαδήποτε ηλικία (Li, Fraumeni et al. 1988). Με βάση τα παραπάνω κριτήρια καθορίστηκε και ο κλινικός ορισμός του κλασσικού συνδρόμου Li-Fraumeni (**LFS**).

1.4.1 Η γενετική αιτιολογία του συνδρόμου Li-Fraumeni

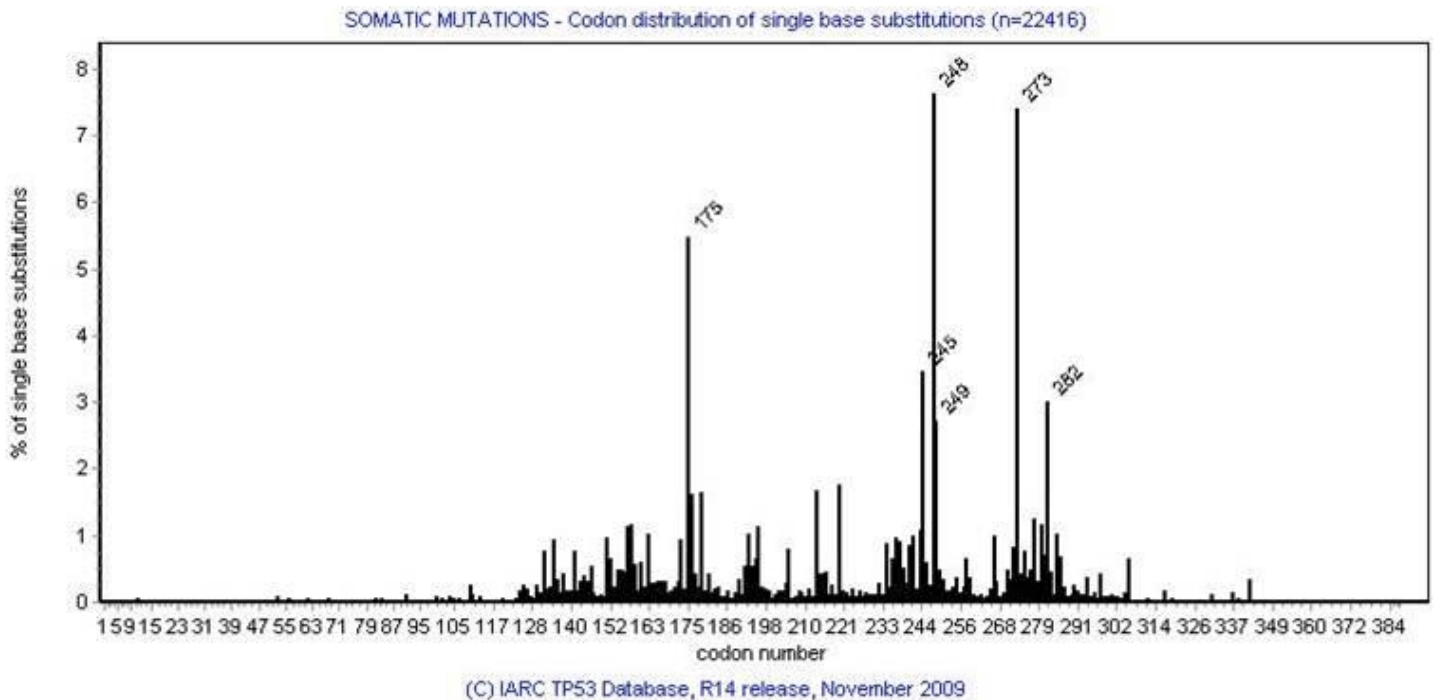
Αν και θεωρούνταν ότι υπάρχει ένας κοινός αιτιολογικός παράγοντας στις οικογένειες με το σύνδρομο, αρκετοί ήταν οι παράγοντες που εμπόδισαν την αναγνώριση του γονιδίου υπεύθυνου για το LFS. Λόγω της σπανιότητας του συνδρόμου και της υψηλής θνησιμότητας, τα διαθέσιμα δείγματα ιστών ήταν περιορισμένα. Επιπλέον, η ανάλυση κλασικής γενετικής σύνδεσης ήταν δύσκολη και δεν βρέθηκαν καρυοτυπικές ανωμαλίες. Το 1990 οι Malkin και συνεργάτες χρησιμοποίησαν μια προσέγγιση υποψήφιου γονιδίου για την αναγνώριση μεταλλάξεων TP53 σε οικογένειες με LFS (Malkin, Li et al. 1990). Και οι πέντε από τις οικογένειες που μελετήθηκαν σε αυτή την αρχική έκθεση είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53. Επιβεβαιώνοντας αυτά τα αρχικά ευρήματα, υπάρχουν τώρα πολυάριθμες ανεξάρτητες αναφορές ασθενών που φιλοξενούν μεταλλάξεις TP53 βλαστικής σειράς (UMD TP53 database) (Varley, McGown et al. 1997, Sedlacek, Kodet et al. 1998, Guran, Tunca et al. 1999, Bougeard, Limacher et al. 2001).

1.4.2 Φάσμα μεταλλάξεων TP53, τύπος και συχνότητα

Το TP53 ήταν το περισσότερο καλά αλληλουχούμενο σχετιζόμενο με τον καρκίνο γονίδιο στο γένωμα πριν η αλληλούχηση υψηλής ανάλυσης να γίνει ρουτίνα (Olivier, Hollstein et al. 2010). Η συχνότητα των μεταλλάξεων TP53 σε συγκεκριμένους τύπους όγκων, καθώς και το φάσμα των αναφερόμενων μεταλλάξεων, έχουν δώσει πληροφορίες για τις καρκινογόνες διεργασίες, τις πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο άνθρωποι φορείς μεταλλάξεων του TP53 βλαστικών κυττάρων καθώς και για τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης p53.

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων TP53 βλαστικής σειράς εντοπίζονται εντός του πεδίου δέσμευσης DNA του TP53 (**Εικόνα 1.14**). Αυτή η περιοχή έχει εντοπιστεί στο κεντρικό τμήμα του γονιδίου μεταξύ των θέσεων 102-292, και είναι εξαιρετικά ανθεκτική στην πρωτεολυτική πέψη, υποδηλώνοντας ότι είναι μια ανεξάρτητα διπλωμένη μονάδα (Pavletich, Chambers et al. 1993). Οι κρύσταλλοι αυτής της μονάδας δεσμευμένοι σε ένα διπλό DNA των 21bps αναπτύχθηκαν και διαχωρίστηκαν με κρυσταλλογραφία και φαίνεται να αποτελούνται από δύο αντιπαράλληλα β φύλλα, μια α έλικα που συνδέεται με την κύρια αύλακα του DNA και άλλες δομικές μονάδες (Cho, Gorina et al. 1994).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα υπολείμματα εντός του τομέα σύνδεσης με το DNA που είναι συχνότερα μεταλλαγμένα ("hotspots") είναι εκείνα τα κατάλοιπα που εντοπίζονται στην ή κοντά στην διεπαφή TP53-DNA. Αυτές οι μεταλλάξεις θερμών σημείων μερικές φορές κατηγοριοποιούνται ως μεταλλάξεις "επαφής" (κωδικόνια 248 και 273) ή "δομικές" (κωδικόνια 175, 245, 249 και 282), ανάλογα με το αν κανονικά συνδέονται απευθείας με το DNA ή συμβάλλουν στην ορθή αναδίπλωση της σύνδεσης της περιοχής της πρωτεΐνης που προσδένεται στο DNA. Αυτές οι έξι hotspot μεταλλάξεις - στα κωδικόνια 175, 245, 248, 249, 273 και 282 - δεν είναι μόνο η πιο συνηθισμένη θέση για σωματικές μεταλλάξεις στο TP53, αλλά είναι επίσης κοινές θέσεις αλλαγής της γενετικής γραμμής (η μετάλλαξη R337H βλαστικής γραμμής αποτελεί εξαίρεση). Έτσι, οι δυσλειτουργίες που προκαλούν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν οδηγούν μόνο σε σπάνιους σχετιζόμενους με LFS όγκους, αλλά συχνά οδηγούν σε σποραδικούς καρκίνους. Οι καρκίνοι με υψηλές συχνότητες σωματικών μεταλλάξεων TP53 περιλαμβάνουν τον καρκίνο των ωοθηκών, του οισοφάγου, του ορθού, της κεφαλής και τραχήλου, του λάρυγγα και του πνεύμονα, ενώ η λευχαιμία, το σάρκωμα, ο ορχικός καρκίνος, το κακόηθες μελάνωμα και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποκτούν σπάνια μεταλλάξεις TP53 (Olivier, Hollstein et al. 2010). Ακόμη και εντός σαφώς καθορισμένων ιστοπαθολογικών τύπων όγκου, συνήθως δεν εντοπίζονται ειδικά μοτίβα μεταλλάξεων TP53 (π.χ. κωδικόνια μεταλλαγμένα μόνο σε αυτόν τον τύπο όγκου). Ωστόσο, ορισμένοι τύποι όγκων έχουν διαφορετικές μεθόδους για την αδρανοποίηση του TP53: τα σαρκώματα είναι πιο πιθανό να παρουσιάζουν γονιδιακή ενίσχυση του ογκογονιδίου MDM2 και το επαγόμενο από αφλατοξίνη ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σχετίζεται με μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 249 του TP53 (Montesano, Hainaut et al. 1997).



Εικόνα 1.14. Κατανομή των κωδικονίων του TP53 που υφίστανται σωματικές μεταλλάξεις. Επισημαίνονται οι έξι συχνότερες τοποθεσίες της μετάλλαξης TP53 (προέλευση εικόνας από τη βάση δεδομένων IARC με έκδοση R14¹¹²).

Ο πιο συνηθισμένος τύπος μετάλλαξης TP53, σωματικής ή βλαστικής γραμμής, είναι οι παρερμηνεύσιμες (> 70%), οι οποίες περιλαμβάνουν την έκφραση μιας πλήρους μήκους αλλά δυσλειτουργικής πρωτεΐνης που συσσωρεύεται στον πυρήνα. Η κυριαρχία των παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων θεωρείται ένα μοναδικό χαρακτηριστικό αυτού του γονιδίου σε σύγκριση με άλλους καταστολείς όγκων ή γνωστά γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο. Για παράδειγμα, οι Hussain και Harris συνέκριναν τον κυρίαρχο τύπο μετάλλαξης του TP53 με αυτόν των RB1, APC, ATM, WT1, BRCA1, BRCA2, NF1, NF2, p16 και VHL, δέκα καλά μελετημένους ογκοκατασταλτικούς παράγοντες. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια απενεργοποιούνται με ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, διαγραφές ή παρεμβολές, που οδηγούν σε μια απύσχα ή κολοβωμένη πρωτεΐνη (Hussain and Harris 1998). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες καρκινικού γονιδιώματος υψηλής απόδοσης έδειξαν υψηλό ποσοστό σωματικών παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων στο καρκινικό γονιδίωμα. Μία μελέτη αλληλουχίας 518 γονιδίων πρωτεϊνικής κινάσης σε 210 διαφορετικούς ανθρώπινους καρκίνους καταδεικνύει ότι η πλειονότητα των αλλαγών ήταν παρερμηνεύσιμες (Greenman, Stephens et al. 2007). Παρόμοια

αποτελέσματα βρέθηκαν στους καρκίνους παχέος εντέρου και μαστού (Sjoblom, Jones et al. 2006). Αυτές οι πρόσφατες μελέτες δεν διακρίνουν τους καταστολείς όγκων από τα ογκογονίδια και αυτό μπορεί να εξηγήσει μερικές από τις διαφορές με προηγούμενες εργασίες. Εν πάση περιπτώσει, το ζήτημα του κατά πόσο οι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις είναι κοινές σε ορισμένα ή όλα τα γονίδια του καρκίνου δεν αποκλείει το γεγονός ότι είναι ευρέως διαδεδομένες ως προς το TP53. Υπάρχουν δύο υποθέσεις που εξηγούν γιατί είναι πιο επωφελές για τους όγκους να διατηρήσουν μια ελαττωματική πρωτεΐνη TP53 παρά να την απομακρύνουν εξ ολοκλήρου: το μεταλλαγμένο TP53 αποκτά λειτουργικότητα διαφορετική και ανεξάρτητη του “αγρίου τύπου” TP53 ή το μεταλλαγμένο TP53 παρεμποδίζει το αγρίου τύπου TP53 με κυρίαρχο αρνητικό τρόπο. Αυτές οι έννοιες δεν είναι αναγκαστικά αμοιβαία αποκλειόμενες. Η έννοια του λειτουργικού κέρδους υποστηρίζει ότι, κατά την απόκτηση μιας μετάλλαξης, η TP53 αναπτύσσει νέες λειτουργίες που διαφέρουν από εκείνες της πρωτεΐνης αγρίου τύπου και ότι αυτές οι λειτουργίες συμβάλλουν ενεργά στην νεοπλασματική ανάπτυξη (Oren and Rotter 2010).

Ένα παράδειγμα της ογκογόνου λειτουργίας του μεταλλαγμένου TP53 είναι η ικανότητά του να αδρανοποιεί τις πρωτεΐνες p63 και p73, δύο μέλη της οικογένειας TP53 και να αναστέλλει την ικανότητά τους να διεγείρουν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που οδηγεί σε αυξημένο αριθμό εστιών σε μια δοκιμασία που ονομάζεται focus-forming assay (Lang, Iwakuma et al. 2004). Η υπερέκφραση της μετάλλαξης R175H σε κύτταρα με έλλειψη TP53 έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό όγκων σε ποντικούς, ενώ κύτταρα χωρίς την υπερ-εκφρασμένη μετάλλαξη δεν σχηματίζουν όγκους σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς (Dittmer, Pati et al. 1993). Πολλές μεταλλαγμένες TP53 πρωτεΐνες ασκούν μια κυρίαρχη αρνητική δραστηριότητα έναντι του αλληλόμορφου αγρίου τύπου. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να ολιγομερίζονται και έχει αποδειχθεί ότι οι αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες μορφές του TP53 μπορεί να συν-ανοσοκατακρημνίζονται (Milner, Medcalf et al. 1991). Οι ολιγομερισμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν μέρος του τετραμερούς TP53 το οποίο δεν είναι σε θέση να δεσμευτεί και να διεγείρει καθοδικούς μεταγραφικούς στόχους. Οι κυρίαρχες αρνητικές επιδράσεις δύο μεταλλάξεων “θερμών σημείων” ελέγχθηκαν σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ES) (de Vries, Flores et al. 2002).

1.4.3 LFS-συνδεδεμένη Καρκινογένεση

Τα περισσότερα κυρίαρχα καρκινικά σύνδρομα προδιαθέτουν τα άτομα σε ένα στενό φάσμα τύπων καρκίνου. Παραδείγματα αποτελούν αυτοσωματικές κυρίαρχες προδιαθέσεις έναντι του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου και του δέρματος. Το LFS, αντίθετα, οδηγεί σε ένα ευρύτερο φάσμα τύπων καρκίνου (Nichols, Malkin et al. 2001).

Ωστόσο, ακόμη και αν η κλινική κατάσταση του LFS είναι ετερογενής, έχουν βρεθεί πέντε όργανα που είναι πιο επιρρεπή στην ογκογένεση που προκαλείται από μεταλλάξεις στη βλαστική σειρά TP53 όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, σάρκωμα μαλακού ιστού, επινεφριδικό καρκίνωμα, όγκοι εγκεφάλου και σαρκώματα οστών. Αυτοί οι πέντε τύποι καρκίνου αντιπροσωπεύουν το 30,6% (στήθος), 17,8% (μαλακός ιστός), 14% (εγκέφαλος), 13,4% (οστών) και 6,5% (επινεφριδίων) των όγκων σε φορείς μεταλλάξεων του TP53 (Olivier, Goldgar et al. 2003).

Υπάρχουν ειδικοί τύποι όγκων που σπάνια βρίσκονται, αλλά εάν διαγνωστούν συχνά συσχετίζονται με το σύνδρομο. Το επινεφρικό φλοιώδες καρκίνωμα είναι ένα παράδειγμα. Ενώ αντιπροσωπεύει μόνο το 6,5% όλων των όγκων που σχετίζονται με το LFS, περίπου το 50-82% όλων των ασθενών με καρκίνωμα επινεφριδίων είναι φορείς μιας μετάλλαξης TP53 βλαστικής γραμμής, ακόμη και αν δεν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό καρκίνου (Wagner, Portwine et al. 1994, Varley, McGown et al. 1999). Επομένως, ορισμένοι σπάνιοι όγκοι από μόνοι τους μπορεί να είναι εξαιρετικά ισχυρές ενδείξεις του LFS.

Γνωρίζοντας ότι το TP53 είναι ένα μόριο “κλειδί” στην πλειοψηφία των σποραδικών καρκίνων, πρέπει κανείς να αναρωτηθεί γιατί αυτοί οι πέντε τύποι καρκίνου είναι πιο συνηθισμένοι στο LFS σε σχέση με όλους τους άλλους; Το ζήτημα της ιστικής ειδικότητας του συνδρόμου είναι αναπάντητο. Στην πραγματικότητα, αυτό είναι ένα ανοιχτό ερώτημα για σχεδόν κάθε κυρίαρχο καρκινικό σύνδρομο, ακόμα και εκείνα που είναι πιο συχνά και με μεγαλύτερη ιστική ειδικότητα από το LFS. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του BRCA1 αφορούν το 85% του καρκίνου του μαστού και 65% του καρκίνου των ωοθηκών (Easton, Ford et al. 1995). Ο λόγος για αυτή την απίστευτη ειδικότητα σε ιστούς δεν είναι γνωστός, μολονότι με βάση τις υποθέσεις που έχουν γίνει

αυτό μπορεί να οφείλεται σε πλεονάζοντα συστήματα επιδιόρθωσης DNA σε άλλους ιστούς, στον υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του μαστού και των ωοθηκών, σε ένα μοναδικό περιβάλλον σηματοδότησης που περιλαμβάνει τον υποδοχέα οιστρογόνων ή ίσως σε ένα μοναδικά προστατευτικό περιβάλλον που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων με έλλειψη BRCA1 (Elledge and Amon 2002).

Αυτό που είναι ξεκάθαρο είναι ότι οι τύποι όγκων που σχετίζονται με LFS δεν είναι απαραίτητως αυτοί που έχουν την τάση να αναπτύξουν σωματικές μεταλλάξεις TP53. Δεν φαίνεται να υπάρχει σχέση μεταξύ των πιο κοινών όγκων της LFS και των σποραδικών καρκίνων που συχνά αποκτούν μεταλλάξεις TP53. Για παράδειγμα, το 43,2% των καρκίνων του παχέος εντέρου έχει σωματικές μεταλλάξεις TP53 (Olivier, Hollstein et al. 2010) αλλά μόνο το 2,8% των φορέων μετάλλαξης TP53 της βλαστικής σειράς ανέπτυξαν καρκίνο του παχέος εντέρου (Wong, Verselis et al. 2006). Οι κυτταρικές σειρές LFS εμφανίζουν χαρακτηριστικά μετασχηματισμένων κυττάρων, μια παρατήρηση που υποτίθεται ότι εξηγεί την έντονη προδιάθεση για καρκίνο μεταξύ αυτών των ασθενών. Το 1990, οι Bischoff και συνεργάτες παρατήρησαν ότι οι φυσιολογικοί ινοβλάστες από τους ασθενείς με LFS συνέχισαν να αναπτύσσονται μετά από πολυάριθμες γενιές, ακόμη και αν οι κυτταρικές σειρές ελέγχου σταμάτησαν να αναπτύσσονται (Bischoff, Yim et al. 1990). Μορφολογικά διαφορετικά κύτταρα αναπτύχθηκαν αυθόρμητα και αποτέλεσαν ένα κυρίαρχο χαρακτηριστικό του πιάτου, μέσα σε 8-10 κυτταρικούς διπλασιασμούς. Ο καρυότυπος αυτών των ίδιων κυττάρων έδειξε ότι τα γονιδιώματά τους ήταν συχνά υποδιπλοειδικά ή περιείχαν κύτταρα με δομικές ανωμαλίες. Εκτός από την αυθόρμητη αθανатоποίηση και τη γενωμική αστάθεια, οι ινοβλάστες LFS παρουσίαζαν επίσης ανεξάρτητη της αγκυροβόλησης ανάπτυξη. Αυθόρμητη αθανатоποίηση έχει επίσης παρατηρηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού από LFS ασθενείς (Shay, Tomlinson et al. 1995).

Η υπόθεση των “δύο χτυπημάτων” του Knudson θα προέβλεπε ότι και τα δύο αντίγραφα του TP53 πρέπει να απενεργοποιηθούν προκειμένου ένας όγκος που σχετίζεται με το LFS να αναπτυχθεί. Ωστόσο, η απώλεια και των δύο αλληλομόρφων ή της ετεροζυγωτίας παρατηρείται μόνο στο 44% των όγκων ανθρώπινου LFS και σε περίπου 50% των όγκων σε ποντικούς Trp53 +/- με απώλεια του ενός εκ των δύο αλληλομόρφων (Varley, McGown et al. 1997, Venkatachalam, Shi et al. 1998). Αυτό

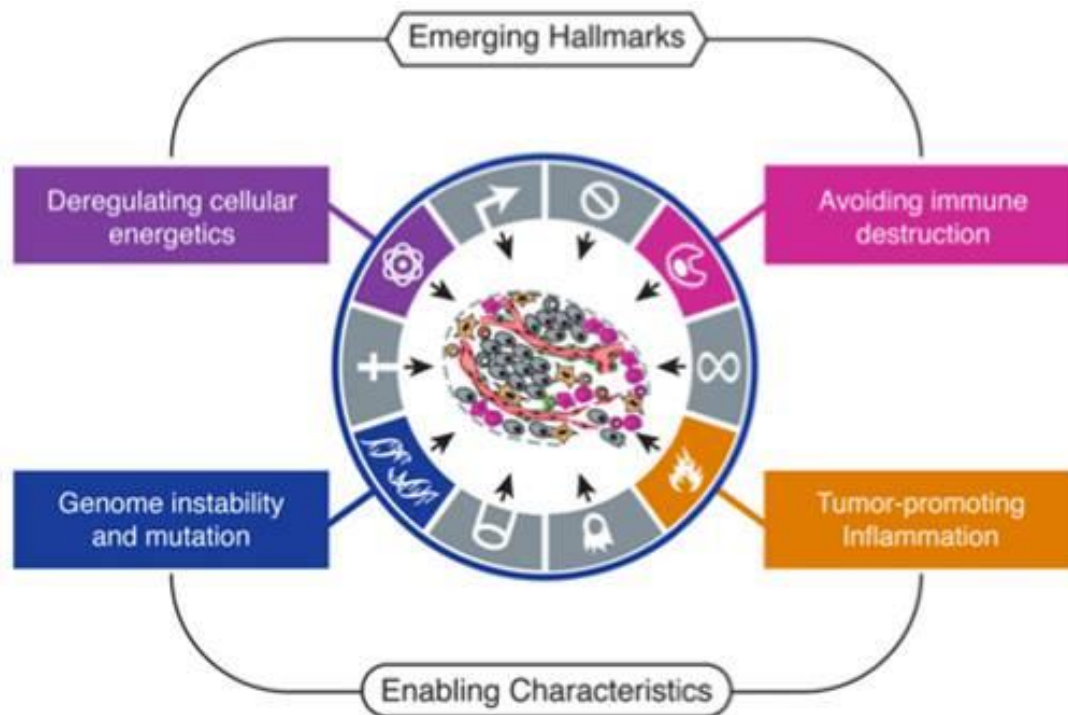
δείχνει απλώς ότι η απώλεια ή αδρανοποίηση ενός αλληλομόρφου TP53 μπορεί να είναι επαρκής, ειδικά εάν η μοναδική αρνητική μετάλλαξη είναι κυρίαρχη ή προσδίδει ογκογόνα χαρακτηριστικά.

1.5 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 ογκογονίδιο** (παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω), το οποίο αποδίδει τη γενωμική αστάθεια και τις μεταλλάξεις του TP53 και ATM στις βλάβες του DNA που προκαλούνται από ογκογονίδιο (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008).

Το 2000 οι Douglas Hanahan και Robert A. Weinberg περιέγραψαν έξι λειτουργικές δυνατότητες των καρκίνων που ονομάστηκαν χαρακτηριστικά του καρκίνου. Αυτά 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) εισβολή 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 είναι αναγκαίο να έχουν αποκτηθεί με τη 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 (Negrini, Gorgoulis et al. 2010) (**Εικόνα 1.15**). 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 (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008, Negrini, Gorgoulis et al. 2010).



Εικόνα 1.15: Αναδυόμενες ιδιότητες και επικουρικά χαρακτηριστικά του καρκίνου. Ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνών δείχνει ότι δύο επιπλέον χαρακτηριστικά του καρκίνου συμμετέχουν στην παθογένεση μερικών και ίσως όλων των καρκίνων. 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 Τ και Β 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 (Hanahan and Weinberg 2011).

1.5.1 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) (Negrini, Gorgoulis et al. 2010).

1.5.2 Μοντέλο αντιγραφικού στρες του DNA επαγόμενο από ογκογονίδιο

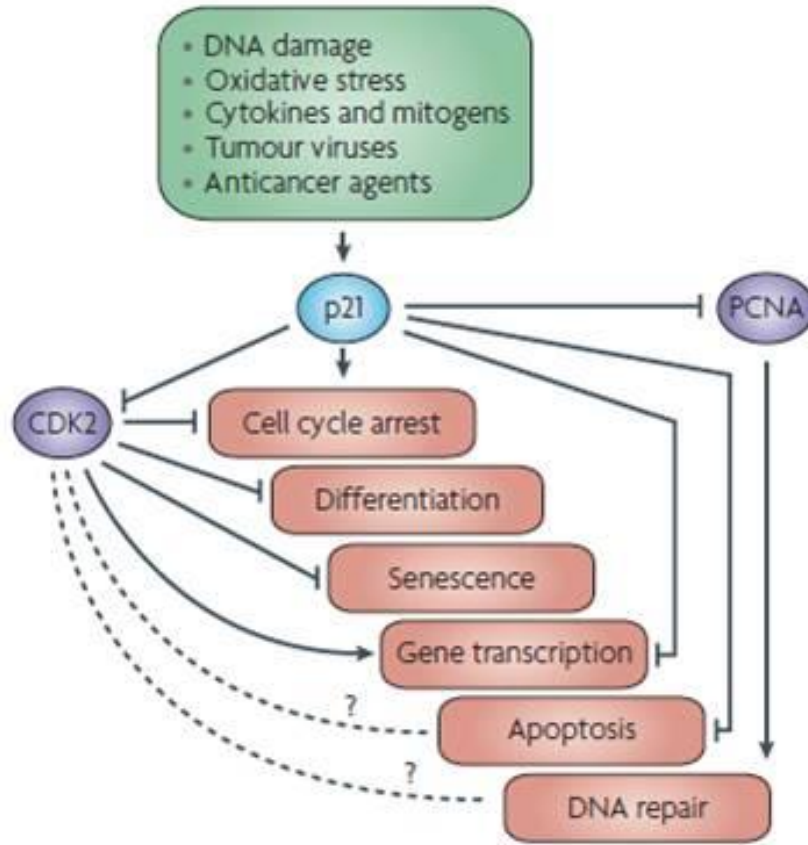
Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ο μηχανισμός με τον οποίο τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια επάγουν αστάθεια του γονιδιώματος περιλαμβάνει αντιγραφικό στρες του DNA. Ειδικές τοποθεσίες του γονιδιώματος, που ονομάζονται κοινές εύθραυστες θέσεις, είναι ευαίσθητες σε αντιγραφικό στρες του DNA. Στις ανθρώπινες προκαρκινικές 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 προκαρκινικές αλλοιώσεις που συνήθως διατηρούν τη λειτουργία φυσιολογικά εκφραζόμενου 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 (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008).

1.5.3 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 (Nakanishi, Shimada et al. 2006). 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 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 (Eastman 2004). 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 (Eastman 2004, Nakanishi, Shimada et al. 2006).

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 μεσολαβεί στην p53-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης στη φάση G1 (Abbas and Dutta 2009, Fischer 2017). 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 (Abbas and Dutta 2009).

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 (Roninson 2002). 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 (Εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16: 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 (Abbas and Dutta 2009).

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

Έχει προταθεί ότι οι λειτουργίες των αναστολέων της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p21^{Cip1/WAF1} και 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 ανάντη 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 στην ρύθμιση της μετάβασης G2/M. Παρατηρήθηκαν G1 και G2-ακινητοποιημένα κύτταρα σε όλους τους τύπους κυττάρων, με διαφορετικές επικράτειες. Επικρατέστερη η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ως απόκριση της έκφρασης της p21 συσχετίζεται με την παρουσία λειτουργικού pRb. Η αναστολή της ανάπτυξης στη φάση G2 ήταν πιο φανερή στα Rb-αρνητικά κύτταρα. Αυτή η διανομή στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου δεν συσχετίζεται με την κατάσταση της p53 και η δεσμευτική δραστηριότητα του PCNA της p21 δε φάνηκε να εμπλέκεται. Επιπλέον, ο ενδο-αναδιπλασιασμός 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 (Niculescu, Chen et al. 1998).

1.5.5 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 (Abbas and Dutta 2009). 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 (Zhu, Abbas et al. 2005). 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 (Abbas and Dutta 2009). Πειραματικές αποδείξεις ωστόσο έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, παρά την αναστολή της CDK2, π.χ. στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Tetsu and McCormick 2003). Επιπλέον, στοχευμένη διαγραφή-αποσιώπηση (deletion) του Cdk2 υποδεικνύει ότι η Cdk2 δεν είναι απαραίτητη για την μεσολαβούμενη από την p21^{Cip1} αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβη του DNA (Martin, Odajima et al. 2005). 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 γενετοξικό στρες, οδηγώντας σε διακοπή της ανάπτυξης στη **φάση G2** του κυτταρικού κύκλου (Abbas and Dutta 2009).

1.5.6 Η φωσφορυλίωση της p21

Ενώ οι ανασταλτικές της ανάπτυξης λειτουργίες της p21 συνδέονται με τον πυρηνικό εντοπισμό της, οι ογκογόνες, προ-πολλαπλασιαστικές και αντι-αποπτωτικές δραστηριότητές της συχνά συνδέονται με την κυτταροπλασματική συσσώρευση της (Abbas and Dutta 2009). Στην πραγματικότητα, κυτταροπλασματική έκφραση της p21 είναι κοινή σε ανθρώπινες κακοήθειες και συσχετίζεται με επιθετικούς όγκους και αρνητική πρόγνωση (Blagosklonny 2002, Abbas and Dutta 2009). 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 χαρακτηριστικά (Child and Mann 2006). 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 ουβικουΐτινίωσή του και την επακόλουθη πρωτεόλυση, και έτσι προάγει την εξέλιξη στην G1 / S μετάβαση του κυτταρικού κύκλου και κατά τη διάρκεια της φάσης S (Bornstein, Bloom et al. 2003). 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 το διαμεσολαβούμενο από τον υποδοχέα **ERBB2** (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2) πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκίνου του μαστού και την καρκινογένεση του μαστού (Abbas and Dutta 2009).

1.5.7 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 όπου 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 (Abbas and Dutta 2009). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που η διαγραφή του γονιδίου 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 (Abbas and Dutta 2009). Παρόλα αυτά η διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω της p21 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη p53-εξαρτώμενη μεσολαβούμενη 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 την καθιστά ανίκανη να επάγει απόπτωση αλλά διατηρεί μερική δραστηριότητα αναστολής της ανάπτυξης (Barboza, Liu et al. 2006, Efeyan, Collado et al. 2007). 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 ένα γενωμικώς ασταθές περιβάλλον. Ανεπάρκεια του Cdkn1a συνεργάστηκε με την απώλεια της πρωτεΐνης σημείου ελέγχου βλαβών του DNA, ATM στην προώθηση ανεύπλοειδίας

που προηγήθηκε της ανάπτυξης του όγκου (Shen, Heng et al. 2005). 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 ενισχύει το συμπέρασμα ότι η απώλεια της προστασίας έναντι στη γενωμική αστάθεια από τη p21 συμβάλλει σε ανθρώπινη κακοήθεια (Ogino, Nosho et al. 2009). Επιπλέον, η p21 προωθεί την σταθερότητα του γονιδιώματος σε βλαστικά κύτταρα, τόσο διατηρώντας την ικανότητα αυτο-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων και, ενδεχομένως, συμβάλλοντας στο ογκογόνο δυναμικό του (Abbas and Dutta 2009).

1.5.8 Διπτός ρόλος της πρωτεΐνης p21 στην καρκινογένεση

Η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων στηρίζεται εξ' ολοκλήρου σε ρυθμιστικά δίκτυα, τα οποία ενεργοποιούνται ως απόκριση σε ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα που τείνουν να αλλοιώσουν την ομοιόσταση του κυττάρου. Καθοριστικής σημασίας, όσον αφορά τη σωστή λειτουργία των μοριακών αυτών δικτύων, διαδραματίζει η οργάνωσή τους τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο. Με βάση τα παραπάνω, υπό την παρουσία κάποιου τέτοιου ερεθίσματος, ενεργοποιείται το κατάλληλο ρυθμιστικό κύκλωμα στα πλαίσια ενός γενικού συναγερμού που πυροδοτεί το κύτταρο. Έπειτα από την εξουδετέρωσή του, πραγματοποιείται πλήρης επαναφορά των ομοιοστατικών μηχανισμών και της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου (Jackson and Bartek 2009, Ciccia and Elledge 2010, Rue and Garcia-Ojalvo 2013).

Ένα βασικό ρυθμιστικό δίκτυο που φέρει το κύτταρο και ενεργοποιεί ως απόκριση στα διάφορα “στρεσογόνα” ερεθίσματα, είναι αυτό που εκκινείται από τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα p53 (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Velimezi, Liontos et al. 2013). Υπό συνθήκες απειλής της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 επάγει την έκφραση του καθοδικού στόχου p21, για περιορισμένο χρονικό διάστημα, οδηγώντας βραχυπρόθεσμα σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (στη φάση G1/G1-S/G2) και ως εκ τούτου παρέχει στο κύτταρο το χρόνο να αποκριθεί κατάλληλα και να απομακρύνει την απειλή. Με την ολοκλήρωση της απόκρισης αυτής, η πρωτεΐνη p53 καθίσταται ανενεργή μέσω της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης από την

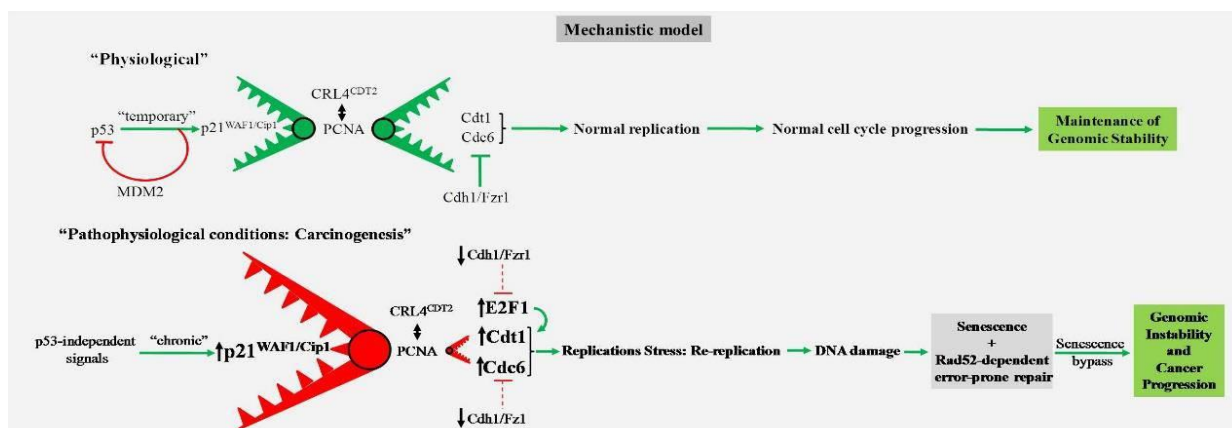
Ε3 λιγάση MDM2 και το δίκτυο απενεργοποιείται. Το κύτταρο δύναται να εισέλθει εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο. Το παραπάνω μοριακό δίκτυο ενεργοποιείται από μια πληθώρα διαφορετικών “στρεσογόνων” ερεθισμάτων, ανάμεσά τους και ογκογόνα, αναδεικνύοντας έναν προστατευτικό-ογκοκατασταλτικό ρόλο της πρωτεΐνης p21 κάτω από αυτές τις συνθήκες (Abbas and Dutta 2009, Jackson and Bartek 2009).

Μια σειρά από πειραματικές διαδικασίες αποσιώπησης του γονιδίου CDKN1A, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, υποστήριξαν τον κατασταλτικό του ρόλο στην καρκινογένεση. Τα πρώτα αποτελέσματα για τον σημαντικό ογκοκατασταλτικό ρόλο της p21, προήλθαν από **knock out** ποντίκια ως προς το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη αυτή, τα οποία εμφάνισαν αυξημένο αριθμό όγκων. Παρ’ όλα αυτά, το γεγονός ότι υπό την προαναφερθείσα απουσία, η ανάπτυξη των όγκων δεν πραγματοποιούνταν άμεσα, αλλά μετά από ένα εκτεταμένο χρονικό διάστημα, σε σύγκριση με ποντίκια στα οποία είχε πραγματοποιηθεί αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το **TP53** ή **CDKN2A**, υπέδειξε την ανεπάρκεια, εν μέρει, του μορίου p21 στην υποκίνηση της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Η έκφραση του γονιδίου CDKN1A έχει βρεθεί ελαττωμένη σε κάποιους καρκινικούς τύπους, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου, σε κάποιες περιπτώσεις του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Παρόλα αυτά, στους περισσότερους καρκινικούς τύπους, προαναφερθείσα καταστολή του γονιδίου αυτού δεν πραγματοποιείται, οδηγώντας σε συμπεράσματα που αίρουν την πιθανή ογκοκατασταλτική δραστηριότητά του. Τα αποτελέσματα αυτά βέβαια, ενώ θέτουν ένα μεγάλο ερωτηματικό στην αποκλειστικότητα της ογκοκατασταλτικής δραστηριότητας του μορίου αυτού, δεν μπορούν να απορρίψουν τη συνεργατική του δράση με άλλους κύριους ογκοκατασταλτικούς παράγοντες (π.χ. p53) έναντι της επαγωγής της έκφρασης συγκεκριμένων ογκογονιδίων που τείνουν να οδηγήσουν στην καρκινογένεση. Μια σειρά πειραματικών προσεγγίσεων απέδειξε τη συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων της πρωτεΐνης p21, με την επαγωγή και την ενίσχυση της γενωμικής αστάθειας, η οποία αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων (Negrini, Gorgoulis et al. 2010). Πιο συγκεκριμένα, η ταυτόχρονη καταστολή τόσο της έκφρασης του γονιδίου CDKN1A, όσο και του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ATM, οδηγεί σε αυξημένη χρωμοσωμική αστάθεια, κάτι που γίνεται αντιληπτό από την αύξηση του

αριθμού των ανεύπλοειδικών κυττάρων και ως εκ τούτου στην ανάπτυξη του καρκίνου. Το προαναφερθέν φαινόμενο της γενωμικής αστάθειας, προκαλείται σε αυξημένο βαθμό από την ταυτόχρονη απουσία τόσο του λειτουργικού μορίου p53, όσο και του μορίου p21. Ακόμα, αποτελέσματα σχετικά με τη συνεισφορά της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου CDKN1A στο φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας, ανεξάρτητα από το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου TP53, σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα, υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του μορίου p21 στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας και με τον τρόπο αυτό στην παρεμπόδιση της καρκινογένεσης (Abbas and Dutta 2009). Ο ογκοκατασταλτικός ρόλος της πρωτεΐνης p21, που υποστηρίζεται από τις παραπάνω μελέτες, δεν καθίσταται απόλυτος. Η μικρή συχνότητα με την οποία η ίδια βρίσκεται μεταλλαγμένη στους διάφορους καρκινικούς τύπους (σε αντίθεση με την περίπτωση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και p16), σε συνδυασμό με την αυξημένη της αφθονία σε πολλούς εξ' αυτών (καρκίνος του προστάτη, καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, καρκίνος του στήθους κ.α.) (Roninson 2002), φαινόμενα τα οποία είναι άμεσα συνδεδεμένα με αυξημένη επιθετικότητα, μεταστατική ικανότητα και κακή πρόγνωση, αποτέλεσαν το υπόβαθρο πάνω στο οποίο στηρίχθηκε η υπόθεση του ογκογόνου ρόλου της πρωτεΐνης αυτής (Abbas and Dutta 2009). Μια σειρά από διαφορετικές μελέτες είχαν σκοπό να αποδείξουν μηχανιστικά το ρόλο αυτό, συσχετίζοντάς τον είτε με την επαγωγή της έκφρασης αυξητικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών είτε με την καταστολή προ-αποπτωτικών μορίων και την αύξηση του χρόνου ζωής συγκεκριμένων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK4/6 και CDK2) πάντα υπό συνθήκες κυτταροπλασματικής αφθονίας της πρωτεΐνης p21 (Abbas and Dutta 2009).

Παραπάνω τονίστηκε η καθοριστική σημασία των ρυθμιστικών δικτύων στη φυσιολογία του κυττάρου. Σε πολλούς καρκινικούς τύπους το δίκτυο p53-p21 αποδιοργανώνεται, εφόσον η πρωτεΐνη p53 εμφανίζεται είτε κατασταλαμένη είτε μεταλλαγμένη. Αντίθετα η πρωτεΐνη p21 όχι μόνο είναι λειτουργική αλλά σε πολλά καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται να συνεντοπίζεται με τον παράγοντα πολλαπλασιασμού Ki67 (Fischer, Jung et al. 2011). Το αρχικό αυτό γεγονός οδήγησε στην αποκλειστική αποκρυπτογράφηση του ογκογόνου ρόλου του κυκλινοεξαρτώμενου αυτού καταστολέα, καθώς και στη διαπίστωση ότι η διττή του φύση εξαρτάται από το περιεχόμενο του κυττάρου σε

ανοδικούς ρυθμιστές και καθοδικούς στόχους του. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η παρατεταμένη έκφραση της πρωτεΐνης p21, τόσο σε μια καρκινική όσο (Saos 2) όσο και σε μια προ-καρκινική (MDAH 041: ινοβλάστες προερχόμενοι από ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni) κυτταρική σειρά, απουσία p53 ή έλλειψη του φυσιολογικού μορίου αντίστοιχα, δύναται να αποκτήσει ογκογόνο ρόλο συνεισφέροντας στην απορρύθμιση της συσκευής αδειοδότησης της αντιγραφής και στην αλλοίωση της γενωμικής σταθερότητας. Πιο συγκεκριμένα η προαναφερθείσα απορρύθμιση πραγματοποιήθηκε μέσω της εξαρτώμενης από την p21 αύξησης του χρόνου ζωής των παραγόντων αδειοδότησης CDT1 και CDC6, οδηγώντας σταδιακά σε εκτεταμένη αντιγραφική πίεση (μέσω επαναδιπλασιασμού), η οποία αποτελεί βασική πηγή γενωμικής αστάθειας. Το παραπάνω φαινόμενο σε συνδυασμό με την επαγόμενη μείωση της σταθερότητας των αντιγραφικών συσκευών, οι οποίες έχουν παύσει τη διαδικασία της σύνθεσης DNA και τη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης MUS81-EME1, οδήγησε σε αυξημένο αριθμό ρήξεων της δίκλωνης αλυσίδας. Η αύξηση των βλαβών του DNA και ταυτόχρονα η ενίσχυση της επιρρεπούς σε λάθη, RAD52-εξαρτώμενης επιδιόρθωσής τους, οδήγησε σε εκτεταμένες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και συνακόλουθα σε εκτεταμένη γενωμική αστάθεια (**Εικόνα 1.17**). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, μετά την είσοδο των κυττάρων αυτών στη γήρανση και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου για ένα μικρό χρονικό διάστημα, τη δημιουργία απογόνων (escaped cells), οι οποίοι είχαν προσπεράσει τον παραπάνω ογκοκατασταλτικό φραγμό και εμφάνιζαν μεγάλη επιθετικότητα (Galanos, Vougas et al. 2016).



Εικόνα 1.17: Προτεινόμενο μοντέλο το οποίο απεικονίζει την ογκογόνο δράση της παρατεταμένης, ανεξάρτητης από την p53 έκφραση της p21 (Galanos, Vougas et al. 2016).

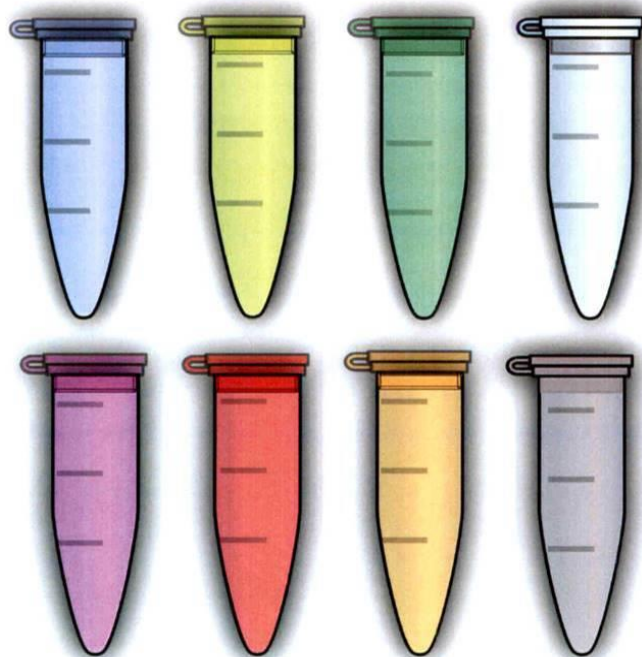
1.6 Σκοπός εργασίας

Γνωρίζουμε με βάση προηγούμενα αποτελέσματα από το εργαστήριό μας (Galanos, Vougas et al. 2016) ότι η πρωτεΐνη p21 εκτός από τον κλασσικό της ογκοκατασταλτικό ρόλο, ο οποίος διεξάγεται σε κυτταρικό περιβάλλον “αγρίου τύπου” p53, κρύβει και έναν ογκογόνο ρόλο, ο οποίος αντιθέτως βρίσκει πρόσφορο έδαφος σε περιβάλλον εν απουσία του p53 ή παρουσία της μεταλλαγμένης του μορφής. Αυτό το βιολογικό παράδοξο παρατηρήθηκε σε δυο κυτταρικά συστήματα Saos2 και Li-Fraumeni όπου το p53 δεν εκφράζεται καθόλου ή είναι μεταλλαγμένο κατά αντιστοιχία. Κατά την επαγωγίμη έκφραση του p21 με τη χρήση του συστήματος TetON p21, τα κύτταρα Li-Fraumeni απέκτησαν ένα φαινότυπο γήρανσης που κορυφώθηκε κατά τη 10η ημέρα. Περαιτέρω παρατεταμένη έκφραση του p21 οδήγησε στην ανάδυση ενός υπό-πληθυσμού πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων που είχαν διαφύγει της γήρανσης (κύτταρα escaped) με πιο επιθετικό φαινότυπο από ότι προηγουμένως (Galanos, Vougas et al. 2016). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η υπερμικροσκοπική μελέτη των κυττάρων Li-Fraumeni ύστερα από επαγωγίμη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p21 προκειμένου να παρατηρηθούν μορφολογικές και οργανωτικές αλλαγές ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα χωρίς την επαγωγίμη έκφραση του p21 (κύτταρα “OFF”), τα γηρασμένα (κύτταρα “senescent”) και αυτά που έχουν διαφύγει από το γηρασμένο φαινότυπο (κύτταρα “escaped”). Επίσης, θα γίνει συσχέτιση των ευρημάτων της υπερμικροσκοπικής μελέτης με την πιθανή συμβολή τους στην ανάπτυξη της γήρανσης και της διαφυγής από αυτήν.

Κεφάλαιο 2°

Υλικά και Μέθοδοι

2



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 μεταβολισμό, γήρανση, μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση. Επίσης η κυτταρική καλλιέργεια χρησιμοποιείται για τον έλεγχο και την ανάπτυξη φαρμάκων, και μεγάλης κλίμακας παραγωγή βιολογικών ενώσεων (π.χ. εμβόλια, θεραπευτικές πρωτεΐνες). Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης της κυτταρικής καλλιέργειας για οποιαδήποτε από τις αυτές τις εφαρμογές είναι η συνέπεια και 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 υλικού

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από κύτταρα της αθανατοποιημένης κυτταρικής σειράς MDAH 041 (ινοβλάστες) η οποία απομονώθηκε από γυναίκα 22 ετών με σύνδρομο Li-Fraumeni και φέρει μια τροποποιητική μετάλλαξη του πλαισίου ανάγνωσης στο κωδικόνιο 184 του γονιδίου TP53. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το Li-Fraumeni-TetON σύστημα, δηλαδή ένα σύστημα επαγωγίμης έκφρασης όπου η μεταγραφή ενεργοποιείται αντιστρεπτά παρουσία του αντιβιοτικού Δοξυκυκλίνη. Στη διατριβή αυτή το γονίδιο του οποίου η έκφραση ενεργοποιήθηκε μέσω της προσθήκης Δοξυκυκλίνης στην καλλιέργεια των κυττάρων Li-Fraumeni-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 με επαγωγή γήρανσης στα κύτταρα αυτά. Η τελική συγκέντρωση της Δοξυκυκλίνης που χρησιμοποιήθηκε για το κυτταρικό επαγωγίμο σύστημα Li-FraumeniTet-ON p21 ήταν 2μg/ml στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επαγωγή γήρανσης σε τρία χρονικά διαστήματα 0, 6 και 12 ημερών. Το ζητούμενο ήταν η υπερμικροσκοπική μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων αυτών.

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 Hermann Bujard και Manfred Gossen στο Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης (Gossen and Bujard 1992).

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

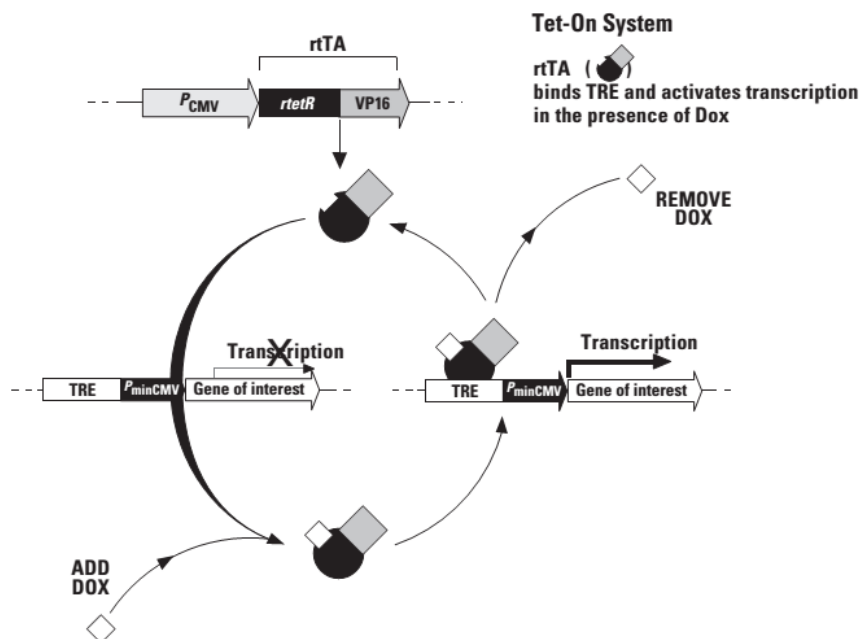
Tn 10. Η TetR εμποδίζει την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου μέσω πρόσδεσης στον χειριστή (operator) tet ή αλλιώς **tetO** απουσία της **τετρακυκλίνης** (Tc). Η TetR και το cis στοιχείο του tetO αποτελούν τη βάση και την ουσία της ρύθμισης της «επαγωγίμης έκφρασης» στα κυτταρικά συστήματα θηλαστικών. Το σύστημα Tet-On δίνει στους ερευνητές την ικανότητα της ελεγχόμενης γονιδιακής έκφρασης σε υψηλό βαθμό, όπως αρχικά περιγράφηκε από τον Gossen και τους συναδέλφους του το 1995. 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 επιθυμητού γονιδίου σε απόκριση σε διάφορες συγκεντρώσεις Dox (Gossen, Freundlieb et al. 1995).

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 χιμαιρική 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 (**Εικόνα 2.1**). 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, το 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 PminCMV (minimal CMV promoter). Ο υποκινητής PminCMV 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



Εικόνα 2.1: Αρχές λειτουργίας του συστήματος Tet-ON
(<http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3945-1.pdf>).

2.2.1 Οφέλη από τα tet επαγωγίμα συστήματα

Το επαγωγίμο σύστημα τετρακυκλίνης επιτρέπει την 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.

2.2.2 Μειονεκτήματα των tet επαγωγίμων συστημάτων

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 40S 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 MDAH-041

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 εργαλείο 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 ανθρώπινων ιστών.

Η κυτταρική σειρά MDAH041 είναι μεσεγχυματικής προέλευσης ινοβλάστες προερχόμενοι από βιοψία δέρματος ενός ασθενούς με σύνδρομο Li-Fraumeni (Bischoff, Yim et al. 1990). Φέρουν μια μετάλλαξη τροποποιητική του πλαισίου ανάγνωσης που αφορά σε έλλειψη μιας βάσης στο κωδικόνιο 184 του ενός αλληλομόρφου γονιδίου TP53 ενώ το φυσιολογικό αλληλόμορφο p53 έχει χαθεί κατά τη διάρκεια των πολλαπλασιασμών τους *in vitro* (Agarwal, Agarwal et al. 1998).

Η αφορμή για να ξεκινήσει η μελέτη των βιοψιών από δέρμα ασθενών με σύνδρομο LFS ήταν το γεγονός ότι καρκίνοι όπως σαρκώματα μαλακών ιστών (συμπεριλαμβανομένων και ινοσαρκωμάτων) παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με το σύνδρομο αυτό. Οι ινοβλάστες “ελέγχου” από φυσιολογικούς δότες έχουν την τάση να διατηρούν μια φυσιολογική μορφολογία και να γηράσκουν στην καλλιέργεια μετά από συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων. Ινοβλάστες που απομονώθηκαν από ασθενείς με το σύνδρομο Li-Fraumeni παρουσίασαν αλλαγές στη μορφολογία, φαινότυπο μετασχηματισμένων κυττάρων και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Οι συγκεκριμένοι ινοβλάστες υπεισήλθαν σε κατάσταση αναπτυξιακής κρίσης στην οποία παρουσίασαν αργή ανάπτυξη, όμως κατάφεραν να ανακάμψουν και συνέχισαν να αναπτύσσονται μετά από το κατώφλι των 35 διαιρέσεων στο οποίο είχαν σταματήσει την ανάπτυξή τους οι ινοβλάστες “ελέγχου”. Οι ινοβλάστες, των ασθενών, που ξέφυγαν της γήρανσης διατήρησαν ένα φαινότυπο μετασχηματισμένων κυττάρων και οι ρυθμοί ανάπτυξής τους ήταν όμοιοι με εκείνους που παρατηρήθηκαν σε ινοβλάστες κατά τη διάρκεια των αρχικών τους διαιρέσεων, χωρίς όμως οι μετασχηματισμένοι ινοβλάστες να προκαλούν όγκους σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Από αυτά τα κύτταρα προέκυψε ο κλώνος MDAH041 (Bischoff, Yim et al. 1990). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χαρακτηρίζεται από σοβαρή ανευπλοειδία, παρουσιάζει γονότυπο p53^{mut/-} ενώ η απώλεια του φυσιολογικού αλληλομόρφου TP53 αποτελεί αναγκαία αλλά όχι και ικανή συνθήκη για την αυθόρμητη κυτταρική αθανατοποίηση που παρατηρείται σε αυτή τη σειρά. Τέλος, ύστερα από το μετασχηματισμό αυτών των ινοβλαστών με ένα πλασμιδιακό φορέα διαπιστώθηκε ότι ο τελευταίος αντιγραφόταν με υψηλό ρυθμό που ομοιάζε με εκείνο στην κυτταρική σειρά Saos2 p53^{-/-} και αυτό διότι η κολοβωμένη πρωτεΐνη p53 που κωδικοποιείται από το ένα αλληλόμορφο δεν είναι λειτουργική και ούτε διατηρεί κάποιο

μέρος της φυσιολογικής δομής με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση να οδηγήσει σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Liu, Kraus et al. 1996).

2.4 Χώρος καλλιεργείων

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 καλλιεργείων καθαρίζεται και αποστειρώνεται με προσοχή ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στο βασικό εξοπλισμό του χώρου των καλλιεργείων περιλαμβάνονται:

Θάλαμος νηματικής ροής τάξης (class) II (Microflow). Ο θάλαμος νηματικής ροής παρέχει έναν αποστειρωμένο χώρο μέσα στον οποίο διεξάγονται όλοι οι χειρισμοί των καλλιεργείων. 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 2.2**).

Κλίβανος επώασης καλλιεργείων (Forma Scientific, model 3111, Forma Scientific Inc.). Στον κλίβανο γίνεται η επώαση των καλλιεργείων. 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 (ddH₂O) συμπληρωμένο με 2% αντιμυκητιακό διάλυμα Lysol ώστε να προληφθεί τυχόν μόλυνση με μύκητες, που αποτελούν μείζων μολυσματικό παράγοντα (**Εικόνα 2.3**).

Ανάστροφο μικροσκόπιο (Zeiss). Διαθέτει αντικειμενικούς φακούς x10. Χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των καλλιεργείων και της μορφολογίας των κυττάρων καθώς και την ανεύρεση πιθανών μολυσματικών παραγόντων (**Εικόνα 2.3**).

Υδατόλουτρο (Memmert, WNE 22, Shutzart DIN 40050, Germany). Η θερμοκρασία του νερού (ddH₂O 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 κυτταροκαλλιέργειες.

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, Eppendorf και διάφορα διαλύματα αποστειρώνονται με υγρή αποστείρωση στους 120°C, υπό πίεση, για 35 min.



Εικόνα 2.2: Εικόνα από το χώρο καλλιέργειών. Διακρίνεται ο θάλαμος νηματικής ροής.



Εικόνα 2.3: Εικόνα από το χώρο καλλιέργειών. Διακρίνεται ο κλίβανος καλλιέργειών δεξιά και αριστερά το ανάστροφο μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των υπό μελέτη κυττάρων.

2.4.1 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Για την πραγματοποίηση των καλλιιεργειών, εκτός από τα μηχανήματα που αναφέρθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν αρκετά υλικά τα οποία είναι αποστειρωμένα και αναφέρονται παρακάτω:

- Ποδονάρια
- Γάντια
- Χειρουργικές μάσκες
- Γάζες
- Διάλυμα EtOH 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 60mm (Corning, 430165)
- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 100mm (Greiner, 664160)
- Μηχανική πιπέτα 1000λ, 200λ και 10λ
- 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

2.4.2 Αναλώσιμα για καλλιέργεια Li-Fraumeni p21 Tet-On:

Penicillin/Streptomycin (5,000 U/ml)

Κωδικός: 15070-063, Gibco

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

0.5% Trypsin-EDTA (10x), no phenol red

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

2.5 In Vitro τεχνικές

2.5.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από κύτταρα

Για την απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα, τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με προσθήκη διαλύματος θρυψίνης/EDTA (Thermo Fisher Scientific), συλλέγονται, φυγοκεντρώνται (1.500 rpm 5 λεπτά) και στη συνέχεια λύνονται με την προσθήκη διαλύματος RIPA (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate, 1% NP-40) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Protease inhibitor cocktail, Cell signaling) και φωσφατασών (Phosphatase inhibitor cocktail, Cell signaling) για διάστημα 1 ώρας στους 4°C. Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.400 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται, ενώ το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C για να εκχυλιστούν ιστόνες. Στα δείγματα προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με φωτομέτρηση στα 600nm και πρότυπη καμπύλη Bradford (BioRad). Τα δείγματα πρωτεϊνών φυλάσσονται στους -80°C.

2.5.2 Στύπωμα Western ή Ανοσοαποτύπωση (Western Blot ή Immunoblot)

Πρόκειται για τεχνική ανίχνευσης ενός αντιγόνου σε μείγμα πρωτεϊνών, απομονωμένο από κύτταρα ή ιστούς. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του μεγέθους και των επιπέδων έκφρασης της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στο διαχωρισμό πολυπεπτιδίων ενός μείγματος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου συγκεκριμένης πυκνότητας και στη μεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF (polyvinylidenedi fluoride on teflon base) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ακολουθεί πρόσδεση του ειδικού για την πρωτεΐνη αντισώματος και ανίχνευση αυτού του συμπλόκου με ανοσοενζυμικές μεθόδους επί της μεμβράνης.

Δείγματα περιεκτικότητας 20-50 μg πρωτεϊνών διαλυμένα σε SDS-β-mercaptoethanol sample buffer ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF (Millipore). Ακολουθεί κάλυψη των μη ειδικών θέσεων και ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με

πρωτογενές αντίσωμα στους 4 °C υπό ανάδευση. Η επώαση με δευτερογενές αντίσωμα γίνεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η εμφάνιση πραγματοποιείται είτε με χημειοφωταύγεια με διάλυμα ECL (Pierce, Thermo Fisher Scientific), είτε με αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης με διάλυμα BCIP/NBT (Invitrogen).

2.5.2.1 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών αποτελείται από δύο στοιβάδες: η κατώτερη στοιβάδα είναι το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και η ανώτερη στοιβάδα είναι το πήκτωμα φόρτωσης (stacking gel). Για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος πάνω από 40 kD χρησιμοποιείται πήκτωμα διαχωρισμού περιεκτικότητας 10% (2,85 mL ddH₂O, 2,5 mL 2,25 M Tris-Cl pH 8.8, 4,5 mL acrylamide/bis 37:1, 100 μL 10% SDS, 100 μL 10% APS, 10 μL TEMED), ενώ για πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους επιλέγεται πήκτωμα περιεκτικότητας 12% (1,95 μL ddH₂O, 2,5 mL 2,25M Tris-Cl pH 8.8, 5,4 mL acrylamide/bis 37:1, 100 μL 10% SDS, 100 μL 10% APS, 10 μL TEMED). Η περιεκτικότητα του πηκτώματος φόρτωσης είναι σε κάθε περίπτωση 4,8% (5,6 mL ddH₂O, 1,25 mL 0,5M Tris-Cl pH 6.8, 2 mL acrylamide/bis 37:1, 100 μL 10% SDS, 100 μL 10% APS, 10 μL TEMED). Μετά τον πολυμερισμό το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running buffer 10x: 1 L ddH₂O, 24 g TrizmaBase, 115,2 g Glycine, 8 gr SDS). Ταυτόχρονα τα δείγματα προετοιμάζονται. Σε 30 μg πρωτεΐνης (μέγιστος όγκος 15μl) προσθέτουμε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 2x (SDS protein loading buffer 2x: 20% Glycerol, 4% SDS, 120 mM Tris-Cl pH 6.8, 0,003% Bromophenol blue, 10% β-μερκαπτοαιθανόλης). Θερμαίνουμε το παραπάνω μείγμα επί 10 λεπτά στους 95°C, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια γίνεται φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 120 V και 200 mA για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (1-3 ώρες). Μεταξύ των δειγμάτων ηλεκτροφορείται δείκτης (Thermo Fisher Scientific) που περιέχει μείγμα πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος και αποτελεί σημείο αναφοράς για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών που εξετάζονται.

2.5.2.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycine) παρουσία 20% μεθανόλης. Η μεταφορά γίνεται στα 100 V και 200 mA επί 60 λεπτά για πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (έως 90 kD) έως 90 λεπτά για πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (έως 120 kD). Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα κάλυψης με ειδικών θέσεων 5% w/v γάλακτος ή αλβουμίνης ορού μόσχου (Bovine Serum Albumine), σε περίπτωση χρήσης αντισωμάτων για φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, σε διάλυμα TBS (20 mM Tris-Cl pH 7.6, 0,135 M NaCl)/Tween-20 0,1% για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

2.5.2.3 Επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα

Η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (σε διάλυμα 0,5% w/v γάλακτος σε TBS/Tween-20 0,1%) ολονύκτια στους 4°C. Ακολουθούν τρεις 5λεπτες πλύσεις της μεμβράνης σε διάλυμα TBS/Tween-20 0,1%. Στη συνέχεια γίνεται η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS/Tween-20 0,1%.

2.5.2.4 Εμφάνιση της μεμβράνης με χημειοφωταύγεια

Το δευτερογενές αντίσωμα (Cell Signaling) είναι συνδεδεμένο με Horse Radish Peroxidase (HRP-conjugated) και αραιώνεται 1:1000 σε διάλυμα 0,5% w/v γάλακτος σε TBS/Tween-20 0,1%. Η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα της χημειοφωταύγειας αναμιγνύονται σε ίσο όγκο για 5 λεπτά πριν την επώαση της μεμβράνης. Η μεμβράνη καλύπτεται με το διάλυμα της χημειοφωταύγειας και επωάζεται για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Η μεμβράνη καλύπτεται με σελοφάν και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Στη συνέχεια σε σκοτεινό θάλαμο, πάνω στη μεμβράνη τοποθετείται κομμάτι φιλμ αυτοραδιογραφίας (Fuji X-ray films). Ο

χρόνος έκθεσης καθορίζεται εμπειρικά και η εμφάνιση γίνεται με εμβάπτυση των φιλμ σε διαλύματα Developer και Fixer.

2.5.2.5 Πρωτογενή αντισώματα

Τα πρωτογενή αντισώματα και οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

Actin (Cell Signaling #4967, 1:1000), **p53** (Santa Cruz, clone DO-7, #47698, 1:500),

Cyclin E (Santa Cruz, clone 19, #198, 1:400).

2.6 In Situ τεχνικές

2.6.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IF) σε κύτταρα

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική εντοπισμού ενός αντιγόνου σε κυτταρικό ή/και ιστικό επίπεδο. Επιπλέον, παρέχει αδρές πληροφορίες για την εκτίμηση της έκφρασης μιας πρωτεΐνης καθώς και για τον κυτταρικό τόπο όπου εντοπίζεται η μελετώμενη πρωτεΐνη. Βασίζεται στην σύνδεση ενός ειδικού αντισώματος με την υπό μελέτη πρωτεΐνη και στην ανίχνευση αυτού του συμπλόκου με έμμεσες μεθόδους. Στις μεθόδους αυτές χρησιμοποιείται ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές) το οποίο συνδέεται με μια φθορίζουσα χρωστική (κόκκινη ή πράσινη) που εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και η παρατήρηση συμβαίνει σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού.

Κύτταρα επιστρώνονται σε καλυπτρίδες όπου υπόκεινται στις κατάλληλες επιδράσεις, μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεύδης 4% σε PBS ή 100% μεθανόλης για 10 λεπτά και φυλάσσονται στους 4 °C. Η διαπερατοποίηση των κυτάρων γίνεται με επώαση σε διάλυμα Triton-X 100 (Sigma) 0,5% σε PBS για 5 λεπτά, το οποίο απομακρύνεται με 3 πεντάλεπτα πλυσίματα με PBS. Ακολουθεί κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με επώαση σε διάλυμα blocking (Ultra V Block), προερχόμενο από το kit της ανοσοϊστοχημείας “UltraVision Quanto Detection system” της Thermo Scientific, για 5

λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ολονύκτια επώαση με τα πρωτογενή αντίσωμα αραιωμένα σε PBS 1x στους 4 °C. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το: **p21** (Santa Cruz, clone F-5, #6246, αραιώση 1:50). Την επόμενη ημέρα μετά από 3 πεντάλεπτα πλυσίματα με PBS 1x, τα κύτταρα επωάζονται με τα δευτερογενή αντισώματα (αραιώση 1:500 σε PBS 1x), που είναι συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες [Alexa Fluor® 488 or Alexa Fluor® 568 (Invitrogen)], για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική DAPI (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/mL, πλύσιμο με PBS 1x για την απομάκρυνση κρυστάλλων, κάλυψη με PBS-γλυκερόλη 40% και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.6.2 Ιστοχημική χρώση με τη χημική ένωση GL13 για την ανίχνευση κυτταρικής γήρανσης

Η χημική ένωση GL13 (εμπορική ονομασία SenTraGor, Arriani) ανιχνεύει τη λιποφουσκίνη που συσσωρεύεται στα γηρασμένα κύτταρα και είναι συνδεδεμένη με βιοτίνη. Αραιώνεται σε 100% αιθανόλη και επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 60 °C μέχρι να διαλυθεί πλήρως.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες και μονιμοποιούνται με διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% σε PBS για 15 λεπτά. Ακολουθεί αφυδάτωση με επώαση σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (50% και 70%), τοποθέτηση μίας σταγόνας GL13 στην καλυπτρίδα με σύριγγα και φίλτρο διαμέτρου 0,22 µm και κάλυψη του δείγματος με άλλη καλυπτρίδα. Η πραγματοποίηση της αντίδρασης παρατηρείται στο μικροσκόπιο για 5-8 λεπτά και στη συνέχεια αφαιρείται το κάλυμμα και ξεπλένεται το δείγμα 3 φορές με αιθανόλη 50% και μία με διάλυμα TBS (Tris Buffered Saline). Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαπερατοποιούνται με διάλυμα 0,3-0,5% Triton-X 100 σε TBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επωάζονται με αντίσωμα έναντι της βιοτίνης (ab201341, Abcam) αραιωμένο 1:300 σε TBS για μία ώρα στους 37 °C. Ακολουθεί πλύση με διάλυμα TBS, ενίσχυση του πρωτογενούς αντισώματος με το Primary amplifier antibody του kit ανοσοϊστοχημείας UltraVision Quanto Detection system (Thermo Scientific) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου, επόμενη πλύση με διάλυμα TBS, επώαση του δείγματος με HRP Polymer του kit ανοσοϊστοχημείας για 10 λεπτά σε θερμοκαρασία δωματίου, πλύση με διάλυμα TBS και εφαρμογή στο πλακάκι του DAB Chromogen αραιωμένο 1/200-1/300 για 30-50 δευτερόλεπτα. Τέλος, το δείγμα πλένεται με νερό, βάφεται με ¼ αραιωμένη αιματοξυλίνη, καλύπτεται με γλυκερόλη 40% και παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.6.3 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 χτυπά 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.

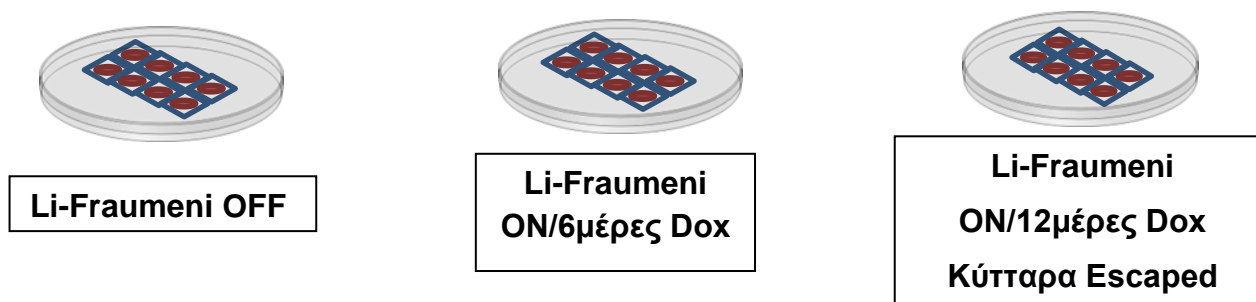
Τα σύγχρονα «ηλεκτρονικά μικροσκόπια» έχουν δυναμικότητα διακριτικού ορίου 1-2 περίπου μονάδων Angström. Με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης έχει προσεγγιστεί η δυνατότητα παρατήρησης του βιολογικού κόσμου σε ατομικό και μοριακό επίπεδο. Η παρατήρηση του ειδώλου γίνεται πάνω σε μια φθορίζουσα οθόνη. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαθέτει φωτογραφικό σύστημα συμβατικό ή ψηφιακό, όπου αποτυπώνεται το είδωλο ως ηλεκτρονιογραφία.

2.6.3.1 Υλικά ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

- Χλωροφόρμιο (#100776B, BDH)
- Παστίλιες καυστικού νατρίου (NaOH) (#01147, Ferak)
- Ακετόνη (acetone)
- 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 50ml
- 1 γυάλινο μπουκάλι των 50ml
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- 1 τρυβλίο Petri
- Πλέγματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (grids)
- Χαρτί χωρίς ίνες για grids
- Χαρτί Whatman
- Διηθητικό χαρτί
- Αυτοκόλλητες ετικέτες
- Κουτί αποθήκευσης πλεγμάτων HM (grid box)
- Βελόνα ανατομίας

2.6.3.2 Πειραματικός σχεδιασμός για ηλεκτρονική μικροσκοπία

Δύο κύκλοι πειραμάτων



Χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία petri διαμέτρου 100mm για κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες προκειμένου να συλλεχθούν όσο το δυνατόν περισσότερα κύτταρα και να μπορέσουν να φυγοκεντρηθούν αποτελεσματικά.

Li-Fraumeni OFF: Η συνθήκη αυτή χαρακτηρίζεται ως “OFF” μιας και με βάση το σύστημα Tet-ON που χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο CDKN1A δεν εκφράζεται καθόλου απουσία Δοξουκυκλίνης μέχρι τα κύτταρα να μονιμοποιηθούν και αφού υποστούν τις κατάλληλες διεργασίες να παρατηρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Li-Fraumeni ON/6 ημερών: Σε αυτή τη συνθήκη η επαγωγή του γονιδίου CDKN1A ξεκινά την ημέρα 0 και συνεχίζεται μέχρι και την 6^η μέρα, με την προσθήκη του αντιβιοτικού Δοξουκυκλίνη (παράγωγο της Τετρακυκλίνης) ανά δύο ημέρες σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml.

Li-Fraumeni ON/12 ημερών: : Σε αυτή τη συνθήκη η επαγωγή του γονιδίου CDKN1A ξεκινά την ημέρα 0 και συνεχίζεται μέχρι και την 12^η μέρα, με την προσθήκη του αντιβιοτικού Δοξουκυκλίνη (παράγωγο της Τετρακυκλίνης) ανά δύο ημέρες σε τελική συγκέντρωση 2μg/ml.

2.6.3.3 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 ml διαλύματος θρυψίνης και επώαση σε κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 3-5min.

Το διάλυμα θρυψίνης - κυττάρων το μοιράζω 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%. Αλλαγή του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας και προσθήκη Δοξουκυκλίνης κάθε 2 ημέρες και τακτική παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο.

Παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού/αντίθεσης φάσεων και φωτογράφιση

Η παρατήρηση των κυττάρων LiFraumeni-TetOn-p21 έγινε σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού/αντίθεσης φάσεων Zeiss Axiovert S100 με τη χρήση αντικειμενικών φακών x10 και x20.

Κατόπιν, έγινε διαδοχική φωτογράφιση του ίδιου πεδίου στη λειτουργία φωτός για τη μεγέθυνση x10 και στη λειτουργία αντίθεσης φάσεων για τη μεγέθυνση x20. 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.

Μονιμοποίηση των κυττάρων

Η μονιμοποίηση των κυττάρων έχει σκοπό την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου με χημικούς και φυσικούς τρόπους. Η φορμαλδεΐδη που χρησιμοποιείται στις παρακάτω συνταγές προέρχεται από αποπολυμερισμό παραφορμαλδεΐδης υψηλής καθαρότητας. Για την παρασκευή της ζεσταίνεται απεσταγμένο νερό στους 58-60°C και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της παραφορμαλδεΐδης ώστε να επιτευχθεί η ζητούμενη συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα. Το διάλυμα της παραφορμαλδεΐδης 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% παραφορμαλδεΐδη – 0.5% γλουταραλδεΐδη σε 0.1M PB, pH 7.4

6% παραφορμαλδεΐδη 18,75 ml

25% γλουταραλδεΐδη 1 ml

0.2M PB 25 ml

ddH₂O 5.25 ml

Αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο και ακολουθεί πρώτη μονιμοποίηση των κυττάρων με 3% παραφορμαλδεύδη + 0,5% γλουταραλδεύδη 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 1.200λ 0.1M PB, pH 7.4

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 Eppendorf. Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικά τα παρακάτω βήματα:

- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 1500g για 10 λεπτά.
- 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.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 1000g για 10 λεπτά και μεταφορά του Eppendorf στον πάγο ώστε να στερεοποιηθεί η ζελατίνη.
- Επιλογή των περιοχών των κυττάρων εγκλεισμένων στη ζελατίνη κάτω από το στερεοσκόπιο και φύλαξή τους σε 0.1M PB, pH 7.4 στους 4°C.
- Τέλος, χειρισμός των blocks κύτταρα- ζελατίνη σαν ιστοτεμάχια. Κατά την αφυδάτωση, η ζελατίνη αφυδατώνεται και από κυβοειδής εμφάνιση που έχει γίνεται σαν φλοίδα (στην 100% αιθανόλη).

Συμπληρωματική μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα OsO₄ 1% aq

Το διάλυμα OsO₄ 1% aq 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.

Αφυδάτωση των κυττάρων

Στη συνέχεια ακολουθεί αφυδάτωση των κυττάρων με διάλυμα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης 25% v/v, 50% v/v, 70% v/v, 95% v/v τα οποία προστίθενται διαδοχικά για 5 λεπτά στους 4°C. Τέλος, προστίθεται διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 100% v/v, 3x7 min σε RT.

Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με διάλυμα προπυλενοξειδίου για 10 λεπτά συνολικά, σε RT. Το C₃H₆O είναι διαλύτης των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο.

Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα μίγμα C₃H₆O/εποξική ρητίνη σε αναλογία 2/1 για 30 λεπτά στο μηχάνημα περιστροφής φιαλιδίων και ακολουθεί προσθήκη μίγματος C₃H₆O/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.

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 παρακάτω μίγμα εποξικών ρητινών Epon/Araldite (**Πίνακας 2.1**):

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

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

Πίνακας 2.1: Παρασκευή μίγματος ρητινών. Σε καθαρό και στεγνό ποτήρι ζέσεως ζυγίζουμε τα τέσσερα πρώτα συστατικά και στη συνέχεια αναδεύουμε ήπια με μία 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.

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

Τμήση τομών

Τα δείγματα κόβονται σε ημίλεπτες τομές πάχους $1\mu\text{m}$ 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	1gr
dH ₂ O	50ml
- **2% βορικό νάτριο**

βορικό νάτριο	1gr
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 ΗΜΔ (Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης).

Χρώση

Συνήθως τα βιολογικά δείγματα είναι τελείως διαπερατά από τα ηλεκτρόνια γιατί τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται (συνήθως C, H, O και N) είναι πολύ ελαφριά για να σκεδάσουν τα επιταχυμένα ηλεκτρόνια και 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.

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

0.375gr 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 φιλτράρεται με φίλτρο με μέγεθος πόρου 0.2μm.

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

0.04gr 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 φιλτράρεται με φίλτρο με μέγεθος πόρου 0.2μm.

Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε στο HM Philips EM 420 με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus, model: MegaView G2 του ΙΙΒΕΑΑ.

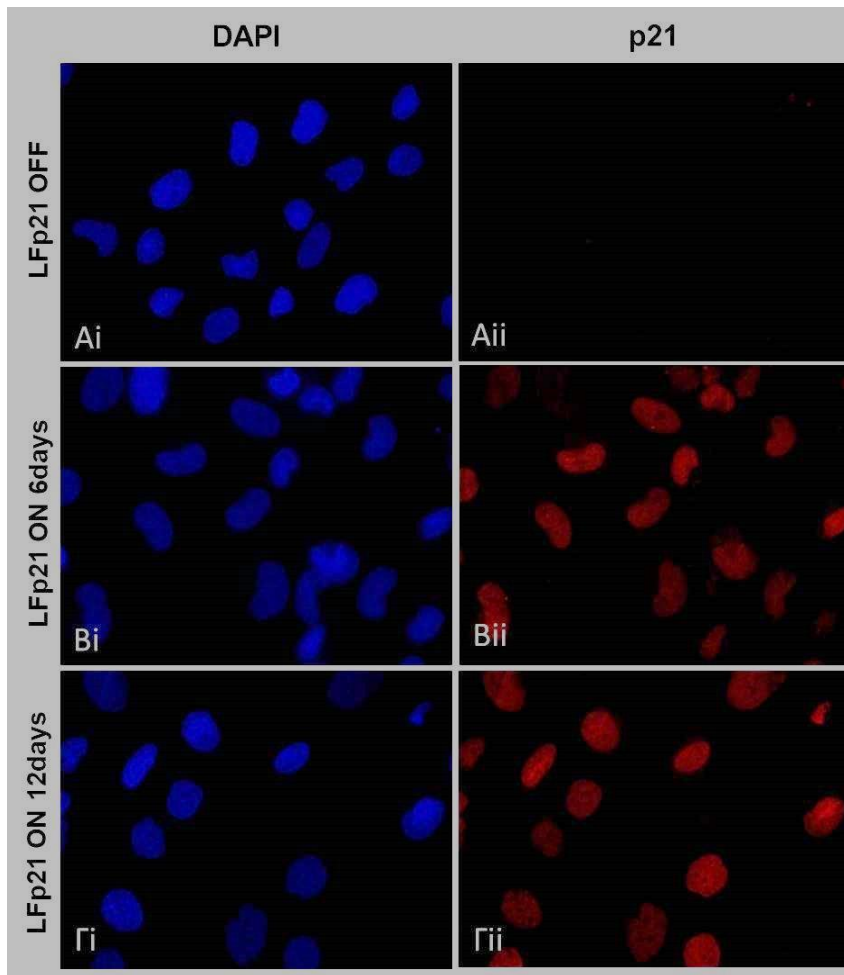
Κεφάλαιο 3^ο

Αποτελέσματα



3.1 Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 ύστερα από ενεργοποίηση του επαγωγίμου συστήματος TetONp21 σε ινοβλάστες Li-Fraumeni

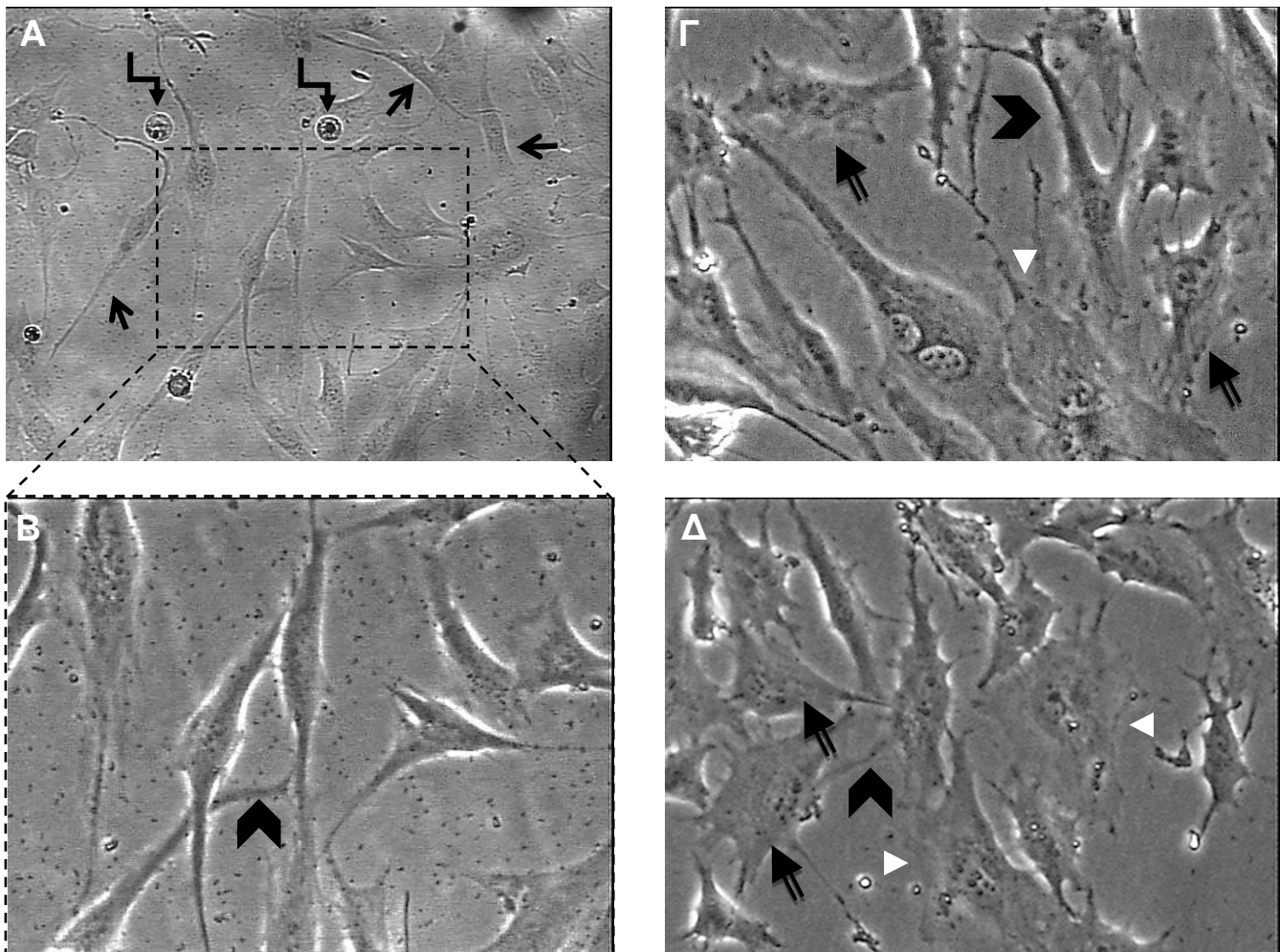
Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου p21 στα κύτταρα Li-Fraumeni TetON p21 πραγματοποιήθηκε στα 3 διαφορετικά χρονικά διαστήματα των 0, 6 και 12 ημερών ύστερα από την προσθήκη του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (Doxycyclin, Dox). Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα και η λειτουργικότητα τους συστήματος TetON με το οποίο έχουν μετασχηματιστεί οι ινοβλάστες Li-Fraumeni που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα πιστοποιήθηκε η αναμενόμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στον πυρήνα των κυττάρων, μετά από ενεργοποίηση του εν λόγω συστήματος μέσω της προσθήκης του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη στο καλλιεργητικό υλικό σε συγκέντρωση 2μg/ml (**Εικόνα 3.1**). Η ενεργοποίηση του p21 ταυτοποιήθηκε έμμεσα και με την τεχνική του ανοσοστυπώματος κατά Western μιας και βρέθηκε μειωμένη κατά 40% η έκφραση της κυκλίνης E στα Li-Fraumeni ON 6days σε σχέση με τα OFF (**Παράρτημα**). Η τελευταία αποτελεί έναν αρνητικά ρυθμιζόμενο καθοδικό στόχο της πρωτεΐνης αυτής μαζί με την κινάση CDK2 στην προσπάθεια της p21 να σταματήσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην φάση S (Abbas and Dutta 2009).



Εικόνα 3.1. Μελέτη της έκφρασης της p21 στα κύτταρα Li-Fraumeni-TetON p21 (LFp21) με ανοσοφθορισμό: Η πρωτεΐνη p21 δεν εκφράζεται στα κύτταρα LFp21 OFF στα οποία δεν χορηγήθηκε Dox (Εικ. Aii), ενώ παρατηρείται αυξημένη στους πυρήνες τόσο των γηρασμένων κυττάρων μετά από επώαση 6 ημερών με Dox (LFp21 ON 6days) (Εικ. Bii), όσο και των κυττάρων που έχουν διαφύγει του μηχανισμού της γήρανσης μετά από επώαση 12 ημερών με Dox (LFp21 ON 12days) (Εικ. Γii). Στην αριστερή στήλη (Εικ. Ai, Bi, Gi) απεικονίζονται, ανά συνθήκη, οι πυρήνες των κυττάρων με το φθορίζων μόριο DAPI στο ίδιο πεδίο με αυτό της δεξιάς στήλης. Αρχική μεγέθυνση x 400.

3.2 Παρατήρηση σε πεδίο αντίθεσης φάσης της μορφολογίας των κυττάρων Li-Fraumeni TetON p21

Τα κύτταρα Li-Fraumeni TetON p21 εμφανίζουν μια ποικιλότητα ως προς τη δομή τους, όμως όλα παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική μορφολογία μεσεγχυματικών κυττάρων. Έχουν δηλαδή το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα, με ευδιάκριτους πυρήνες, και εμφανίζονται φαινοτυπικά ως κύτταρα είτε με πλακώδες/ατρακτοειδές είτε με επιμήκες/ατρακτοειδές σχήμα. Πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού Dox στα κύτταρα (**OFF**), ένας αριθμός κυττάρων έχει την χαρακτηριστική επιμήκη και ατρακτοειδή εμφάνιση των μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ οι πυρήνες τους δεν είναι ιδιαίτερα εμφανείς (**Εικόνα 3.2 Α,Β**). Επιπλέον, σε ορισμένα οπτικά πεδία υπάρχει μια ομάδα κυττάρων με ατρακτοειδές αλλά περισσότερο πεπλατυσμένο σχήμα, με ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους. Λιγότερο συχνή είναι η παρουσία κυττάρων με μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα προαναφερθέντα, καθώς και πολυπύρηνων κυττάρων (**Εικόνα 3.2 Γ,Δ**). Συχνά παρατηρούνται και κυτταρικές προσεκβολές οι οποίες εκτείνονται συνήθως σε διπλανά κύτταρα (**Εικόνα 3.2 Β,Γ,Δ**). Επίσης, παρατηρείται κυτταρική απόπτωση σε μικρό ποσοστό (**Εικόνα 3.2 Α**).

Li-Fraumeni TetON p21 OFF (χωρίς προσθήκη Dox)

Εικόνα 3.2: Μορφολογία κυττάρων Li-Fraumeni-TetON p21 χωρίς επώαση με Dox (OFF), σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.

A: Η πλειοψηφία των κυττάρων έχει χαρακτηριστική ατρακτοειδή-επιμήκη εμφάνιση (μαύρα βέλη) ενώ διακρίνονται και ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα (μαύρα κεκαμμένα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x100.

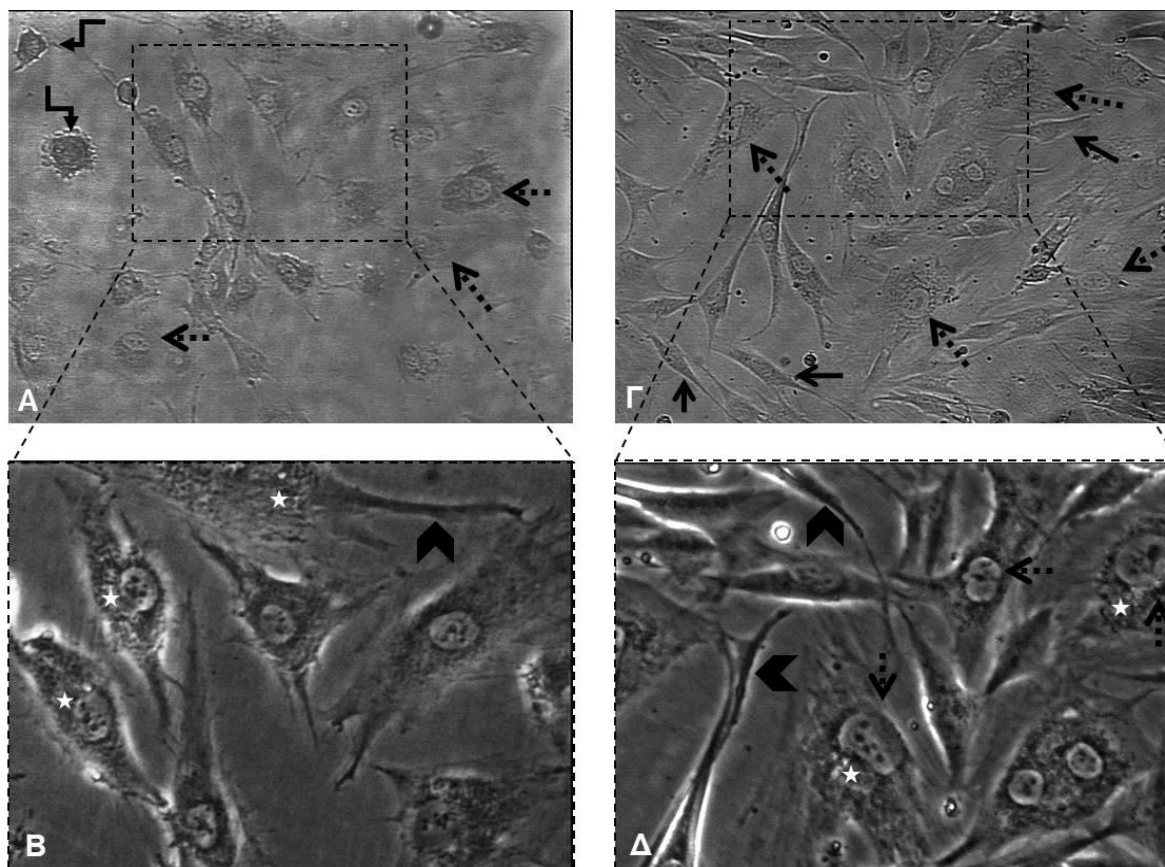
B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A). Ομάδα κυττάρων με χαρακτηριστικό ατρακτοειδές-επίμηκες σχήμα χωρίς ιδιαίτερα ευδιάκριτους πυρήνες. Είναι εμφανείς επίσης κυτταρικές προσεκβολές (κεφαλή βέλους).

Γ,Δ: Η πλειοψηφία των κυττάρων στα συγκεκριμένα οπτικά πεδία παρουσιάζουν ένα ατρακτοειδές και περισσότερο πεπλατυσμένο σχήμα με ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους (μαύρα βέλη με διπλή γραμμή). Επίσης διακρίνονται κύτταρα με μεγαλύτερη αναλογία κυτταροπλάσματος/πυρήνα, ακόμα πιο πεπλατυσμένα σε σχέση με τα προηγούμενα και με εξίσου ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους (λευκές κεφαλές βέλους). Λιγότερο συχνή είναι η παρουσία πολυπύρηνων κυττάρων (εικόνα Γ), ενώ οι κυτταρικές προσεκβολές είναι πιο έντονα αναπτυγμένες (μαύρες κεφαλές βέλους).

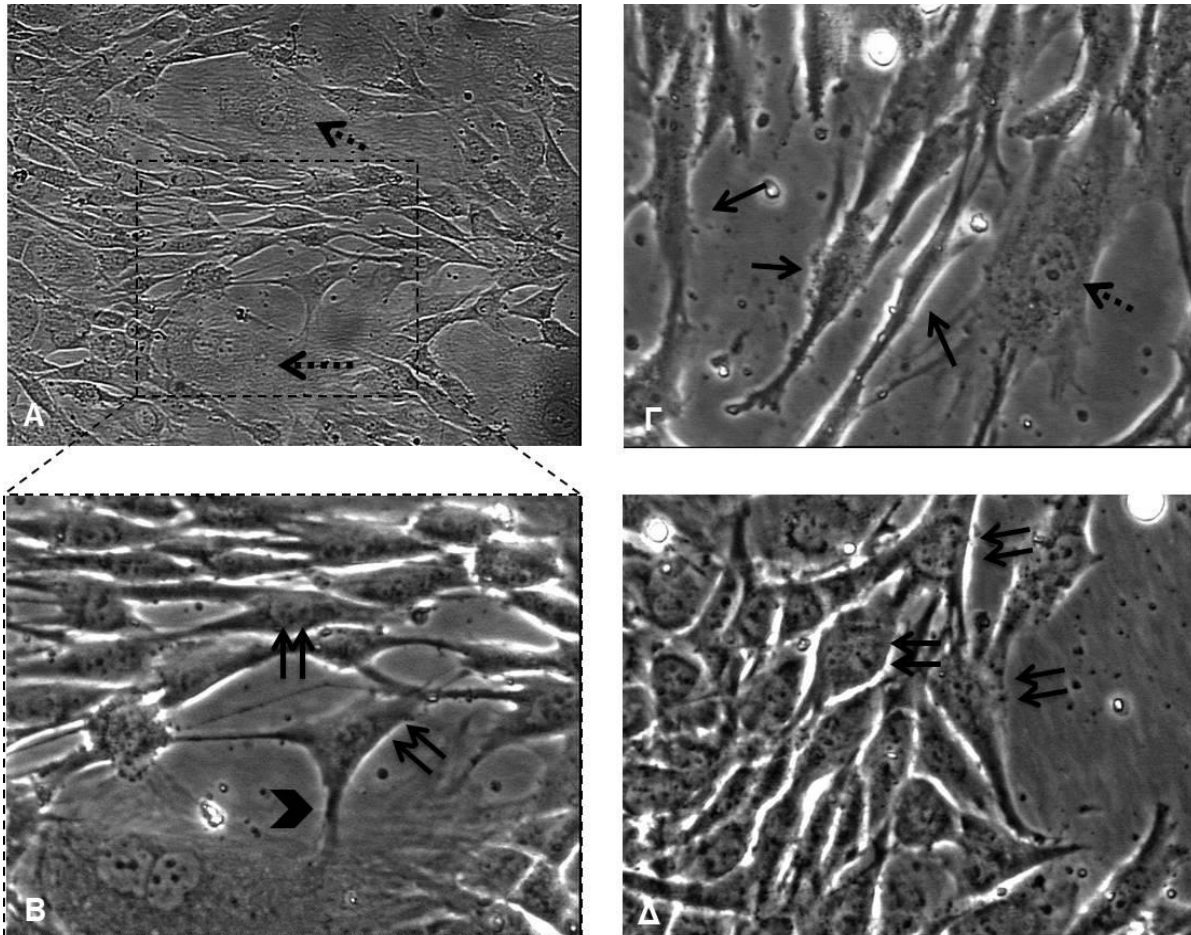
B,Γ,Δ: Αρχική μεγέθυνση: x200.

Αφού γίνει η προσθήκη της Dox, μετά το πέρας 6 ημερών (**κύτταρα ON 6 μέρες**), έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή γήρανσης στα κύτταρα. Παρατηρούνται κύτταρα σε γήρανση με χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα, μεγάλο μέγεθος, διογκωμένους και ιδιαίτερα ευκρινείς πυρήνες (**Εικόνα 3.3 A,B,Γ,Δ**). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μεγαλύτερη μεγέθυνση το κυτταρόπλασμα των κυττάρων αυτών φαίνεται να είναι κοκκιώδες κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στα κύτταρα OFF (**Εικόνα 3.3 B**). Επιπλέον, λίγα κύτταρα διατηρούν το επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα τους (**Εικόνα 3.3 Γ,Δ**). Λιγότερο συχνά παρατηρούνται κύτταρα σε απόπτωση τα οποία συνήθως εντοπίζονται γειτονικά με τα κύτταρα σε γήρανση (**Εικόνα 3.3 A**). Τέλος, συχνή εικόνα αποτελούν οι λεπτές κυτταρικές προσεκβολές που εκτείνονται στον διακυτταρικό χώρο (**Εικόνα 3.3 B,Δ**).

Μετά από την παρατεταμένη επώαση των κυττάρων με την Dox, για χρονικό διάστημα 12 ημερών, εμφανίζεται ένας υποπληθυσμός κυττάρων τα οποία έχουν διαφύγει της γήρανσης (**escaped**) και έχουν εισέλθει κανονικά στη φάση “S” του κυτταρικού κύκλου, τα οποία διαφέρουν μορφολογικά από τα αντίστοιχα γηρασμένα, ενώ εμφανίζονται με ποικίλους φαινοτύπους. Αυτά τα κύτταρα πλαισιώνουν συνήθως τα γηρασμένα κύτταρα που έχουν παραμείνει ανέπαφα στην καλλιέργεια (**Εικόνα 3.4 A**). Συχνή είναι η παρουσία ομάδων από **escaped** κύτταρα που έχουν ένα ατρακτοειδές σχήμα με ευδιάκριτους πυρήνες και πολυάριθμους πυρηνίσκους (**Εικόνα 3.4 B**), ενώ παράλληλα παρατηρούνται κάποια κύτταρα με περισσότερο επιμήκη μορφολογία και λιγότερο ευδιάκριτους πυρήνες σε σχέση με τα προηγούμενα (**Εικόνα 3.4 Γ**). Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η παρουσία κάποιων ατρακτοειδών **escaped** κυττάρων τα οποία έχουν αποκτήσει ένα ευμεγέθη-υποστρόγγυλο κυτταρικό σώμα με ευδιάκριτο πυρήνα και πολυάριθμους πυρηνίσκους (**Εικόνα 3.4 Δ**). Εμφανής είναι επίσης και ο σχηματισμός προσεκβολών από πλευράς διαφυγόντων κυττάρων για λόγους επικοινωνίας με τα πλησιέστερα γηρασμένα κύτταρα και το αντίστροφο (**Εικόνα 3.4 B, Γ**).

Κύτταρα Li-Fraumeni TetON p21, ON 6 μέρεςΚύτταρα σε φάση γήρανσης

Εικόνα 3.3: Μορφολογία κυττάρων Li-Fraumeni-TetON p21 ON, ύστερα από επώαση με Dox για 6 μέρες, σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.
 Α: Η πλειοψηφία των κυττάρων είναι σε κατάσταση γήρανσης (διακεκομμένα βέλη) με χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο σχήμα, μεγάλο μέγεθος και ευδιάκριτο πυρήνα. Επίσης διακρίνονται ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα (κεκαμμένα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x100.
 Β: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (Α). Ομάδα γηρασμένων κυττάρων με κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (λευκοί αστερίσκοι), ευμεγέθεις υποστρόγγυλους πυρήνες και ευδιάκριτες κυτταρικές προσεκβολές (μαύρη κεφαλή βέλους). Αρχική μεγέθυνση: x200.
 Γ: Ανάμεσα σε μια ευρεία ομάδα γηρασμένων κυττάρων (διακεκομμένα βέλη), διακρίνονται κύτταρα με χαρακτηριστικό ατρακτοειδές-επίμηκες σχήμα χωρίς ευδιάκριτους πυρήνες (μαύρα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x100.
 Δ: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (Γ). Διακρίνονται γηρασμένα κύτταρα με μεγάλη αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος και διακριτούς πυρηνίσκους (διακεκομμένα βέλη), κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (λευκός αστερίσκος), ενώ κάποια από αυτά έχουν πολυάριθμους πυρήνες (κάτω και δεξιά). Λιγότερο συχνά παρατηρούνται και μικρότερα σε μέγεθος κύτταρα, περισσότερο ατρακτοειδή με ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους. Παρατηρούνται επίσης κυτταρικές προσεκβολές (μαύρες κεφαλές βέλους) μέσω των οποίων τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους. Αρχική μεγέθυνση: x200.

Κύτταρα Li-Fraumeni TetON p21, ON 12 μέρεςΚύτταρα σε φάση διαφυγής από τη γήρανση (κύτταρα escaped)**Εικόνα 3.4: Μορφολογία κυττάρων Li-Fraumeni-TetON p21 ON, ύστερα από επώαση με Dox για 12 μέρες, σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.**

A: Παρατηρείται ομάδα κυττάρων τα οποία έχουν διαφύγει του μηχανισμού της γήρανσης (escaped). Ανάμεσά τους παρατηρούνται δύο μεγάλα γηρασμένα κύτταρα (διακεκομμένα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x100.

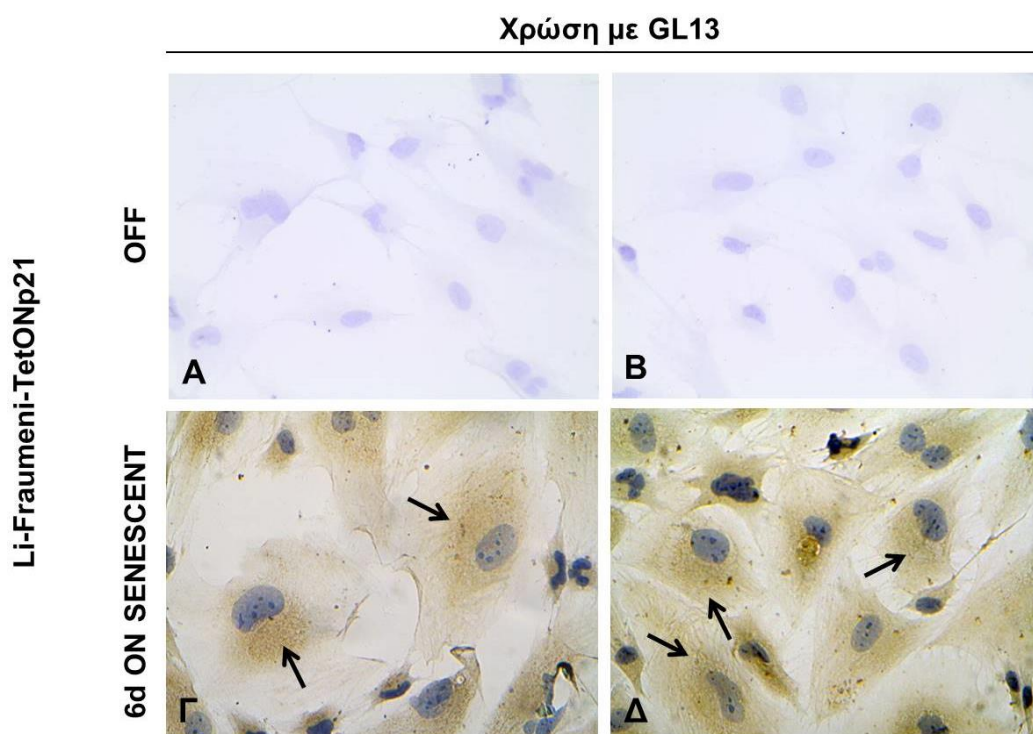
B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A), όπου παρατηρούνται τα “escaped” κύτταρα (διπλά μαύρα βέλη) με ατρακτοειδές σχήμα και ευδιάκριτους πυρήνες και πυρηνίσκους. Ορισμένα φαίνεται να επικοινωνούν με το γηρασμένο κύτταρο (κάτω αριστερά) διαμορφώνοντας προσεκβολές (κεφαλή βέλους). Αρχική μεγέθυνση: x200.

Γ: Μεταξύ των escaped κυττάρων, λιγότερα συχνά παρατηρούνται κύτταρα με επίμηκες και ατρακτοειδές σχήμα χωρίς ιδιαίτερα ευδιάκριτους πυρήνες (μαύρα βέλη) δίπλα από ένα γηρασμένο κύτταρο (διακεκομμένο βέλος). Αρχική μεγέθυνση: x200.

Δ: Ομάδα κυττάρων “escaped” τα οποία είναι ατρακτοειδούς σχήματος με ευμεγέθη κυτταρικό σώμα, εμφανείς πυρήνες και πολυάριθμους πυρηνίσκους (διπλά μαύρα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x200.

3.3 Ανίχνευση κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα Li-Fraumeni ON 6days με τη χημική ένωση GL13

Μετά από την παρατήρηση μορφολογικών διαφορών μεταξύ των κυττάρων OFF και των κυττάρων ON 6 ημερών σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, πιστοποιήθηκε περαιτέρω ιστοχημικά ο φαινότυπος της κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα Li-Fraumeni ύστερα από την παρατεταμένη ενεργοποίηση του γονιδίου p21 για 6 ημέρες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα χημικό ανάλογο της ένωσης **Sudan Black B**, το αντιδραστήριο **GL13**, το οποίο ανιχνεύει την ύπαρξη συσσωρευμένης λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα γηρασμένων κυττάρων. Πράγματι, στα κύτταρα Li-Fraumeni στα οποία χορηγήθηκε Dox για 6 ημέρες παρατηρήθηκε συσσώρευση λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα τους σε αντίθεση με τα κύτταρα OFF, στα οποία απουσιάζει, όπως κατέδειξε η ιστοχημική χρώση με την **GL13** (Εικόνα 3.5).

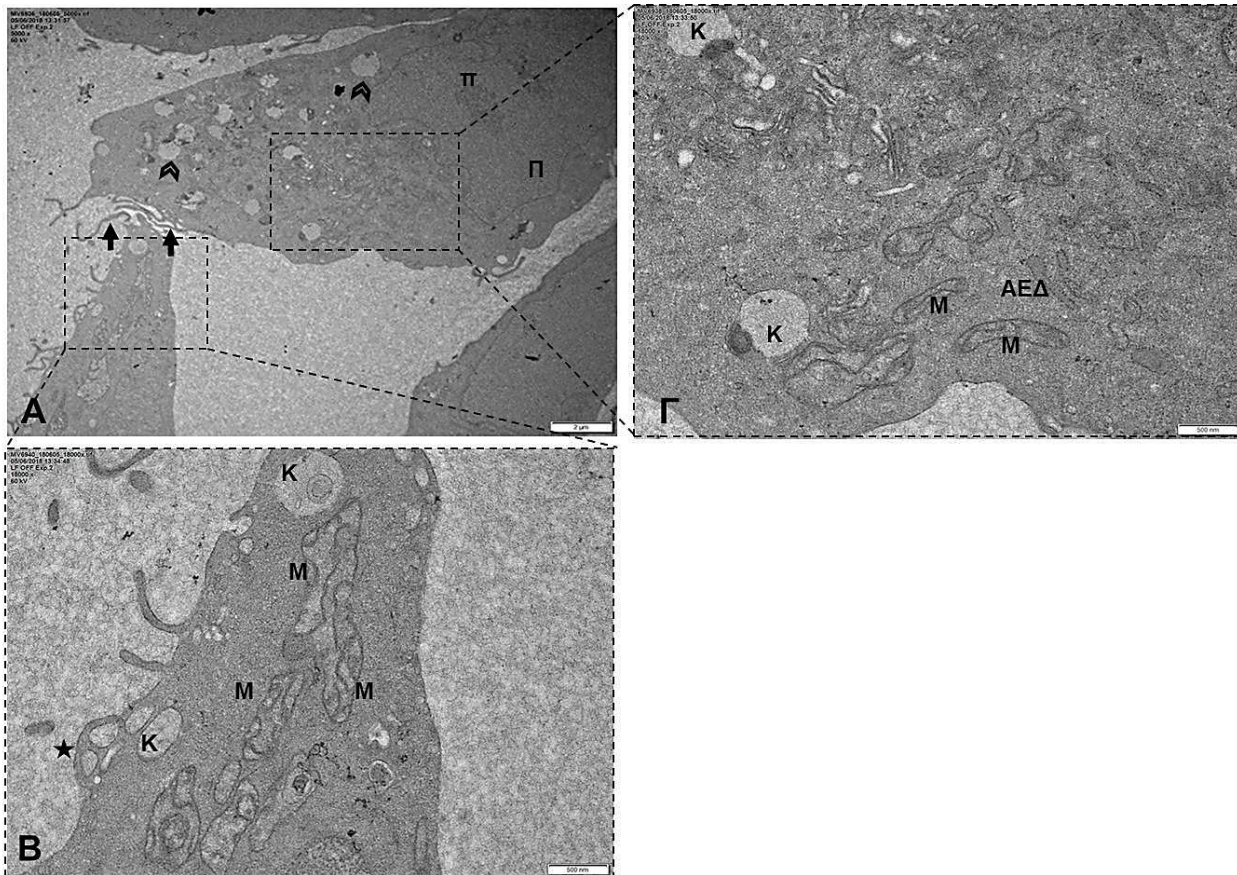


Εικόνα 3.5: Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων Li-Fraumeni, σε γήρανση, μετά από 6 ημέρες επαγωγής του p21. Ενδεικτικές εικόνες οπτικής μικροσκοπίας που δείχνουν την καθολική παρουσία γηρασμένων, πεπλατυσμένων κυττάρων μετά την εφαρμογή της ειδικής υβριδικής ιστο-ανοσοϊστοχημικής χρώσης με GL13 για τον εντοπισμό της λιποφουσκίνης (Εικ. Γ, Δ). Η παρουσία αυτής είναι έκδηλη λόγω του καφέ στικτού σήματος στο κυτταρόπλασμα των γηρασμένων κυττάρων (βέλη), κάτι που δεν υπάρχει στα κύτταρα OFF (Εικ. Α, Β). Αρχική μεγέθυνση (Α), (Β), (Γ), (Δ): x400.

3.4 Παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης της υπερμικροσκοπικής δομής των κυττάρων Li-Fraumeni TetON p21

Κύτταρα Li-Fraumeni OFF

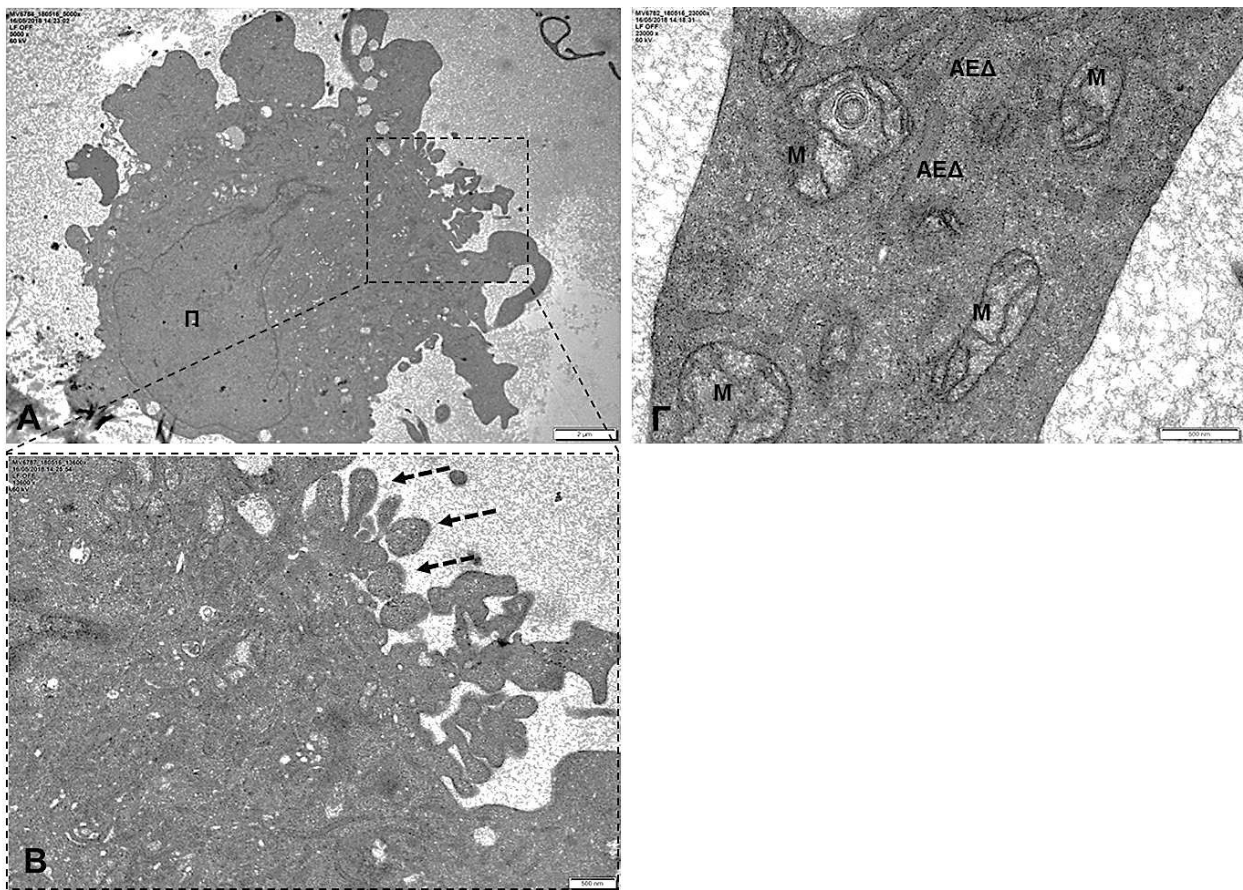
Η παρατήρηση των **κυττάρων OFF** στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε την παρουσία λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών στην περιφέρεια πολλών κυττάρων οι οποίες ενίοτε αποκόβονται από το υπόλοιπο κυτταρικό σώμα ή/και εκτείνονται προς γειτονικά κύτταρα (**Εικόνες 3.6 A; 3.8 A, Γ**). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ωστόσο, παρουσιάζει η καθολική παρουσία ελαττωματικών μιτοχονδρίων με αποδιοργανωμένες τις ακρολοφίες τους (**Εικόνες 3.6 B, Γ; 3.7 Γ; 3.8 B, Δ**). Επιπλέον κάποια κύτταρα φέρουν αρκετά κυστίδια κάποια από τα οποία εμπεριέχουν και οργανίδια. Η εγκόλπωση αυτών των κυστιδίων μάλλον φαίνεται να γίνεται μέσω των λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών που αναφέρθηκαν πιο πάνω (**Εικόνα 3.6 B, Γ**), ενώ λιγότερο συχνή είναι η παρουσία σφαιρικών προσεκβολών (**Εικόνα 3.7 A, B**). Τέλος, ελάχιστα είναι τα κύτταρα που φέρουν πολυλοβωτό πυρήνα (**Εικόνα 3.8 A, B**) και αυτοφαγосώματα (**Εικόνα 3.8 Γ, Δ**).

Li-Fraumeni TetON p21 OFF (χωρίς προσθήκη Dox)**Εικόνα 3.6: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 πριν την επώαση με Dox (κύτταρα OFF). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.**

A: Ομάδα κυττάρων OFF. Μεταξύ δύο κυττάρων παρατηρούνται λεπτές κυτταροπλασματικές προσεκβολές (μαύρα βέλη). Επίσης παρατηρείται μια έντονη κυστιδοποίηση στο πάνω κύτταρο (κεφαλές βέλους). Π: πυρήνας, π: πυρηνίσκος. Αρχική μεγέθυνση x5000.

B: Μεγέθυνση τμήματος του κάτω κυττάρου της εικόνα (A). Παρατηρούνται μιτοχόνδρια (M) με μη φυσιολογικό σχήμα και με ανώμαλη διάταξη ακρολοφιών. Παρατηρούνται επίσης κυστίδια (K) ποικίλου μεγέθους στο εσωτερικό του κυττάρου από τα οποία το ένα φέρει κάποια κυτταρική δομή. Εμφανής επίσης είναι και η εγκόλπωση κυστιδίων μέσω λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών (αστερίσκος). Αρχική μεγέθυνση x18000.

Γ: Μεγέθυνση τμήματος κυτταροπλάσματος του πάνω κυττάρου της εικόνα (A), όπου παρατηρούνται -όπως και στην εικόνα (B) -μιτοχόνδρια (M) με άτυπο σχήμα και με ανώμαλη διάταξη ακρολοφιών, ενώ κάποια είναι διογκωμένα. ΑΕΔ: αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, K: κυστίδιο. Αρχική μεγέθυνση: x18000.

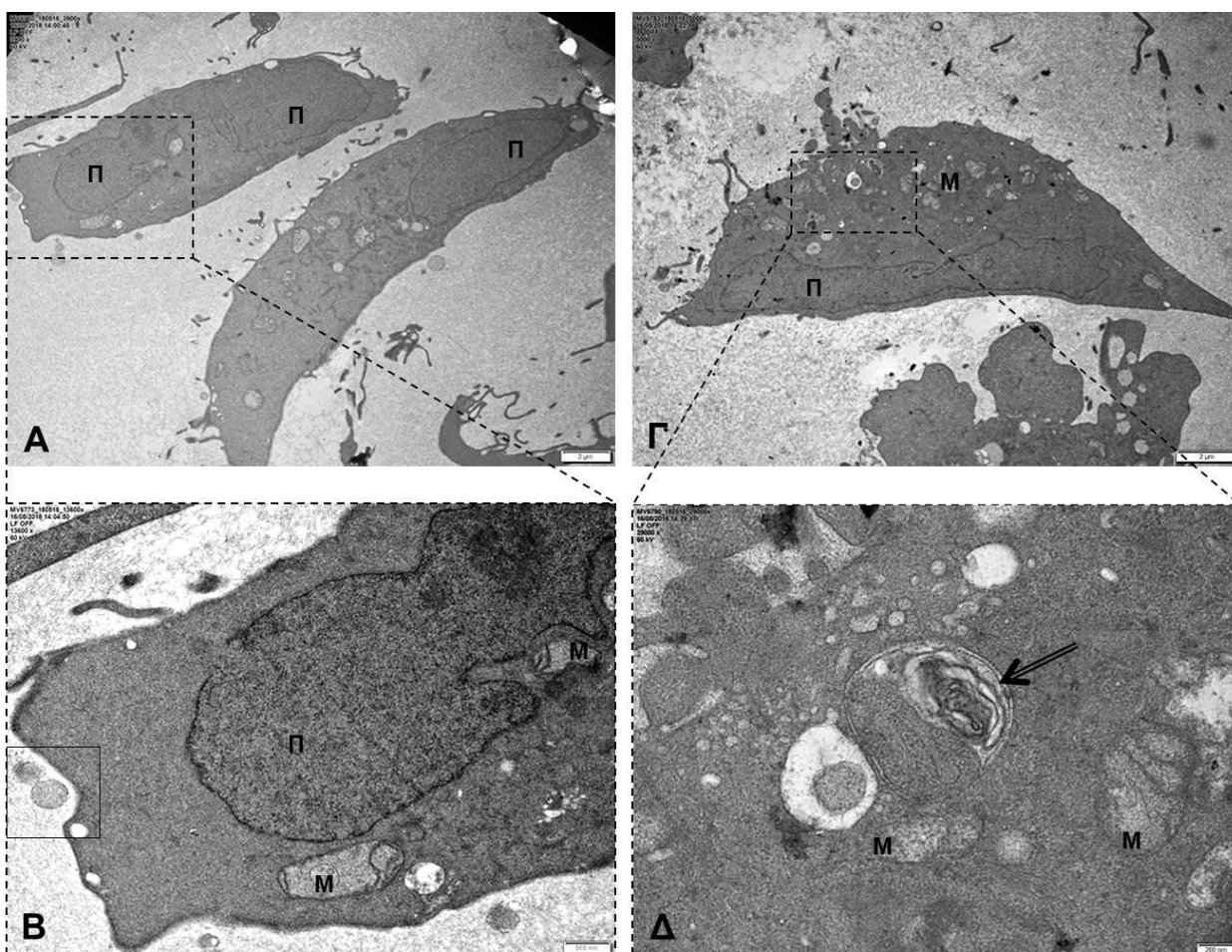


Εικόνα 3.7: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 πριν την επώαση με Dox (κύτταρα OFF). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Κύτταρο OFF με χαρακτηριστικές υποστρόγγυλες και πιο επιμηκυμένες κυτταροπλασματικές προσεκβολές στην περιφέρεια του. Ο πυρήνας (Π) έχει άτυπο σχήμα. Αρχική μεγέθυνση: x5000.

B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A) όπου φαίνεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια το δίκτυο των μικρότερων σφαιρικών περιφερικών κυτταροπλασματικών προσεκβολών (μαύρα διακεκομμένα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x13600.

Γ: Μιτοχόνδρια (M) άτυπης μορφολογίας. ΑΕΔ: αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Αρχική μεγέθυνση: x23000



Εικόνα 3.8: Ηλεκτρονιογραφίες κυτάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 πριν την επώαση με Dox (κύτταρα OFF). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Παρουσιάζονται δύο κύτταρα OFF εκ των οποίων το ένα έχει δίλοβο πυρήνα (Π). Επίσης παρατηρούνται συχνά λεπτές κυτταροπλασματικές προσεκβολές, σαν μικρολάχνες, ποικίλου μήκους. Αρχική μεγέθυνση: x3900

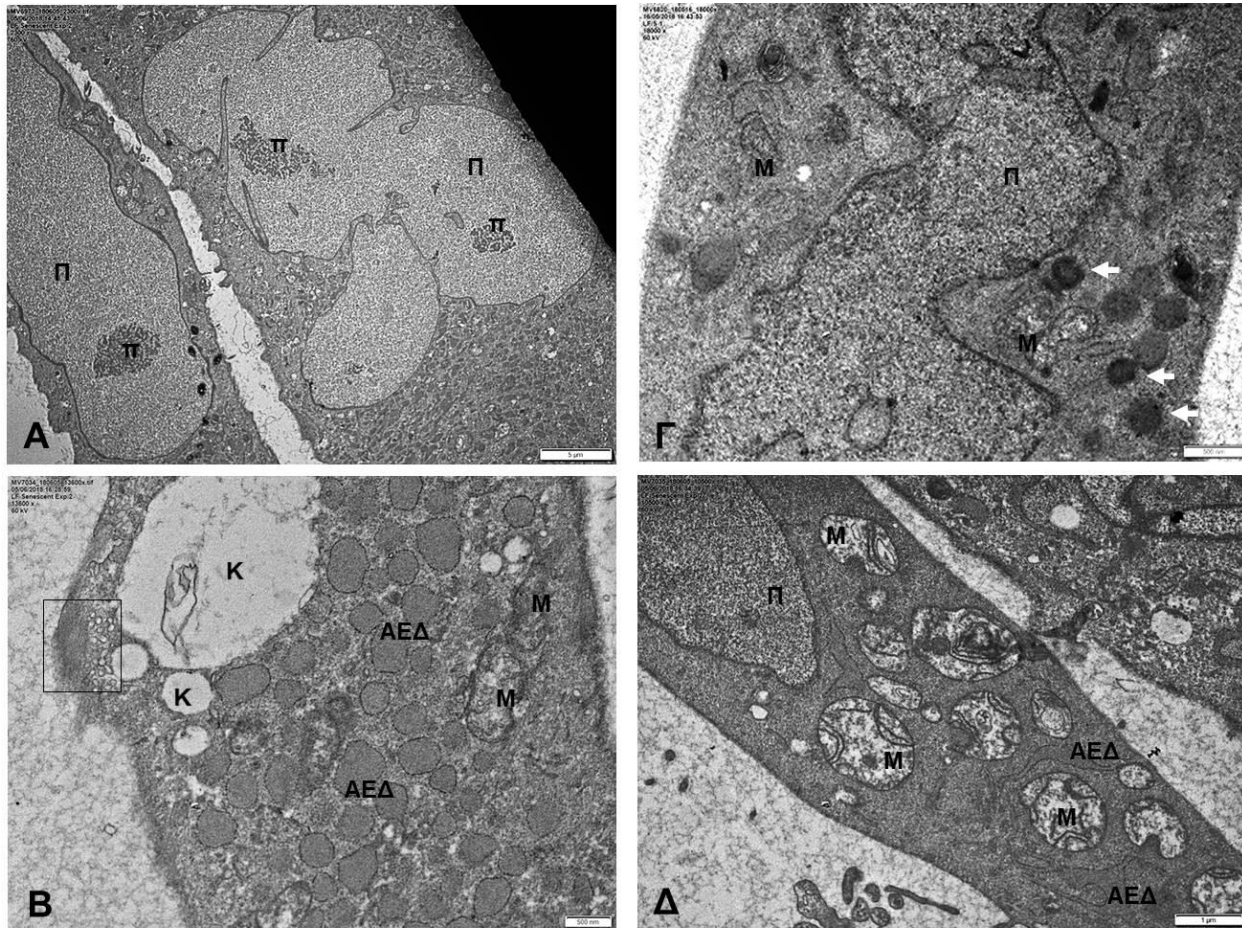
B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A), όπου απεικονίζεται μέρος του κυττάρου με τον δίλοβο πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται μιτοχόνδρια (M) με απώλεια των ακρολοφιών τους. Πλαίσιο: πιθανώς εκκριτικό κυστίδιο στο διακυτταρικό χώρο, Π: πυρήνας, π: πυρηνίσκος. Αρχική μεγέθυνση: x13600.

Γ: Κύτταρο OFF με εμφανή πυρήνα (Π) και πολλά μιτοχόνδρια (M), τα περισσότερα με ελαττωματική μορφολογία. Στην περιφέρεια του κυττάρου παρατηρούνται λεπτές και μακριές, καθώς και σφαιρικές κυτταροπλασματικές προσεκβολές. Αρχική μεγέθυνση: x5000.

Δ: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (Γ). Στο κυτταρόπλασμα παρατηρείται αυτοφαγόσωμα (βέλος) σε πρώιμη φάση στο οποίο έχει εγκλεισθεί μέρος του κυτταροπλάσματος και πιθανώς ένα μιτοχόνδριο. Δίπλα από αυτό φαίνονται μιτοχόνδρια (M) με ελαττωματική μορφολογία. Αρχική μεγέθυνση: x29000.

Κύτταρα Li-Fraumeni σε φάση γήρανσης

Κατά την παρατήρηση των κυττάρων που έχουν επωαστεί για 6 ημέρες με την Dox (LFr21 ON 6days) διακρίνονται κύτταρα με τα τυπικά χαρακτηριστικά της **γήρανσης** όπως πεπλατυσμένο σχήμα και μεγάλο μέγεθος. Ο πυρήνας των κυττάρων είναι συχνά πολυλοβωτός και καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος (**Εικόνα 3.9 A, Γ**). Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που βρίσκονται σε γήρανση έχουν χάσει μερικώς ή ολικώς τις ακρολοφίες τους (**Εικόνες 3.9 B, Δ; 3.11 A**). Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο φαίνεται να είναι εκτεταμένο στο κυτταρόπλασμα και διεσταλμένο (**Εικόνες 3.9 B; 3.10 Δ**). Επίσης συχνή είναι η παρουσία κυστιδίων ποικίλου μεγέθους στο κυτταρόπλασμα καθώς και η ενδοκυττάρωση αυτών, ενώ απαντώνται και πολλά σε αριθμό μικροκυστίδια πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης σε κάποια κύτταρα (**Εικόνες 3.9 B; 3.10 Γ; 3.11 B**). Τα LFr21 ON 6days έχουν αναπτύξει ποικίλους τρόπους διακυτταρικής επικοινωνίας. Ειδικότερα, κάποια από αυτά εκτείνουν λεπτές κυτταροπλασματικές προσεκβολές οι οποίες έρχονται σε επαφή με εκείνες γειτονικών γηρασμένων κυττάρων και ανταλλάσσουν μεταξύ τους μικροκυστίδια (**Εικόνα 3.10 A, B, Γ**). Κάποια άλλα φαίνεται να συνδέονται μεταξύ τους μέσω κυτταροπλασματικών γεφυρών στις οποίες πιθανόν λαμβάνουν μέρος μικροσωληνίσκοι (**Εικόνα 3.11 A, B**). Χαρακτηριστική είναι ακόμη η παρουσία αυτοφαγοσωμάτων σε διάφορα στάδια διαμόρφωσής τους. Σε ορισμένα κύτταρα παρατηρούνται πολλά και μικρά σε μέγεθος αυτοφαγοσώματα πρώιμης φάσης που εκτείνονται σε ένα μεγάλο μέρος του κυτταροπλάσματος (**Εικόνα 3.12 A, B**), ενώ σε κάποια άλλα εμφανίζονται πιο μεγάλα αυτοφαγοσώματα όψιμης φάσης στα οποία ενίοτε διακρίνονται εγκλεισμένα οργανίδια (**Εικόνα 3.13**). Τέλος η εντονότερη παρουσία αυτοφαγίας στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα OFF, υποστηρίζεται και από τη συχνή παρουσία πολλών λυσοσωμάτων (**Εικόνες 3.9 Γ; 3.13 A, Δ**).

Κύτταρα Li-Fraumeni TetON p21, ON 6 μέρεςΚύτταρα σε φάση γήρανσης

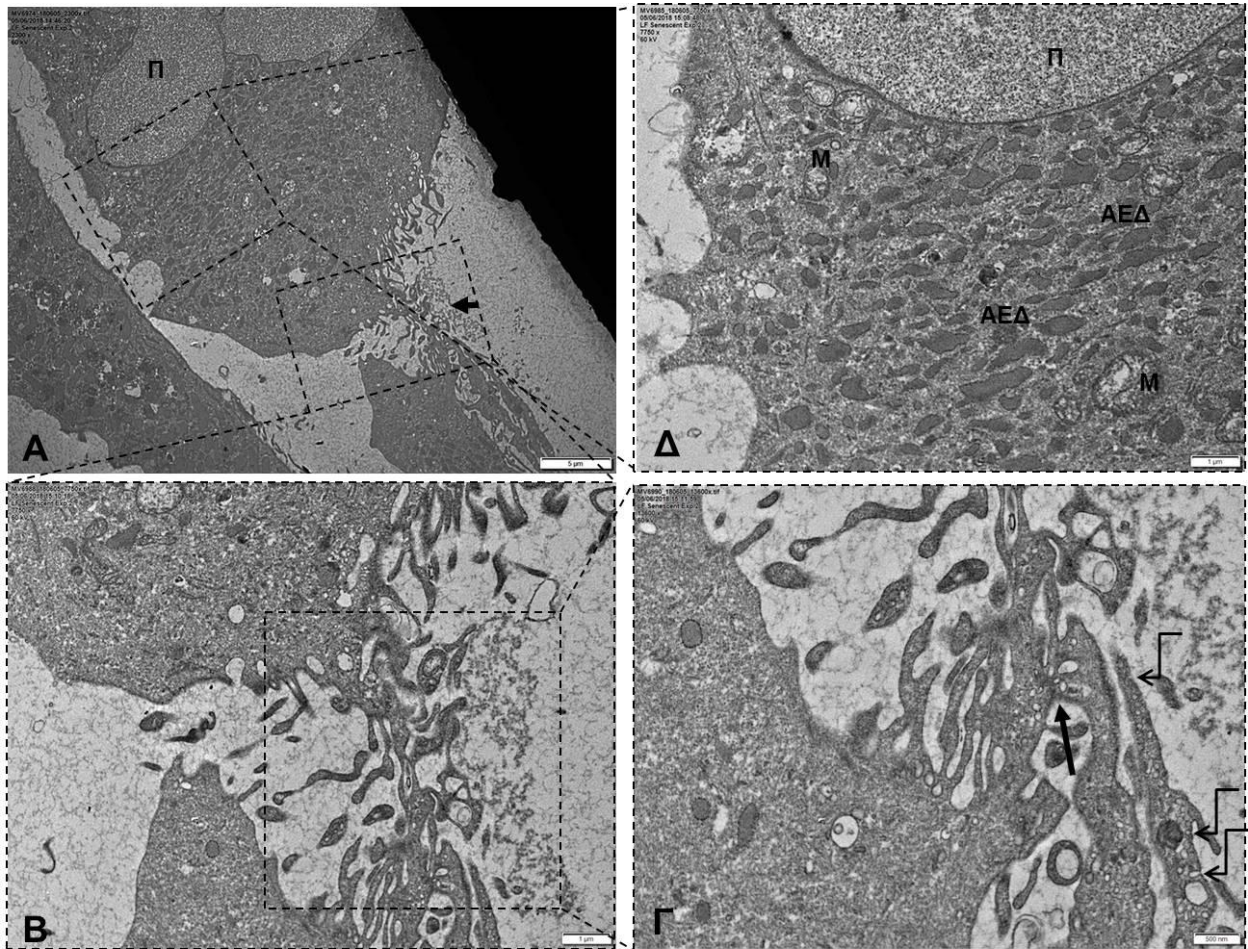
Εικόνα 3.9: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκυκλίνη για 6 ημέρες (κύτταρα ON 6days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Παρατηρούνται τμήματα δύο κυττάρων σε κατάσταση γήρανσης με ιδιαίτερα ευμεγέθεις πυρήνες (Π) και ευδιάκριτους πυρηνίσκους (π). Μάλιστα ο δεξιός πυρήνας είναι πολυλοβωτός με πολυάριθμους πυρηνίσκους. Αρχική μεγέθυνση: x2300.

B: Τμήμα κυτταροπλάσματος κυττάρου ON 6 ημερών, στο οποίο παρουσιάζεται εκτεταμένο και ιδιαίτερα διεσταλμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ). Τα μιτοχόνδρια (Μ) χαρακτηρίζονται από ανώμαλη διάταξη των ακρολοφιών τους. Επίσης υπάρχουν κυστίδια (Κ) ποικίλου μεγέθους, ενώ στην περιφέρεια του κυττάρου παρατηρείται έντονη παρουσία μικρών κυστιδίων (πλαίσιο). Αρχική μεγέθυνση: x13600.

Γ: Φαίνεται τμήμα του πολυλοβωτού πυρήνα (Π) ενός γηρασμένου κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται μιτοχόνδρια (Μ) άτυπης μορφολογίας, καθώς και αρκετά λυσοσώματα (λευκά βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x18000.

Δ: Τμήμα κυττάρου σε φάση γήρανσης. Παρατηρούνται μεγάλα σε μέγεθος μιτοχόνδρια (Μ) που έχουν χάσει πλήρως ή μερικώς τις ακρολοφίες τους. ΑΕΔ: αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ), Π: πυρήνας. Αρχική μεγέθυνση: x10500.



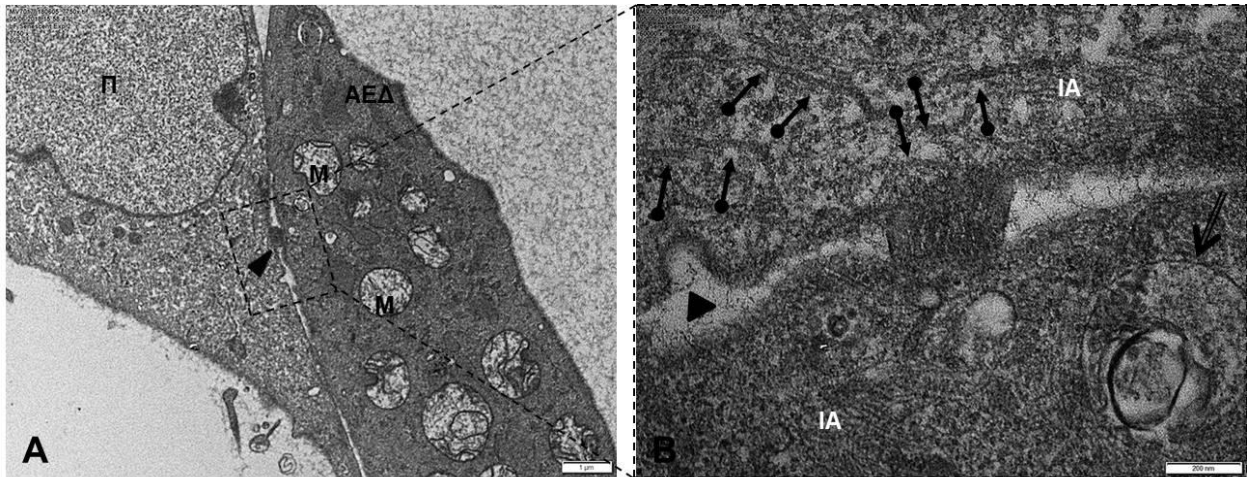
Εικόνα 3.10: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξυκυκλίνη για 6 ημέρες (κύτταρα ON 6days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Ομάδα κυττάρων σε φάση γήρανσης. Ανάμεσα σε δύο από αυτά παρατηρείται ένα δίκτυο από λεπτές, επιμήκεις και διακλαδισμένες κυτταροπλασματικές προσεκβολές (βέλος), μέσω των οποίων επικοινωνούν τα δύο κύτταρα. Π: πυρήνας. Αρχική μεγέθυνση: x2300

B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A), στη θέση όπου εκτείνεται το δίκτυο των κυτταροπλασματικών προσεκβολών και από τα δύο γειτονικά κύτταρα (πλαίσιο). Αρχική μεγέθυνση: x7750.

Γ: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (B) σε διαδοχική θέση του δικτύου των κυτταροπλασματικών προσεκβολών. Διακρίνεται σημείο επαφής μεταξύ δύο προσεκβολών, μέσω του οποίου γίνεται μεταφορά μικρών κυτταροπλασματικών κυστιδίων (βέλος). Στην επιφάνεια επίσης αυτών των προσεκβολών παρατηρούνται θέσεις κυστιδίων ενδοκυττάρωσης (κεκαμένα βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x13600.

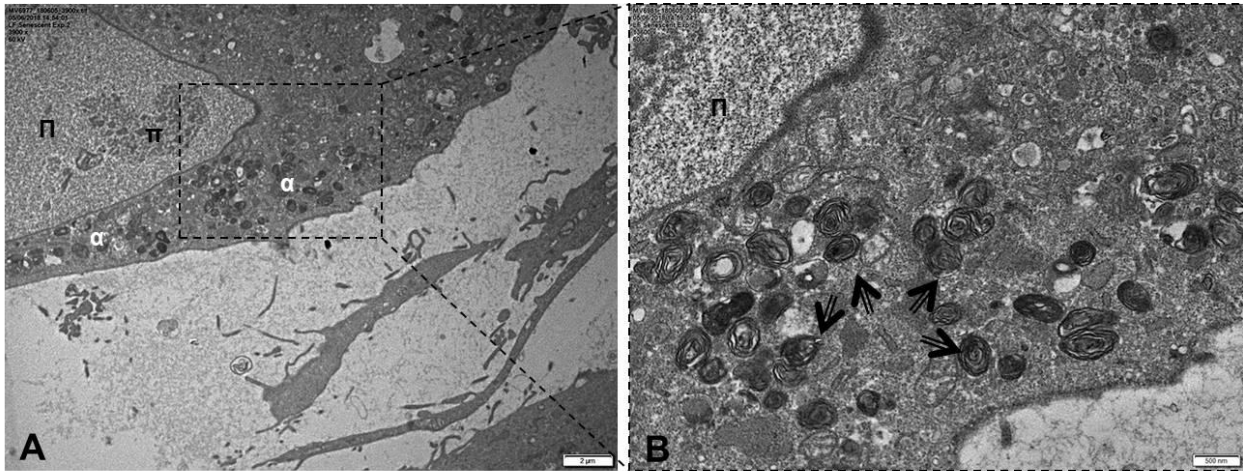
Δ: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A), όπου φαίνεται τμήμα του κυτταροπλάσματος ενός εκ των δύο επικοινωνούντων κυττάρων. Παρατηρείται ιδιαίτερα εκτεταμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ) το οποίο είναι διεσταλμένο. Μ: μιτοχόνδρια, Π: πυρήνας. Αρχική μεγέθυνση: x7750.



Εικόνα 3.11: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκυκλίνη για 6 ημέρες (κύτταρα ON 6days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Δύο κύτταρα σε φάση γήρανσης τα οποία έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και επικοινωνούν μέσω ενός διακυτταρικού σχηματισμού (κεφαλή βέλους). Στο δεξί κύτταρο παρατηρείται μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων που είναι διογκωμένα, με ανώμαλη διάταξη των ακρολοφιών τους ή με απώλεια αυτών. Π: πυρήνας, Μ: μιτοχόνδρια, ΑΕΔ: αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Αρχική μεγέθυνση: x7750.

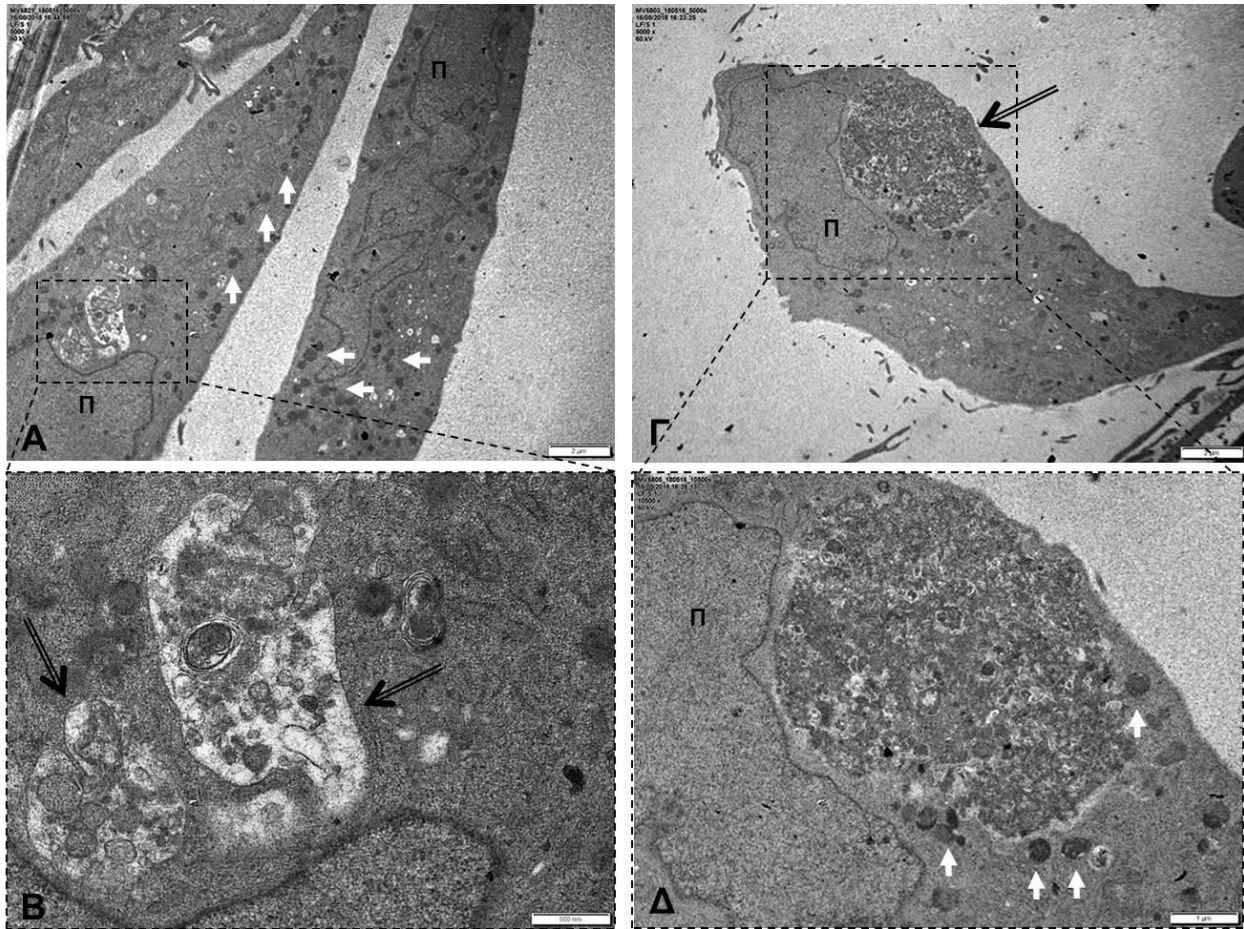
B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A) στη θέση διαμόρφωσης του διακυτταρικού σχηματισμού μέσω του οποίου τα κύτταρα επικοινωνούν. Φαίνεται ότι ο σχηματισμός αυτός αποτελεί κυτταροπλασματικές γέφυρες μεταξύ των δύο κυττάρων και διαμορφώνεται με τη συμμετοχή μικροσωληνίσκων (βέλη), οι οποίοι παρατηρούνται επίσης σε εγγύς περιοχή –στο πάνω κύτταρο- με ακτινωτή σχετικά διάταξη ως προς τον διακυτταρικό σχηματισμό. Επίσης, εμφανή είναι ινίδια ακτίνης (ΙΑ) και στα δύο κύτταρα, ενώ στο κάτω κύτταρο παρατηρείται αυτοφαγόσωμα (βέλος). Αριστερά του διακυτταρικού σχηματισμού, επίσης, διακρίνεται υπό διαμόρφωση ένα επικαλυμμένο κυστίδιο (κεφαλή βέλους). Αρχική μεγέθυνση: x60000.



Εικόνα 3.12: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξυκυκλίνη για 6 ημέρες (κύτταρα ON 6days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Τμήμα κυττάρου σε φάση γήρανσης. Είναι ευδιάκριτο τμήμα του πυρήνα (Π) καθώς και ο πυρηνίσκος (π) ενώ φαίνεται ότι το κυτταρόπλασμα του καλύπτεται σε μια αρκετά μεγάλη έκταση με πολλά και μικρά αυτοφαγοσώματα (α). Αρχική μεγέθυνση: x3900.

B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A), όπου είναι ορατά πολλά και μικρά σε μέγεθος αυτοφαγοσώματα σε πρώιμη φάση ανάπτυξης (βέλη). Π: πυρήνας. Αρχική μεγέθυνση: x13600.



Εικόνα 3.13: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκίνη για 6 ημέρες (κύτταρα ON 6days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Παρουσιάζονται δύο γηρασμένα κύτταρα, στο κυτταρόπλασμα των οποίων παρατηρείται μεγάλος αριθμός λυσοσωμάτων (βέλη). Το δεξί κύτταρο χαρακτηρίζεται από ένα μακρύ και πολυλοβωτό πυρήνα (Π). Αρχική μεγέθυνση: x5000.

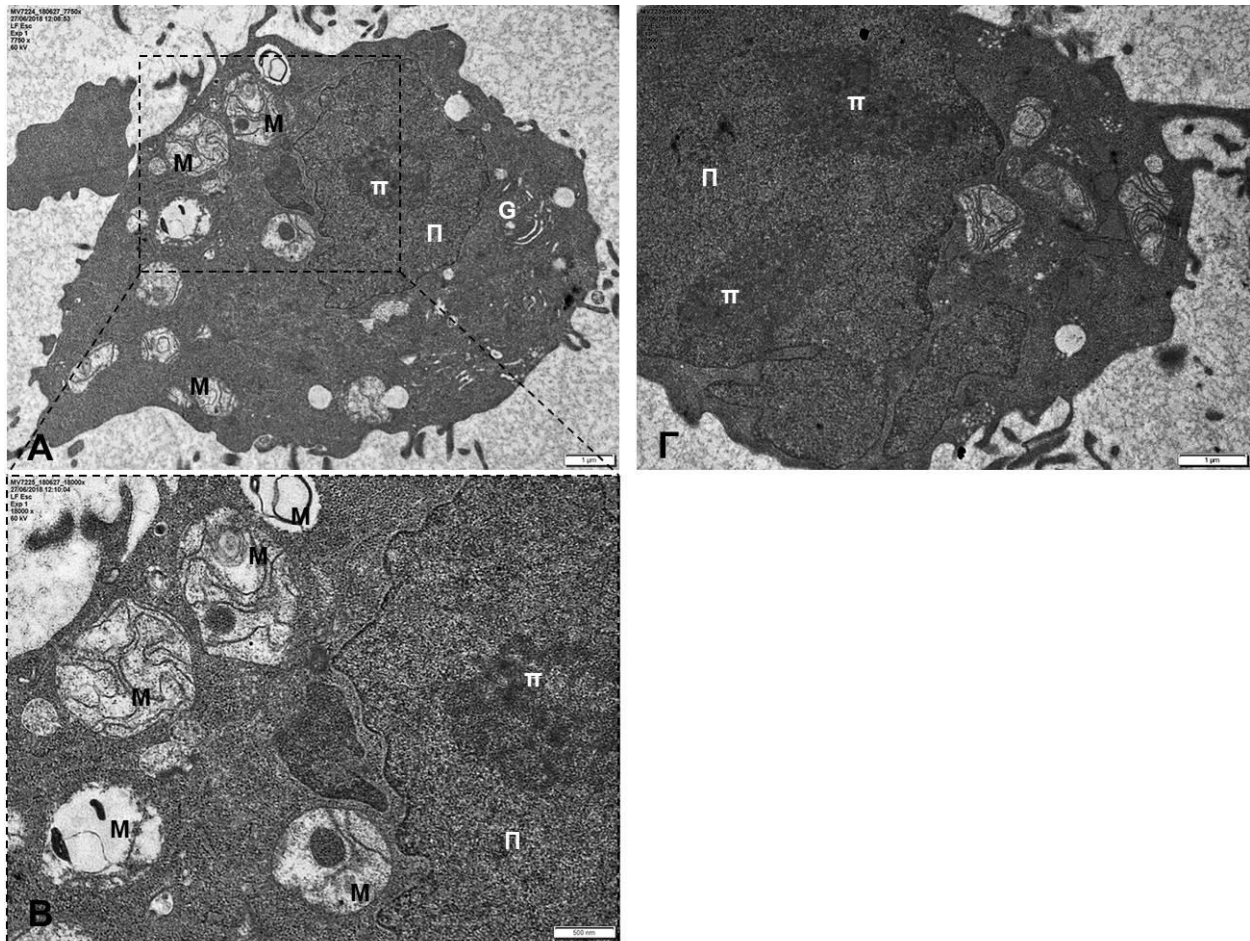
B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση τμήματος του αριστερού κυττάρου της εικόνας (A). Διακρίνονται δύο μεγάλα αυτοφαγώματα (βέλη) τα οποία έχουν εγκλείσει μεταξύ άλλων μιτοχόνδρια. Αρχική μεγέθυνση: x23000.

Γ: Γηρασμένο κύτταρο με εμφανή πυρήνα (Π) ενώ ακριβώς δίπλα του υπάρχει ένα αρκετά μεγάλο σε έκταση αυτοφαγόσωμα (βέλος). Αρχική μεγέθυνση: x5000.

Δ: Μεγαλύτερη μεγέθυνση τμήματος της εικόνας (Γ), όπου διακρίνονται ο πυρήνας και το αυτοφαγόσωμα το οποίο βρίσκεται σε όψιμη φάση. Παρατηρούνται επίσης γύρω από το αυτοφαγόσωμα αρκετά λυσοσώματα (βέλη). Αρχική μεγέθυνση: x10500.

Κύτταρα Li-Fraumeni που έχουν διαφύγει της γήρανσης (escaped)

Τα κύτταρα Li-Fraumeni που επώαστηκαν για 12 μέρες με την Dox (**LFp21 ON 12days, κύτταρα “escaped”**) παρουσιάζουν ποικιλία χαρακτηριστικών όπως π.χ. πολυλοβωτούς πυρήνες (**Εικόνες 3.14 Γ; 3.15 Β**) οι οποίοι ενίοτε παρουσιάζουν οξείες εντομές (**Εικόνα 3.16 Β**) ή συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά νημάτια χρωματίνης σχηματίζοντας πυρηνικές γέφυρες (**Εικόνα 3.15 Γ**). Επίσης τακτικά παρατηρούνται κύτταρα με πολυάριθμους πυρήνες (**Εικόνες 3.15 Δ; 3.18 Α**) καθώς και κύτταρα με μεγάλους και ευδιάκριτους πυρηνίσκους (**Εικόνες 3.14 Α, Β, Γ; 3.15 Β; 3.16 Α**). Το ΑΕΔ παρουσιάζεται διεσταλμένο κατά τόπους αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα γηρασμένα κύτταρα (**Εικόνες 3.15 Α, Β; 3.18 Α**). Τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν αυξημένο όγκο και στα περισσότερα από αυτά οι ακρολοφίες παρουσιάζουν μη φυσιολογική διάταξη. Από την άλλη πλευρά σε κάποια μιτοχόνδρια οι ακρολοφίες είναι μερικώς ή εντελώς απούσες (**Εικόνες 3.14 Α, Β, Γ; 3.15 Α, Β; 3.16 Β; 3.18 Γ**). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η συγκέντρωση των μιτοχονδρίων στην περιφέρεια των κυττάρων από όπου φαίνεται να αποκόβονται κυτταροπλασματικά κυστίδια με εγκλεισμένα μιτοχόνδρια τα οποία έχουν άτυπη μορφολογία και είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα υπόλοιπα (διαδικασία προγραμματισμένου μιτοχονδριακού θανάτου/μιτόπτωση) (**Εικόνα 3.17 Α, Β, Γ**). Τέλος, είναι πιθανόν να επιτελείται και το φαινόμενο της σύντηξης μιτοχονδρίων (fusion), καθώς διακρίνονται κάποια μιτοχόνδρια ποικίλου μεγέθους να πλησιάζουν μεταξύ τους με σκοπό τη συγχώνευσή τους (**Εικόνα 3.18 Α, Β**).

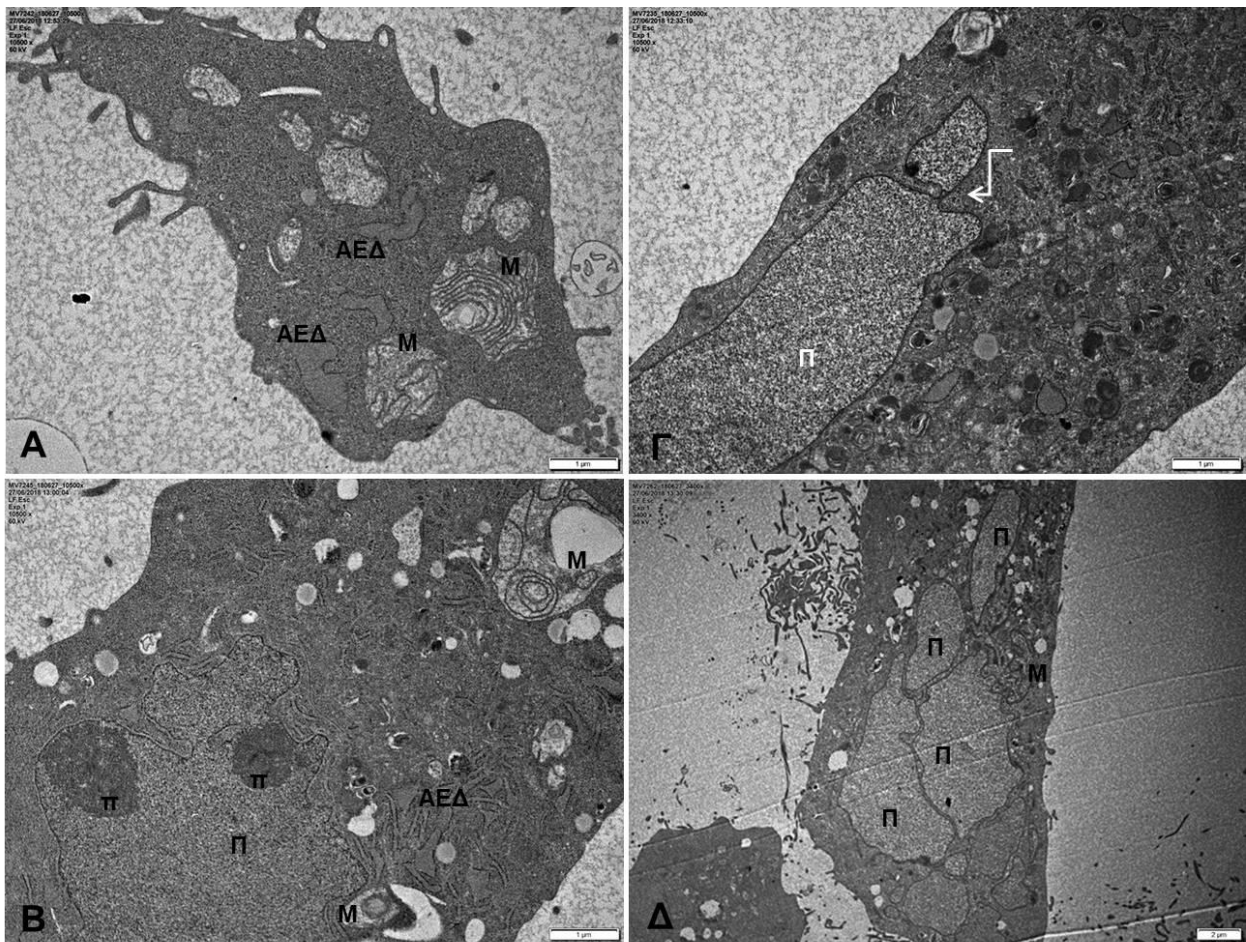
Κύτταρα Li-Fraumeni TetON p21, ON 12 μέρεςΚύτταρα που έχουν διαφύγει της γήρανσης (escaped)

Εικόνα 3.14: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκλίνη για 12 ημέρες (κύτταρα ON 12days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Κύτταρο που έχει διαφύγει της γήρανσης (escaped). Έχει υποστρόγγυλο σχήμα με εμφανή πυρήνα (Π) και πυρηνίσκο (π). Παρατηρούνται αρκετά μιτοχόνδρια (M) ενώ στην περιφέρειά του φέρει λεπτές και επιμήκης προσεκβολές που ομοιάζουν με μικρολάχνες. G: συσκευή Golgi. Αρχική μεγέθυνση x7750.

B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνα (A). Η πλειοψηφία των μιτοχονδρίων παρουσιάζει αυξημένο μέγεθος με αποδιοργανωμένες ή εντελώς απούσες τις ακρολοφίες τους. Στο εσωτερικό μερικών μιτοχονδρίων παρατηρείται μία ηλεκτρονιόπυκνη υποστρόγγυλη δομή. Π: πυρήνα, π: πυρηνίσκος. Αρχική μεγέθυνση: x18000.

Γ: Επίσης ένα διαφυγόντα κύτταρο (escaped) με πολυλοβωτό ευμεγέθη πυρήνα (Π) και δύο έκκεντρους πυρηνίσκους (π). Τα μιτοχόνδριά του φαίνονται επίσης διογκωμένα με μερική απώλεια των ακρολοφιών τους. Οι εναπομείνουσες ακρολοφίες είναι επιμηκυμένες με παράλληλη ή συγκεντρική διάταξη. Αρχική μεγέθυνση x10500.



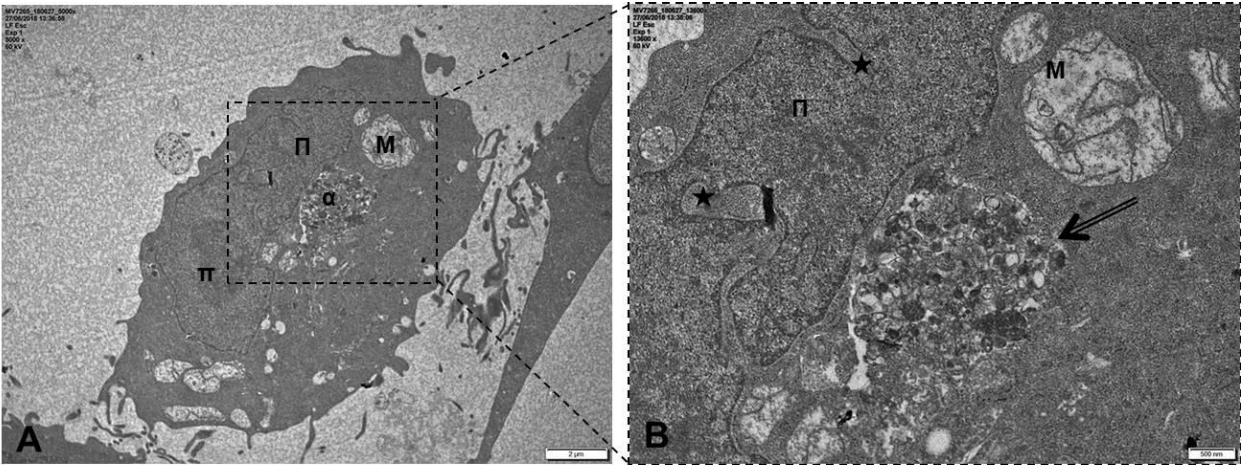
Εικόνα 3.15: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκυκλίνη για 12 ημέρες (κύτταρα ON 12days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Κύτταρο "escaped" με διογκωμένα και άτυπης μορφολογίας μιτοχόνδρια (M). Ορισμένα μιτοχόνδρια έχουν σχεδόν πλήρη απώλεια των ακρολοφιών τους, ενώ σε άλλα οι ακρολοφίες διατάσσονται πυκνά και συγκεντρικά ή αναδιπλώνονται με άτυπη διάταξη. Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ) είναι ιδιαίτερα διεσταλμένο, χωρίς να καταλαμβάνει μεγάλη έκταση του κυτταροπλάσματος, όπως στα κύτταρα σε κατάσταση γήρανσης. Αρχική μεγέθυνση: x10500.

B: Κύτταρο "escaped", το οποίο φέρει ένα εμφανή πολυλοβωτό πυρήνα (Π) με δύο πυρηνίσκους (π), ΑΕΔ που είναι κατά τόπους διεσταλμένο και μιτοχόνδρια (M) με μη φυσιολογικό φαινότυπο. Αρχική μεγέθυνση: x10500.

Γ: Πολυλοβωτός πυρήνας όπου τα δύο του τμήματα συνδέονται με λεπτά νημάτια χρωματίνης (πυρηνικές γέφυρες) (κεκαμένο βέλος). Αρχική μεγέθυνση: x10500.

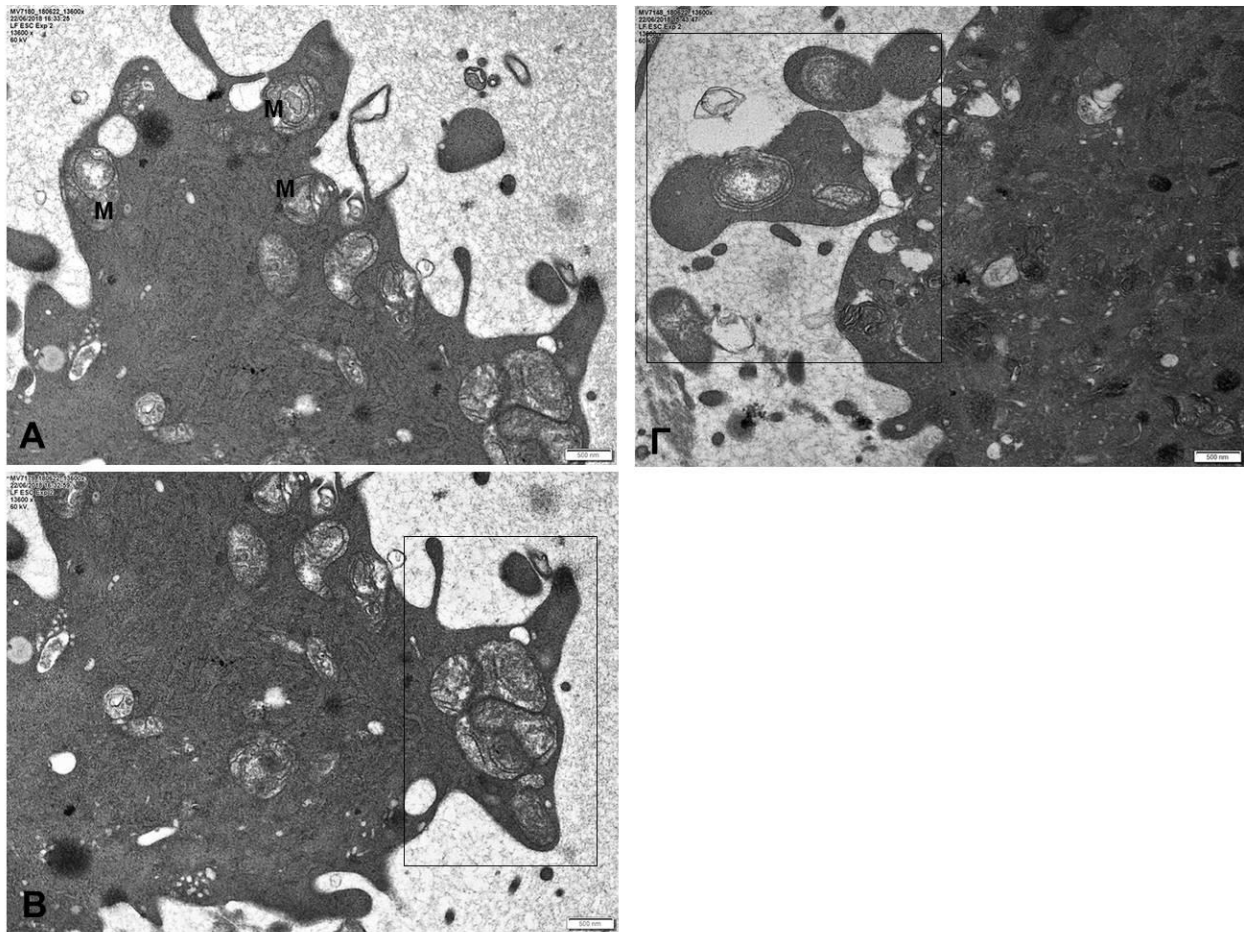
Δ: Ένα χαρακτηριστικό πολυπύρηνο κύτταρο "escaped". Παρατηρείται επίσης η παρουσία πολλών κυτταροπλασματικών κυστιδίων. Π: πυρήνας, M: μιτοχόνδριο. Αρχική μεγέθυνση: x3400.



Εικόνα 3.16: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξυκυκλίνη για 12 ημέρες (κύτταρα ON 12days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Υποστρόγγυλο κύτταρο “escaped” με πολυλοβωτό πυρήνα (Π) και εμφανή πυρηνίσκο (π). Παρατηρούνται επίσης μιτοχόνδρια (Μ) με μη φυσιολογική μορφολογία και ένα μεγάλο αυτοφαγόσωμα (α). Αρχική μεγέθυνση: x5000.

B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A). Εμφανίζεται τμήμα του πυρήνα (Π) με έντονες εντομές (αστερίσκοι), ενώ στα δεξιά του πυρήνα υπάρχει ένα αυτοφαγόσωμα (βέλος) σε όψιμη φάση το οποίο έχει εγκλείσει διάφορα οργανίδια. Παρατηρείται επίσης μεγάλο μιτοχόνδριο (Μ) με ανώμαλη διάταξη ακρολοφιών. Αρχική μεγέθυνση: x13600.

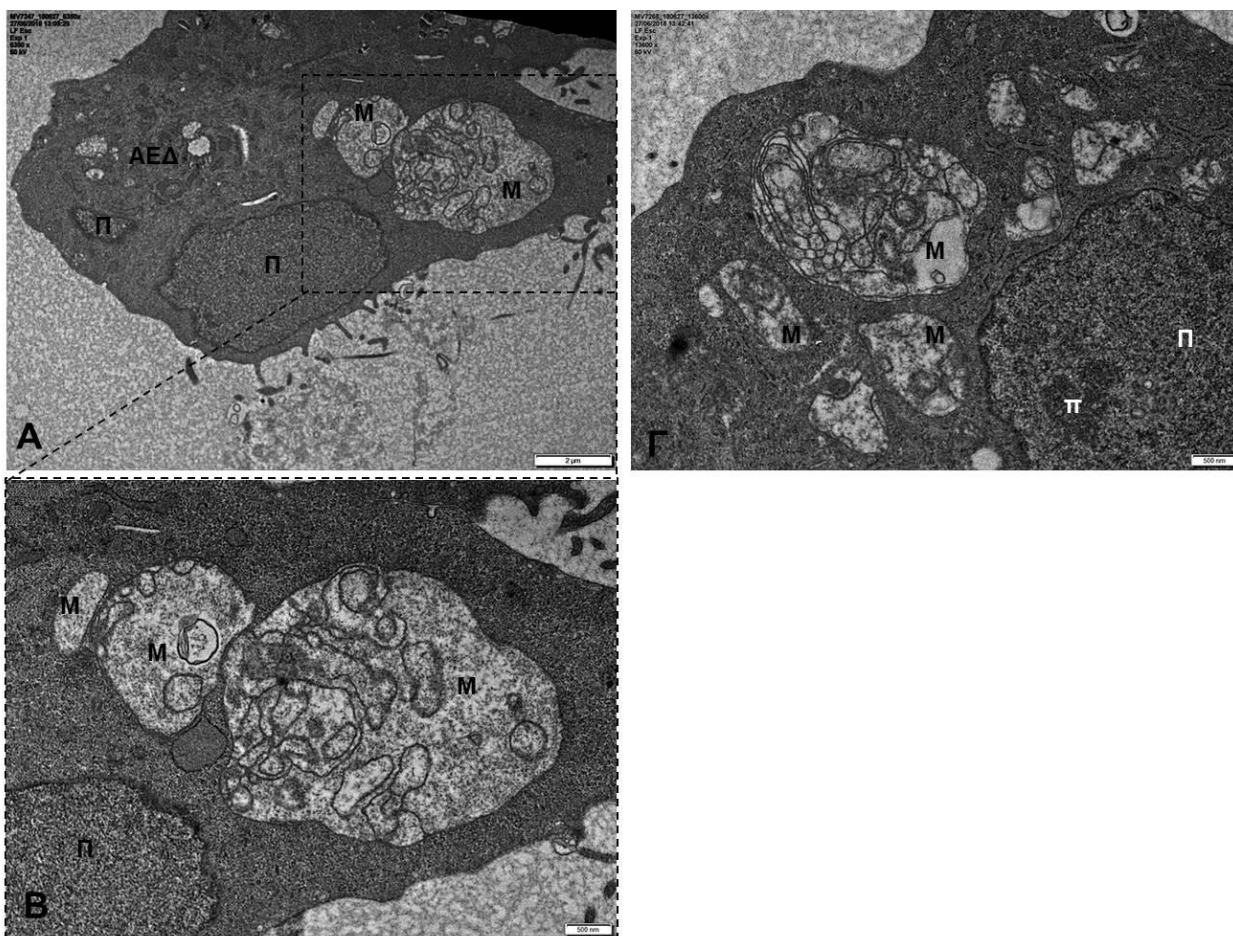


Εικόνα 3.17: Ηλεκτρονιογραφίες κυτάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκυκλίνη για 12 ημέρες (κύτταρα ON 12days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Παρατηρούνται αρκετά μιτοχόνδρια (M) με ανώμαλη διάταξη των ακρολοφιών τους και σε μεγάλο βαθμό απώλειά τους τα οποία έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στην περιφέρεια κυττάρου “escaped”. Αρχική μεγέθυνση: x13600.

B: Τμήμα κυτταροπλάσματος κυττάρου “escaped” όπου διακρίνεται κυτταρική προσεκβολή (πλαίσιο) στην οποία έχουν συσσωρευθεί διογκωμένα μιτοχόνδρια και με σημαντική απώλεια των ακρολοφιών τους, υποδεικνύοντας πιθανώς έναν κυτταρικό μηχανισμό απομόνωσης ή/και απαλλαγής από παθολογικά μιτοχόνδρια όπως φαίνεται στην εικόνα (Γ). Αρχική μεγέθυνση: x13600.

Γ: Μέρος κυτταροπλάσματος κυττάρου “escaped” όπου στην περιφέρεια του απεικονίζονται τμήματα κυτταρικών προσεκβολών (πλαίσιο) -πιθανώς αποκομμένων από το κύτταρο- τα οποία φέρουν παθολογικά μιτοχόνδρια με σημαντική απώλεια των ακρολοφιών τους και άτυπη διάταξη αυτών που έχουν απομείνει. Αρχική μεγέθυνση: x13600.



Εικόνα 3.18: Ηλεκτρονιογραφίες κυττάρων της σειράς Li-Fraumeni-TetON p21 μετά από επώαση με δοξουκυκλίνη για 12 ημέρες (κύτταρα ON 12days). Χρώση: Οξικό ουρανύλιο/Κιτρικός μόλυβδος.

A: Κύτταρο “escaped”, όπου φαίνεται ο πυρήνας (Π) μαζί με ένα αποκομμένο τμήμα αυτού στα αριστερά του. Επίσης είναι ορατά δύο διογκωμένα, αρκετά ευμεγέθη μιτοχόνδρια (M) με μη φυσιολογική διάταξη των ακρολοφιών τους. ΑΕΔ: αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Αρχική μεγέθυνση: x6350.

B: Μεγαλύτερη μεγέθυνση της εικόνας (A). Διακρίνονται τρία μιτοχόνδρια (M) διαφορετικού μεγέθους τα οποία πιθανόν να έρχονται σε επαφή προκειμένου να συγχωνευθούν σε ένα ενιαίο μιτοχόνδριο. Οι ακρολοφίες στα δύο πιο μεγάλα μιτοχόνδρια σχηματίζουν υποστρόγγυλες δομές στο εσωτερικό τους χώρο, ενώ το τρίτο μικρότερο μιτοχόνδριο φαίνεται να τις έχει απωλέσει. Π: τμήμα του πυρήνα. Αρχική μεγέθυνση: x13600.

Γ: Τμήμα ενός άλλου κυττάρου “escaped”, όπου απεικονίζονται διαφορετικού μεγέθους – κάποια μεγάλα- και ανώμαλης μορφολογίας μιτοχόνδρια. Σε κάποια οι ακρολοφίες διατάσσονται πυκνά, με έντονες αναδιπλώσεις, ενώ σε κάποια άλλα λείπουν εντελώς. Πιο σπάνια παρατηρείται μια ηλεκτρονιοπυκνή κυκλική δομή στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Π: πυρήνας, π: πυρηνίσκος. Αρχική μεγέθυνση: x13600.

Κεφάλαιο 4^ο

Συζήτηση-Συμπεράσματα

4



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γονιδιωματική αστάθεια αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα τα οποία δεν μπορούν να διατηρήσουν τη σταθερότητα του γονιδιώματός τους μέσω μιας συνεχούς διεργασίας Δαρβίνειας επιλογής, είτε απορρίπτονται από τον οργανισμό είτε αναπτύσσουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τους δίνουν ένα παραπάνω προβάδισμα έναντι των υπολοίπων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γενετικών διαταραχών όπως ο καρκίνος.

Με βάση ήδη υπάρχοντα δεδομένα από το εργαστήριό μας, η παρατεταμένη έκφραση της πρωτεΐνης p21 σε προ-καρκινικά και καρκινικά κύτταρα, υπό συνθήκες απουσίας του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53, δύναται να οδηγήσει, μέσω μιας συνεχούς διαδικασίας κυτταρικής επιλογής, στη δημιουργία πιο επιθετικών και ανθεκτικών σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες απογόνων (κύτταρα “escaped”). Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p21 συνοδευόμενη από την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53, ενισχύει τη γονιδιωματική αστάθεια, μέσω της σταθεροποίησης των παραγόντων αδειοδότησης της αντιγραφής, **Cdt1** και **Cdc6**. Η αυξημένη έκφραση των συγκεκριμένων παραγόντων οφείλεται στη μειωμένη έκφραση της εξαρτώμενης από το **PCNA** E3 λιγάσης **CRL4-Cdt2** και επομένως στη μειωμένη αποικοδόμησή της μέσω πρωτεασώματος. Ως εκ τούτου τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα επανα-αντιγραφής, που αποτελεί μια μορφή αντιγραφικής πίεσης (Galanos, Vougas et al. 2016). Επιπλέον, τόσο η παρουσία αντιγραφικής πίεσης όσο και η ελαττωμένη δράση μηχανισμών επιδιόρθωσης που σχετίζονται με νουκλεοτιδικές μεταλλαγές όπως οι **NER** (Nucleotide Excision Repair) και **TLS** (Translesion Synthesis) σε συνδυασμό με την εκτεταμένη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης **MUS81-EME1**, συνηγορούν στην παρουσία δικλωνικών θραύσεων στο γενετικό υλικό οι οποίες επανατροφοδοτούνται και από το αυξανόμενο φορτίο ROS στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το p21 (Galanos, Vougas et al. 2016).

Η παρουσία γενωμικής αστάθειας στα κύτταρα “escaped” ενισχύεται και από το γεγονός ότι οι δημιουργούμενες δικλωνικές θραύσεις τείνουν να επιδιορθωθούν από μηχανισμούς όπως η αντιγραφή επαγόμενη από ρήξη (**BIR, Break-Induced Replication**) και η επιδιόρθωση υβριδοποίησης μονοκλωνικών αλυσίδων (**SSA, Single**

Strand Annealing) που στηρίζεται στην παρουσία μικρο-ομοιοτήτων. Επομένως, τα κύτταρα έπειτα από την υπερέκφραση της p21 απουσία της p53, ακολουθούν ένα **RAD52**-εξαρτώμενο, επιρρεπές σε λάθη, επιδιορθωτικό μονοπάτι για την απομάκρυνση των εκτεταμένων βλαβών του DNA (Galanos, Pappas et al. 2018).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της παρατεταμένης έκφρασης της πρωτεΐνης p21 ως προς το φαινότυπο των κυττάρων MDAH041 (ινοβλάστες από δέρμα ασθενούς με το σύνδρομο Li-Fraumeni). Στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου TP53 λείπει τελείως ενώ το άλλο φέρει μια μετάλλαξη στο κωδικόνιο 184 που τροποποιεί το πλαίσιο ανάγνωσης με αποτέλεσμα να προκύπτει μια κολοβωμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 με τελείως διαφορετική στερεοδιάταξη (Liu, Kraus et al. 1996, Agarwal, Agarwal et al. 1998). Το επαγώγιμο κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Li-Fraumeni-TetON p21 στο οποίο η μεταγραφή ενεργοποιείται αντιστρεπτά παρουσία του αντιβιοτικού Dox.

Τα ευρήματα στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αποκωδικοποιούν υπάρχουσες αλλαγές που συμβαίνουν σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο ως προς τη δομή και τη μορφολογία της παραπάνω ινοβλαστικής σειράς Li-Fraumeni υπό την παρατεταμένη υπερέκφραση της p21 στα χρονικά διαστήματα των 0, 6 και 12 ημερών και ανεξάρτητα από τον παράγοντα p53.

Καταρχήν ελέγχθηκε η πιστότητα του επαγώγιμου συστήματος TetON p21 μέσω σύγκρισης της έκφρασης της p21 στις τρεις διαφορετικές συνθήκες με την τεχνική του ανοσοφθορισμού. Πράγματι βρέθηκε αυξημένη η έκφραση της τόσο μετά από 6 όσο και μετά από 12 ημέρες ενεργοποίησης του συστήματος με Dox σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε προστεθεί το αντιβιοτικό (Ενότητα 3.1). Στη συνέχεια έγινε παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης ενώ αυτά βρίσκονταν ακόμα σε καλλιέργεια προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν αλλαγές μετά την προσθήκη της Dox. Τα LFr21 OFF παρουσιάζονται κυρίως ατρακτοειδή, κάποια από αυτά με επίμηκες και κάποια με πιο πεπλατυσμένο σχήμα ενώ ελάχιστα είναι εκείνα με μεγαλύτερο μέγεθος και ευμεγέθεις πυρήνες. Φαίνεται επίσης να σχηματίζουν πολλές κυτταροπλασματικές προσεκβολές προκειμένου μάλλον να επικοινωνούν μεταξύ τους.

Αντίθετα, τα LFr21 ON 6days παρουσιάζουν έναν γηρασμένο φαινότυπο, διότι είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος, έχουν διακριτούς ευμεγέθεις-υποστρόγγυλους πυρήνες και το κυτταρόπλασμά τους είναι κοκκιώδες. Λιγότερο συχνά είναι τα κύτταρα με πολυάριθμους πυρήνες ενώ και σε αυτή τη φάση αναπτύσσουν προσεκβολές που εκτείνονται σε γειτονικά κύτταρα (Ενότητα 3.2). Ο φαινότυπος της γήρανσης επιβεβαιώθηκε και μέσω της ιστοχημικής χρώσης με τη χημική ένωση GL13 για τον εντοπισμό της λιποφουσκίνης (Ενότητα 3.3). Η πρόκληση γήρανσης μετά από υπερέκφραση της πρωτεΐνης p21 έχει δειχθεί στο παρελθόν και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης EJ τα οποία στερούνται της λειτουργίας του p53. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το επαγωγίμο σύστημα TetOFF p21 όπου για την έκφραση της p21 απαιτείται η αφαίρεση της Dox από το καλλιεργητικό υλικό (Fang, Lee et al. 1999). Μετά από 12 ημέρες ωστόσο παρατεταμένης έκφρασης της p21, εμφανίζονται στην καλλιέργεια κύτταρα τα οποία φαίνεται να έχουν διαφύγει του μηχανισμού της γήρανσης (κύτταρα “escaped”) και τα οποία αναπτύσσονται ανάμεσα σε γηρασμένα κύτταρα. Η μορφολογία τους είναι εντελώς διαφορετική σε σχέση με τα LFr21 ON 6days, καθώς είναι μικρότερα σε μέγεθος, έχουν ατρακτοειδές σχήμα, ευμεγέθη κυτταρικό σώμα, εμφανείς πυρήνες και πολυάριθμους πυρηνίσκους. Συνδέονται στενά μεταξύ τους με λεπτές κυτταροπλασματικές προσεκβολές σχηματίζοντας ένα κυτταρικό δίκτυο το οποίο εκτείνεται μεταξύ των γηρασμένων κυττάρων. Επίσης σε θέσεις όπου κύτταρα “escaped” βρίσκονται εγγύς γηρασμένων κυττάρων, παρατηρείται ύπαρξη επικοινωνίας μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων με τον ίδιο ακριβώς τρόπο (Ενότητα 3.2).

Εκτός από τη μορφολογική παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης προκειμένου να ελεγχθούν τα Li-Fraumeni σε υποκυτταρικό επίπεδο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μιτοχόνδρια και στις 3 επαγωγικές φάσεις. Ως γνωστόν τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα “εργοστάσια” παραγωγής ενέργειας του κυττάρου σε μορφή ATP και είναι αποδέκτες πολλών εξωγενών και ενδογενών στρεσογόνων σημάτων με αποτέλεσμα να προσαρμόζουν με δυναμικό τρόπο τη μορφολογία των ακρολοφιών τους προς χάριν της σωστής τους λειτουργίας (Mannella 2008). Ωστόσο αναδιοργάνωση στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων συμβαίνει και κατά τη διαδικασία της απόπτωσης όπου οι συνδέσεις

των ακρολοφιών χαλαρώνουν προκειμένου να διευκολυνθεί η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Scorrano, Ashiya et al. 2002, Pernas and Scorrano 2016). Για να συμβούν όμως με βάση τη βιβλιογραφία οι μιτοχονδριακές αναδιαμορφώσεις θα πρέπει να έχει προηγηθεί ένα γεγονός που τείνει να επηρεάσει την κυτταρική λειτουργία. Για το λόγο αυτό προκαλεί ιδιαίτερη εντύπωση το γεγονός ότι τα κύτταρα OFF εμφανίζουν ως επί τω πλείστο άτυπης μορφολογίας μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα φαίνεται να έχουν χαλαρώσει εντελώς οι σύνδεσμοι που συγκρατούν τις ακρολοφίες και συμβάλλουν στο σωληνοειδές σχήμα τους με αποτέλεσμα σε πολλά μιτοχόνδρια αυτές να διασχίζουν διαμετρικά το μιτοχονδριακό αυλό αυξάνοντας έτσι την επιφάνειά τους (Ενότητα 3.4). Το εν λόγω εύρημα θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι η κυτταρική σειρά Li-Fraumeni/MDAH041 κατά τη φάση καθιέρωσή της *in vitro*, έχει επέλθει σε παρατεταμένη κατάσταση ελαττωμένης ανάπτυξης και αντιγραφικής γήρανσης μετά από περίπου 35 διαιρέσεις. Στο διάστημα αυτό τα κύτταρα παρουσίασαν μορφολογικές αλλαγές, υπέστησαν χρωμοσωμικές βλάβες συμπεριλαμβανομένων της ανευπλοειδίας και του μειωμένου μήκους των τελομερών, ενώ στην πορεία διέφυγαν της γήρανσης επανακτώντας την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται (Bischoff, Yim et al. 1990, Pantziarka 2013). Από τους κλώνους αυτούς προέκυψαν τα αθανατοποιημένα κύτταρα Li-Fraumeni που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι τα MDAH041 παρ' ότι έχουν αποκτήσει καρκινικά-τύπου χαρακτηριστικά (αθανατοποιημένα) δεν ανέπτυξαν καρκίνο μετά από εισαγωγή τους σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (Bischoff, Yim et al. 1990, Pantziarka 2013). Τα παραπάνω στοιχεία σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν υφίσταται λειτουργικό μόριο p53 (p53^{mut/-}) το οποίο ελέγχει κατά κόρον τη λειτουργία των μιτοχονδρίων αλλά και το μεταβολισμό των κυττάρων, συνηγορούν στην υπόθεση ότι πιθανόν στα κύτταρα αυτά να μεταβάλλεται ο μεταβολικός τους ρυθμός πριν από την ενεργοποίηση της p21, η αναπνευστική αλυσίδα να δυσλειτουργεί, να υπάρχει αυξημένο οξειδωτικό stress σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη φυσιολογική κυτταρική σειρά και τα μιτοχόνδρια στην προσπάθειά τους να ανταπεξέλθουν στα υψηλά επίπεδα των ROS να αναπροσαρμόζονται ως προς τη μορφολογία και επομένως τη λειτουργία τους (Mannella 2008, Wallace 2012, Boland, Chourasia et al. 2013, Napoli and Flores 2017).

Τα Li-Fraumeni μετά από 6 ημέρες παρατεταμένης υπερ-έκφρασης της p21 παρουσιάζουν σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την γήρανση, όπως μεγαλύτερους και πολυλοβωτούς πυρήνες, μιτοχόνδρια διογκωμένα και με περισσότερο ελαττωματικές ακρολοφίες, διεσταλμένο ενδοπλασματικό δίκτυο, αυξημένη αυτοφαγία καθώς και αυξημένο αριθμό λυσοσωμάτων (Hwang, Yoon et al. 2009, Augert and Bernar 2013, Kang and Elledge 2016). Υπαρκτός είναι επίσης και ο φαινότυπος SASP καθώς είναι ορατά πολλά μικροκυστίδια τα οποία συσσωρεύονται στην περιφέρεια των κυττάρων προς έκκριση, ενώ χαρακτηριστική είναι και η ανταλλαγή τέτοιων μικροκυστιδίων μέσω λεπτών κυτταροπλασματικών προσεκβολών γειτονικών γηρασμένων κυττάρων (Effenberger, von der Heyde et al. 2014, Watanabe, Kawamoto et al. 2017). Ένας ακόμη τρόπος επικοινωνίας που παρατηρήθηκε στα γηρασμένα κύτταρα είναι μέσω κυτταροπλασματικών γεφυρών, στο σχηματισμό των οποίων φαίνεται ότι μετέχουν μικροσωληνίσκοι. Οι μικροσωληνίσκοι είναι κυτταροσκελετικά οργανίδια τα οποία έχουν συνδεθεί με το σχηματισμό δικτύων επικοινωνίας σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο (Valente, Rossi et al. 2015).

Προηγούμενα πειράματα στα Li-Fraumeni/MDAH041 κατέδειξαν αυξημένα επίπεδα ROS μετά από παρατεταμένη έκφραση του p21 για 72h (γηρασμένα κύτταρα) σε σχέση με τα κύτταρα OFF, αυξημένη γενωμική αστάθεια στα κύτταρα “escaped” λόγω των εκτεταμένων δικλωνικών θραύσεων, ενώ αυτά έχουν αποκτήσει και έναν πιο επιθετικό φαινότυπο καθώς και ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Galanos, Vougas et al. 2016, Galanos, Pappas et al. 2018). Αποτελέσματα από την υπερμικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων Li-Fraumeni ON 12days συμβαδίζουν σε μεγάλο βαθμό με τα προαναφερθέντα ευρήματα. Αρχικά τα κύτταρα αυτά φαίνεται να αποκτούν ένα περισσότερο υποστρόγγυλο σχήμα και να είναι πιο μικρά σε μέγεθος σε σχέση με τα Li-Fraumeni ON 6days κάτι που θα μπορούσε να συμβαδίζει με την επιθετικότητα και μεταστατική ικανότητα που έχουν αποκτήσει τα κύτταρα “escaped” (Lyons, Alizadeh et al. 2016). Επίσης, τα μιτοχόνδρια δείχνουν να υποφέρουν ακόμη περισσότερο σε σχέση με τη φάση της γήρανσης διότι είναι περισσότερο διογκωμένα, ένδειξη ανισορροπίας στη συγκέντρωση μεταβολιτών λόγω αυξημένων ROS από τη φάση της γήρανσης με αποτέλεσμα το άνοιγμα των μιτοχονδριακών πόρων (Peng and

του 2004). Στη διόγκωση επίσης των μιτοχονδρίων θα μπορούσε δυνητικά να συμβάλλει και η αυξημένη σύντηξη μεταξύ τους διότι υπάρχουν μιτοχόνδρια άτυπης μορφολογίας το ένα πολύ κοντά στο άλλο έτοιμα να συγχωνευθούν. Η σύντηξη είναι ένας μηχανισμός που συνδέεται άμεσα με την πλαστικότητα που διακρίνει τα μιτοχόνδρια και προκαλείται μετά από stress λειτουργώντας προστατευτικά για τα ίδια τα μιτοχόνδρια και συνάμα για το κύτταρο καθώς οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ATP, πιο αποδοτική οξειδωτική φωσφορυλίωση ενώ καταστέλλει τη μιτοφαγία και την απόπτωση (Boland, Chourasia et al. 2013, Cogliati, Enriquez et al. 2016, Pernas and Scorrano 2016). Παρατηρείται τέλος και το φαινόμενο συσσώρευσης των μιτοχονδρίων στην περιφέρεια των κυττάρων και η εγκόλπωση τους σε κυτταροπλασματικά κυστίδια τα οποία φαίνεται ότι πιθανόν αποκόβονται από το κυτταρικό σώμα. Ενδεχομένως η όλη διαδικασία αφορά αυτό που τελευταία αποκαλείται **μιτόπτωση** και η οποία αφορά την απαλλαγή των κυττάρων από τα μη φυσιολογικής μορφολογίας και λειτουργίας μιτοχόνδρια μέσω ενός προγραμματισμένου μιτοχονδριακού θανάτου (Tinari, Garofalo et al. 2007, Mijaljica, Prescott et al. 2010, Jangamreddy and Los 2012).

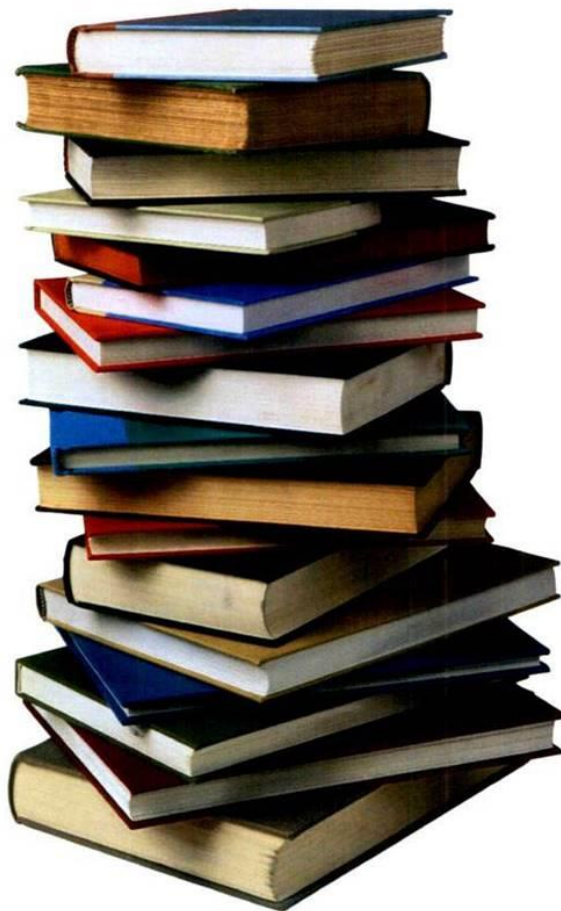
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ένα φυσιολογικό κύτταρο υπό την επίδραση ενός στρεσογόνου ερεθίσματος προσπαθεί να προσαρμοστεί μέσω κυρίως μορφολογικών αλλαγών όπως π.χ. η υπερτροφία. Σε περίπτωση που το ερέθισμα είναι ιδιαίτερα βλαπτικό ως προς το κύτταρο ή εάν εκείνο δεν μπορέσει να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες τότε υπόκειται σε βλάβες οι οποίες εν μέρει μπορεί να είναι αντιστρεπτές μέσω ενεργοποίησης διαφόρων επιδιορθωτικών μηχανισμών. Σε περίπτωση που οι βλάβες συσσωρεύονται ή είναι εκτεταμένες σε βαθμό που δεν μπορούν να διορθωθούν τότε το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο, νέκρωση ή απόπτωση ανάλογα με το ερέθισμα που τον προκάλεσε. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι αλλαγές στη δομή και τη μορφολογία των κυττάρων αντικατοπτρίζουν και αλλαγές στη λειτουργία και τις ιδιότητες του κυττάρου (Kumar, Abbas et al. 2012).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι φυσιολογικά αλλά αθανατοποιημένα ενώ η παρατεταμένη εξωγενής επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 αποτελεί το ερέθισμα. Τη δεδομένη στιγμή το p21 παρουσιάζει έναν διπλό ρόλο καθώς αρχικά (στις 6 ημέρες) λειτουργεί ως ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο διότι προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται σε μια επαγόμενη από ογκογονίδιο φάση γήρανσης, όμως στις 12 ημέρες υπερέκφρασής του αναδύονται κυτταρικοί κλώνοι οι οποίοι έχουν διαφύγει της γήρανσης, παρουσιάζουν εκτεταμένη γενωμική αστάθεια και αποκτούν πιο επιθετικά καρκινικά χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία (Galanos, Vougas et al. 2016, Galanos, Pappas et al. 2018). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μια υπερμικροσκοπική σκοπιά, καθώς οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν ως προς τα υποκυτταρικά οργάνδια των Li-Fraumeni διαφέρουν ανάλογα με την εκάστοτε φάση έκφρασης της p21 και πιθανόν αντικατοπτρίζουν αλλαγές στις λειτουργικές ιδιότητες των κυττάρων ανάλογα με το μικροπεριβάλλον τους κάτι όμως το οποίο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Κεφάλαιο 5^ο

Βιβλιογραφία



Abbadie, C., O. Pluquet and A. Pourtier (2017). "Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses?" Cell Mol Life Sci **74**(24): 4471-4509.

Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." Nat Rev Cancer **9**(6): 400-414.

Acosta, J. C., A. Banito, T. Wuestefeld, A. Georgilis, P. Janich, J. P. Morton, D. Athineos, T. W. Kang, F. Lasitschka, M. Andrulis, G. Pascual, K. J. Morris, S. Khan, H. Jin, G. Dharmalingam, A. P. Snijders, T. Carroll, D. Capper, C. Pritchard, G. J. Inman, T. Longerich, O. J. Sansom, S. A. Benitah, L. Zender and J. Gil (2013). "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence." Nat Cell Biol **15**(8): 978-990.

Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor, O. Chernova, Y. Sharma and G. R. Stark (1998). "A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14775-14780.

Agherbi, H., A. Gaussmann-Wenger, C. Verthuy, L. Chasson, M. Serrano and M. Djabali (2009). "Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the INK4a/ARF locus during senescence." PLoS One **4**(5): e5622.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition. Taylor & Francis Group.

Augert, A. and D. Bernar (2013). "Immunosenescence and Senescence Immunosurveillance: One of the Possible Links Explaining the Cancer Incidence in Ageing Population."

Baker, D. J., C. Perez-Terzic, F. Jin, K. S. Pitel, N. J. Niederlander, K. Jeganathan, S. Yamada, S. Reyes, L. Rowe, H. J. Hiddinga, N. L. Eberhardt, A. Terzic and J. M. van Deursen (2008). "Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency." Nat Cell Biol **10**(7): 825-836.

Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland and J. M. van Deursen (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." Nature **479**(7372): 232-236.

Balducci, L. and W. B. Ershler (2005). "Cancer and ageing: a nexus at several levels." Nat Rev Cancer **5**(8): 655-662.

Barboza, J. A., G. Liu, Z. Ju, A. K. El-Naggar and G. Lozano (2006). "p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19842-19847.

- Beausejour, C. M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen and J. Campisi (2003). "Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways." EMBO J **22**(16): 4212-4222.
- Bischoff, F. Z., S. O. Yim, S. Pathak, G. Grant, M. J. Siciliano, B. C. Giovanella, L. C. Strong and M. A. Tainsky (1990). "Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization." Cancer Res **50**(24): 7979-7984.
- Blagosklonny, M. V. (2002). "Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins?" Cell Cycle **1**(6): 391-393.
- Blagosklonny, M. V. (2003). "Cell senescence and hypermitogenic arrest." EMBO Rep **4**(4): 358-362.
- Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nat Rev Genet **6**(8): 611-622.
- Böcker, W., H. Denk and P. U. Heitz (2007). Παθολογική Ανατομική. Αθήνα, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης ΕΠΕ.
- Boland, M. L., A. H. Chourasia and K. F. Macleod (2013). "Mitochondrial dysfunction in cancer." Front Oncol **3**: 292.
- Bordi, M., F. Nazio and S. Campello (2017). "The Close Interconnection between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cancer." Front Oncol **7**: 81.
- Bornstein, G., J. Bloom, D. Sitry-Shevah, K. Nakayama, M. Pagano and A. Hershko (2003). "Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase." J Biol Chem **278**(28): 25752-25757.
- Bougeard, G., J. M. Limacher, C. Martin, F. Charbonnier, A. Killian, O. Delattre, M. Longy, P. Jonveaux, J. P. Fricker, D. Stoppa-Lyonnet, J. M. Flaman and T. Frebourg (2001). "Detection of 11 germline inactivating TP53 mutations and absence of TP63 and HCHK2 mutations in 17 French families with Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome." J Med Genet **38**(4): 253-257.
- Campisi, J. (1997). "Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence." J Am Geriatr Soc **45**(4): 482-488.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." Cell **120**(4): 513-522.
- Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annu Rev Physiol **75**: 685-705.

Campisi, J., J. K. Andersen, P. Kapahi and S. Melov (2011). "Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease?" Semin Cancer Biol **21**(6): 354-359.

Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.

Carnero, A. (2013). "Markers of cellular senescence." Methods Mol Biol **965**: 63-81.

Chang, E. and C. B. Harley (1995). "Telomere length and replicative aging in human vascular tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11190-11194.

Child, E. S. and D. J. Mann (2006). "The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability." Cell Cycle **5**(12): 1313-1319.

Childs, B. G., M. Durik, D. J. Baker and J. M. van Deursen (2015). "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy." Nat Med **21**(12): 1424-1435.

Cho, K. A., S. J. Ryu, Y. S. Oh, J. H. Park, J. W. Lee, H. P. Kim, K. T. Kim, I. S. Jang and S. C. Park (2004). "Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status." J Biol Chem **279**(40): 42270-42278.

Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations." Science **265**(5170): 346-355.

Ciccica, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.

Cogliati, S., J. A. Enriquez and L. Scorrano (2016). "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." Trends Biochem Sci **41**(3): 261-273.

Collado, M., M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." Cell **130**(2): 223-233.

Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach and M. Serrano (2005). "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." Nature **436**(7051): 642.

Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nat Rev Cancer **10**(1): 51-57.

Collins, K. and J. R. Mitchell (2002). "Telomerase in the human organism." Oncogene **21**(4): 564-579.

Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.

Coppe, J. P., K. Kauser, J. Campisi and C. M. Beausejour (2006). "Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence." J Biol Chem **281**(40): 29568-29574.

Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." PLoS Biol **6**(12): 2853-2868.

Corpet, A. and M. Stucki (2014). "Chromatin maintenance and dynamics in senescence: a spotlight on SAHF formation and the epigenome of senescent cells." Chromosoma **123**(5): 423-436.

Cristofalo, V. J., A. Lorenzini, R. G. Allen, C. Torres and M. Tresini (2004). "Replicative senescence: a critical review." Mech Ageing Dev **125**(10-11): 827-848.

d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter and S. P. Jackson (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." Nature **426**(6963): 194-198.

Davalos, A. R., J. P. Coppe, J. Campisi and P. Y. Desprez (2010). "Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 273-283.

de Lange, T. (2009). "How telomeres solve the end-protection problem." Science **326**(5955): 948-952.

de Vries, A., E. R. Flores, B. Miranda, H. M. Hsieh, C. T. van Oostrom, J. Sage and T. Jacks (2002). "Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2948-2953.

Decottignies, A. and F. d'Adda di Fagagna (2011). "Epigenetic alterations associated with cellular senescence: a barrier against tumorigenesis or a red carpet for cancer?" Semin Cancer Biol **21**(6): 360-366.

DePinho, R. A. (2000). "The age of cancer." Nature **408**(6809): 248-254.

Di Bernardo, G., M. Cipollaro and U. Galderisi (2012). "Chromatin modification and senescence." Curr Pharm Des **18**(13): 1686-1693.

Dittmer, D., S. Pati, G. Zambetti, S. Chu, A. K. Teresky, M. Moore, C. Finlay and A. J. Levine (1993). "Gain of function mutations in p53." Nat Genet **4**(1): 42-46.

- Duronio, R. J. and Y. Xiong (2013). "Signaling pathways that control cell proliferation." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a008904.
- Eastman, A. (2004). "Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies." J Cell Biochem **91**(2): 223-231.
- Easton, D. F., D. Ford and D. T. Bishop (1995). "Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium." Am J Hum Genet **56**(1): 265-271.
- Efeyan, A., M. Collado, S. Velasco-Miguel and M. Serrano (2007). "Genetic dissection of the role of p21Cip1/Waf1 in p53-mediated tumour suppression." Oncogene **26**(11): 1645-1649.
- Effenberger, T., J. von der Heyde, K. Bartsch, C. Garbers, K. Schulze-Osthoff, A. Chalaris, G. Murphy, S. Rose-John and B. Rabe (2014). "Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding." FASEB J **28**(11): 4847-4856.
- Elledge, S. J. and A. Amon (2002). "The BRCA1 suppressor hypothesis: an explanation for the tissue-specific tumor development in BRCA1 patients." Cancer Cell **1**(2): 129-132.
- Evangelou, K., N. Lougiakis, S. V. Rizou, A. Kotsinas, D. Kletsas, D. Munoz-Espin, N. G. Kastrinakis, N. Pouli, P. Marakos, P. Townsend, M. Serrano, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2017). "Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens." Aging Cell **16**(1): 192-197.
- Fang, L., S. W. Lee and S. A. Aaronson (1999). "Comparative analysis of p73 and p53 regulation and effector functions." J Cell Biol **147**(4): 823-830.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Fischer, C. A., M. Jung, I. Zlobec, E. Green, C. Storck, L. Tornillo, A. Lugli, M. Wolfensberger and L. M. Terracciano (2011). "Co-overexpression of p21 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma relative to a significantly poor prognosis." Head Neck **33**(2): 267-273.
- Fischer, M. (2017). "Census and evaluation of p53 target genes." Oncogene **36**(28): 3943-3956.
- Friedberg, E. C., R. Wagner and M. Radman (2002). "Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations." Science **296**(5573): 1627-1630.
- Gadbois, D. M., E. M. Bradbury and B. E. Lehnert (1997). "Control of radiation-induced G1 arrest by cell-substratum interactions." Cancer Res **57**(6): 1151-1156.

Galanos, P., G. Pappas, A. Polyzos, A. Kotsinas, I. Svolaki, N. N. Giakoumakis, C. Glytsou, I. S. Pateras, U. Swain, V. L. Souliotis, A. G. Georgakilas, N. Geacintov, L. Scorrano, C. Lukas, J. Lukas, Z. Livneh, Z. Lygerou, D. Chowdhury, C. S. Sorensen, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2018). "Mutational signatures reveal the role of RAD52 in p53-independent p21-driven genomic instability." Genome Biol **19**(1): 37.

Galanos, P., K. Vougas, D. Walter, A. Polyzos, A. Maya-Mendoza, E. J. Haagenzen, A. Kokkalis, F. M. Roumelioti, S. Gagos, M. Tzetis, B. Canovas, A. Igea, A. K. Ahuja, R. Zellweger, S. Havaki, E. Kanavakis, D. Kletsas, I. B. Roninson, S. D. Garbis, M. Lopes, A. Nebreda, D. Thanos, J. J. Blow, P. Townsend, C. S. Sorensen, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2016). "Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing." Nat Cell Biol **18**(7): 777-789.

Gavrilov, L. A. and N. S. Gavrilova (2002). "Evolutionary theories of aging and longevity." ScientificWorldJournal **2**: 339-356.

Georgakilas, A. G., O. A. Martin and W. M. Bonner (2017). "p21: A Two-Faced Genome Guardian." Trends Mol Med **23**(4): 310-319.

Georgakopoulou, E. A., K. Tsimaratou, K. Evangelou, P. J. Fernandez Marcos, V. Zoumpourlis, I. P. Trougkos, D. Kletsas, J. Bartek, M. Serrano and V. G. Gorgoulis (2013). "Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues." Aging (Albany NY) **5**(1): 37-50.

Gorgoulis, V. G. and T. D. Halazonetis (2010). "Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response." Curr Opin Cell Biol **22**(6): 816-827.

Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-5551.

Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen and H. Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-1769.

Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E. E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widada, A. Yates, D. P. Cahill, D. N. Louis, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B. L. Weber, Y. E. Chiew, A. DeFazio, M. F. Greaves, A. R. Green, P. Campbell, E. Birney, D. F. Easton, G. Chenevix-Trench, M. H. Tan, S. K. Khoo, B. T. Teh, S. T. Yuen, S. Y. Leung, R. Wooster, P. A. Futreal and M. R. Stratton (2007). "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes." Nature **446**(7132): 153-158.

- Guran, S., Y. Tunca and N. Imirzalioglu (1999). "Hereditary TP53 codon 292 and somatic P16INK4A codon 94 mutations in a Li-Fraumeni syndrome family." Cancer Genet Cytogenet **113**(2): 145-151.
- Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis and J. Bartek (2008). "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development." Science **319**(5868): 1352-1355.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hayflick, L. (1997). "Mortality and immortality at the cellular level. A review." Biochemistry (Mosc) **62**(11): 1180-1190.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains" Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Hemann, M. T. and C. W. Greider (1999). "G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells." Nucleic Acids Res **27**(20): 3964-3969.
- Hochegger, H., S. Takeda and T. Hunt (2008). "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" Nat Rev Mol Cell Biol **9**(11): 910-916.
- Hussain, S. P. and C. C. Harris (1998). "Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes." Cancer Res **58**(18): 4023-4037.
- Hwang, E. S., G. Yoon and H. T. Kang (2009). "A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging." Cell Mol Life Sci **66**(15): 2503-2524.
- Hyun, K., J. Jeon, K. Park and J. Kim (2017). "Writing, erasing and reading histone lysine methylations." Exp Mol Med **49**(4): e324.
- Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.
- Jangamreddy, J. R. and M. J. Los (2012). "Mitoptosis, a novel mitochondrial death mechanism leading predominantly to activation of autophagy." Hepat Mon **12**(8): e6159.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Kang, C. and S. J. Elledge (2016). "How autophagy both activates and inhibits cellular senescence." Autophagy **12**(5): 898-899.
- Kang, T. W., T. Yevesa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T.

Longerich, S. Kubicka and L. Zender (2011). "Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development." Nature **479**(7374): 547-551.

Kim, S. T., D. S. Lim, C. E. Canman and M. B. Kastan (1999). "Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members." J Biol Chem **274**(53): 37538-37543.

Kim, Y. Y., H. J. Jee, J. H. Um, Y. M. Kim, S. S. Bae and J. Yun (2017). "Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence." Aging Cell **16**(5): 1094-1103.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." Nature **386**(6627): 761, 763.

Kirkwood, T. B. and S. N. Austad (2000). "Why do we age?" Nature **408**(6809): 233-238.

Κιτράκη, Ε., Κ. Τρούγκος (2006). 2^η Έκδοση. Αθήνα, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης ΕΠΕ.

Ko, A., S. Y. Han and J. Song (2016). "Dynamics of ARF regulation that control senescence and cancer." BMB Rep **49**(11): 598-606.

Kosar, M., J. Bartkova, S. Hubackova, Z. Hodny, J. Lukas and J. Bartek (2011). "Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a)." Cell Cycle **10**(3): 457-468.

Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender and S. W. Lowe (2008). "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis." Cell **134**(4): 657-667.

Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez and J. Campisi (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12072-12077.

Kubo, A. and F. J. Kaye (2001). "Searching for selective cyclin-dependent kinase inhibitors to target the retinoblastoma/p16 cancer gene pathway." J Natl Cancer Inst **93**(6): 415-417.

Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). "The essence of senescence." Genes Dev **24**(22): 2463-2479.

Kumar, V., A. Abbas and J. Aster (2012). Robbins Basic Pathology, Elsevier.

Kunkel, T. A. (2004). "DNA replication fidelity." J Biol Chem **279**(17): 16895-16898.

Kurz, E. U., P. Douglas and S. P. Lees-Miller (2004). "Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species." J Biol Chem **279**(51): 53272-53281.

Lang, G. A., T. Iwakuma, Y. A. Suh, G. Liu, V. A. Rao, J. M. Parant, Y. A. Valentin-Vega, T. Terzian, L. C. Caldwell, L. C. Strong, A. K. El-Naggar and G. Lozano (2004). "Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome." Cell **119**(6): 861-872.

Larsson, L. G. (2011). "Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence." Semin Cancer Biol **21**(6): 367-376.

Li, F. P. and J. F. Fraumeni, Jr. (1969). "Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?" Ann Intern Med **71**(4): 747-752.

Li, F. P., J. F. Fraumeni, Jr., J. J. Mulvihill, W. A. Blattner, M. G. Dreyfus, M. A. Tucker and R. W. Miller (1988). "A cancer family syndrome in twenty-four kindreds." Cancer Res **48**(18): 5358-5362.

Li, T., N. Kon, L. Jiang, M. Tan, T. Ludwig, Y. Zhao, R. Baer and W. Gu (2012). "Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence." Cell **149**(6): 1269-1283.

Liu, J., C. Zhang and Z. Feng (2014). "Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **46**(3): 170-179.

Liu, P. K., E. Kraus, T. A. Wu, L. C. Strong and M. A. Tainsky (1996). "Analysis of genomic instability in Li-Fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations." Oncogene **12**(11): 2267-2278.

Liu, X. L., J. Ding and L. H. Meng (2018). "Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer." Acta Pharmacol Sin.

Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.

Luo, J., N. L. Solimini and S. J. Elledge (2009). "Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction." Cell **136**(5): 823-837.

Lyons, S. M., E. Alizadeh, J. Mannheimer, K. Schuamberg, J. Castle, B. Schroder, P. Turk, D. Thamm and A. Prasad (2016). "Changes in cell shape are correlated with metastatic potential in murine and human osteosarcomas." Biol Open **5**(3): 289-299.

Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky and et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-1238.

Mannella, C. A. (2008). "Structural diversity of mitochondria: functional implications." Ann N Y Acad Sci **1147**: 171-179.

Mantovani, A. (2004). "Chemokines in neoplastic progression." Semin Cancer Biol **14**(3): 147-148.

Martin, A., J. Odajima, S. L. Hunt, P. Dubus, S. Ortega, M. Malumbres and M. Barbacid (2005). "Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1)." Cancer Cell **7**(6): 591-598.

Μαργαρίτης, Λ. Χ., Β. Κ. Γαλανόπουλος, Κ. Ε. Κεραμάρης, Ε. Σ. Μαρίνος, Ι. Σ. Παπασιδέρη, Δ. Ι. Στραβοπόδης, Ι. Π. Τρουγκάκος (2004). Βιολογία Κυττάρου, 4^η Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

Mavrogonatou, E., H. Pratsinis, A. Papadopoulou, N. K. Karamanos and D. Kletsas (2017). "Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis." Matrix Biol.

Mead, T. J. and V. Lefebvre (2014). "Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections." Methods Mol Biol **1130**: 233-243.

Meza, R., J. Jeon, S. H. Moolgavkar and E. G. Luebeck (2008). "Age-specific incidence of cancer: Phases, transitions, and biological implications." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16284-16289.

Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2005). "BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." Nature **436**(7051): 720-724.

Mijaljica, D., M. Prescott and R. J. Devenish (2010). "Mitophagy and mitoptosis in disease processes." Methods Mol Biol **648**: 93-106.

Milner, J., E. A. Medcalf and A. C. Cook (1991). "Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes." Mol Cell Biol **11**(1): 12-19.

Mirzayans, R., B. Andrais, A. Scott, M. C. Paterson and D. Murray (2010). "Single-cell analysis of p16(INK4a) and p21(WAF1) expression suggests distinct mechanisms of senescence in normal human and Li-Fraumeni Syndrome fibroblasts." J Cell Physiol **223**(1): 57-67.

Mishra, B. P., K. I. Ansari and S. S. Mandal (2009). "Dynamic association of MLL1, H3K4 trimethylation with chromatin and Hox gene expression during the cell cycle." FEBS J **276**(6): 1629-1640.

Montesano, R., P. Hainaut and C. P. Wild (1997). "Hepatocellular carcinoma: from gene to public health." J Natl Cancer Inst **89**(24): 1844-1851.

Mooi, W. J. and D. S. Peeper (2006). "Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer." N Engl J Med **355**(10): 1037-1046.

Muggleton-Harris, A. L. and L. Hayflick (1976). "Cellular aging studied by the reconstruction of replicating cells from nuclei and cytoplasm isolated from normal human diploid cells." Exp Cell Res **103**(2): 321-330.

Muller, P. A. and K. H. Vousden (2013). "p53 mutations in cancer." Nat Cell Biol **15**(1): 2-8.

Munoz-Espin, D., M. Canamero, A. Maraver, G. Gomez-Lopez, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodriguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado and M. Serrano (2013). "Programmed cell senescence during mammalian embryonic development." Cell **155**(5): 1104-1118.

Naka, K., A. Tachibana, K. Ikeda and N. Motoyama (2004). "Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts." J Biol Chem **279**(3): 2030-2037.

Nakanishi, M., M. Shimada and H. Niida (2006). "Genetic instability in cancer cells by impaired cell cycle checkpoints." Cancer Sci **97**(10): 984-989.

Napoli, M. and E. R. Flores (2017). "The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy." Br J Cancer **116**(2): 149-155.

Narita, M., S. Nuñez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence." Cell **113**(6): 703-716.

Negrini, S., V. G. Gorgoulis and T. D. Halazonetis (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 220-228.

Niccoli, T. and L. Partridge (2012). "Ageing as a risk factor for disease." Curr Biol **22**(17): R741-752.

Nichols, K. E., D. Malkin, J. E. Garber, J. F. Fraumeni, Jr. and F. P. Li (2001). "Germline p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(2): 83-87.

Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, M. Smeets, L. Hengst, C. Prives and S. I. Reed (1998). "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**(1): 629-643.

- Ogino, S., K. Nosho, K. Shima, Y. Baba, N. Irahara, G. J. Kirkner, A. Hazra, I. De Vivo, E. L. Giovannucci, J. A. Meyerhardt and C. S. Fuchs (2009). "p21 expression in colon cancer and modifying effects of patient age and body mass index on prognosis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(9): 2513-2521.
- Olivier, M., D. E. Goldgar, N. Sodha, H. Ohgaki, P. Kleihues, P. Hainaut and R. A. Eeles (2003). "Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype." Cancer Res **63**(20): 6643-6650.
- Olivier, M., M. Hollstein and P. Hainaut (2010). "TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(1): a001008.
- Olovnikov, A. M. (1996). "Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory." Exp Gerontol **31**(4): 443-448.
- Oren, M. and V. Rotter (2010). "Mutant p53 gain-of-function in cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(2): a001107.
- Overhoff, M. G., J. C. Garbe, J. Koh, M. R. Stampfer, D. H. Beach and C. L. Bishop (2014). "Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways." Nucleic Acids Res **42**(3): 1606-1618.
- Pantziarka, P. (2013). "Li Fraumeni syndrome, cancer and senescence: a new hypothesis." Cancer Cell Int **13**(1): 35.
- Papadopoulou, A. and D. Kletsas (2011). "Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo." Int J Oncol **39**(4): 989-999.
- Parry, A. J. and M. Narita (2016). "Old cells, new tricks: chromatin structure in senescence." Mamm Genome **27**(7-8): 320-331.
- Pavletich, N. P., K. A. Chambers and C. O. Pabo (1993). "The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots." Genes Dev **7**(12B): 2556-2564.
- Peng, T. I. and M. J. Jou (2004). "Mitochondrial swelling and generation of reactive oxygen species induced by photoirradiation are heterogeneously distributed." Ann N Y Acad Sci **1011**: 112-122.
- Pernas, L. and L. Scorrano (2016). "Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function." Annu Rev Physiol **78**: 505-531.
- Perry, J. A. and S. Kornbluth (2007). "Cdc25 and Wee1: analogous opposites?" Cell Div **2**: 12.

- Pfeiffer, V. and J. Lingner (2013). "Replication of telomeres and the regulation of telomerase." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(5): a010405.
- Qian, Y. and X. Chen (2013). "Senescence regulation by the p53 protein family." Methods Mol Biol **965**: 37-61.
- Rayess, H., M. B. Wang and E. S. Srivatsan (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." Int J Cancer **130**(8): 1715-1725.
- Roninson, I. B. (2002). "Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts." Cancer Lett **179**(1): 1-14.
- Rue, P. and J. Garcia-Ojalvo (2013). "Modeling gene expression in time and space." Annu Rev Biophys **42**: 605-627.
- Salminen, A., J. Ojala and K. Kaarniranta (2011). "Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process." Cell Mol Life Sci **68**(6): 1021-1031.
- Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz and S. Linn (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." Annu Rev Biochem **73**: 39-85.
- Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman and S. W. Lowe (2002). "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy." Cell **109**(3): 335-346.
- Schnabl, B., C. A. Purbeck, Y. H. Choi, C. H. Hagedorn and D. Brenner (2003). "Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype." Hepatology **37**(3): 653-664.
- Schosserer, M., J. Grillari and M. Breitenbach (2017). "The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy." Front Oncol **7**: 278.
- Schwarze, S. R., V. X. Fu, J. A. Desotelle, M. L. Kenowski and D. F. Jarrard (2005). "The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells." Neoplasia **7**(9): 816-823.
- Scorrano, L., M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S. A. Oakes, C. A. Mannella and S. J. Korsmeyer (2002). "A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis." Dev Cell **2**(1): 55-67.
- Sedlacek, Z., R. Kodet, V. Kriz, E. Seemanova, P. Vodvarka, P. Wilgenbus, J. Mares, A. Poustka and P. Goetz (1998). "Two Li-Fraumeni syndrome families with novel germline

p53 mutations: loss of the wild-type p53 allele in only 50% of tumours." Br J Cancer **77**(7): 1034-1039.

Seluanov, A., V. Gorbunova, A. Falcovitz, A. Sigal, M. Milyavsky, I. Zurer, G. Shohat, N. Goldfinger and V. Rotter (2001). "Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53." Mol Cell Biol **21**(5): 1552-1564.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.

Shay, J. W., G. Tomlinson, M. A. Piatyszek and L. S. Gollahon (1995). "Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome." Mol Cell Biol **15**(1): 425-432.

Shay, J. W. and W. E. Wright (2005). "Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase." Carcinogenesis **26**(5): 867-874.

Shelton, D. N., E. Chang, P. S. Whittier, D. Choi and W. D. Funk (1999). "Microarray analysis of replicative senescence." Curr Biol **9**(17): 939-945.

Shen, K. C., H. Heng, Y. Wang, S. Lu, G. Liu, C. X. Deng, S. C. Brooks and Y. A. Wang (2005). "ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development." Cancer Res **65**(19): 8747-8753.

Sherr, C. J. (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." Nat Rev Cancer **6**(9): 663-673.

Simboeck, E., J. D. Ribeiro, S. Teichmann and L. Di Croce (2011). "Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus." Biochem Pharmacol **82**(10): 1361-1370.

Sjoblom, T., S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler and V. E. Velculescu (2006). "The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers." Science **314**(5797): 268-274.

Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard and V. Dulic (1999). "Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts." Mol Cell Biol **19**(3): 2109-2117.

Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M. C. Ortells, V. Di Giacomo, R. Yosef, N. Pilpel, V. Krizhanovsky, J. Sharpe and W. M. Keyes (2013). "Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning." Cell **155**(5): 1119-1130.

- Swanson, E. C., B. Manning, H. Zhang and J. B. Lawrence (2013). "Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence." J Cell Biol **203**(6): 929-942.
- Tetsu, O. and F. McCormick (2003). "Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition." Cancer Cell **3**(3): 233-245.
- Thompson, L. H. and D. Schild (2002). "Recombinational DNA repair and human disease." Mutat Res **509**(1-2): 49-78.
- Tinari, A., T. Garofalo, M. Sorice, M. D. Esposti and W. Malorni (2007). "Mitoptosis: different pathways for mitochondrial execution." Autophagy **3**(3): 282-284.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **65**(2): 87-108.
- Trougakos, I. P., F. Sesti, E. Tsakiri and V. G. Gorgoulis (2013). "Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis." J Proteomics **92**: 274-298.
- Valente, S., R. Rossi, L. Resta and G. Pasquinelli (2015). "Exploring the human mesenchymal stem cell tubule communication network through electron microscopy." Ultrastruct Pathol **39**(2): 88-94.
- Varley, J. M., G. McGown, M. Thorncroft, L. A. James, G. P. Margison, G. Forster, D. G. Evans, M. Harris, A. M. Kelsey and J. M. Birch (1999). "Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors." Am J Hum Genet **65**(4): 995-1006.
- Varley, J. M., G. McGown, M. Thorncroft, M. F. Santibanez-Koref, A. M. Kelsey, K. J. Tricker, D. G. Evans and J. M. Birch (1997). "Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families." Cancer Res **57**(15): 3245-3252.
- Velimezi, G., M. Lontos, K. Vougas, T. Roumeliotis, J. Bartkova, M. Sideridou, A. Dereli-Oz, M. Kocylowski, I. S. Pateras, K. Evangelou, A. Kotsinas, I. Orsolich, S. Bursac, M. Cokaric-Brdovcak, V. Zoumpourlis, D. Kletsas, G. Papafotiou, A. Klinakis, S. Volarevic, W. Gu, J. Bartek, T. D. Halazonetis and V. G. Gorgoulis (2013). "Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer." Nat Cell Biol **15**(8): 967-977.
- Venkatachalam, S., Y. P. Shi, S. N. Jones, H. Vogel, A. Bradley, D. Pinkel and L. A. Donehower (1998). "Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation." EMBO J **17**(16): 4657-4667.
- Vicencio, J. M., L. Galluzzi, N. Tajeddine, C. Ortiz, A. Criollo, E. Tasdemir, E. Morselli, A. Ben Younes, M. C. Maiuri, S. Lavandro and G. Kroemer (2008). "Senescence,

apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review." Gerontology **54**(2): 92-99.

Vulliamy, T., A. Marrone, R. Szydlo, A. Walne, P. J. Mason and I. Dokal (2004). "Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC." Nat Genet **36**(5): 447-449.

Wagner, J., C. Portwine, K. Rabin, J. M. Leclerc, S. A. Narod and D. Malkin (1994). "High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer." J Natl Cancer Inst **86**(22): 1707-1710.

Wajapeyee, N., R. W. Serra, X. Zhu, M. Mahalingam and M. R. Green (2008). "Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7." Cell **132**(3): 363-374.

Wallace, D. C. (2012). "Mitochondria and cancer." Nat Rev Cancer **12**(10): 685-698.

Wang, E. (1995). "Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved." Cancer Res **55**(11): 2284-2292.

Watanabe, S., S. Kawamoto, N. Ohtani and E. Hara (2017). "Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases." Cancer Sci **108**(4): 563-569.

Wong, P., S. J. Verselis, J. E. Garber, K. Schneider, L. DiGianni, D. H. Stockwell, F. P. Li and S. Syngal (2006). "Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome." Gastroenterology **130**(1): 73-79.

Wu, S., C. Cetinkaya, M. J. Munoz-Alonso, N. von der Lehr, F. Bahram, V. Beuger, M. Eilers, J. Leon and L. G. Larsson (2003). "Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter." Oncogene **22**(3): 351-360.

Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo and S. W. Lowe (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." Nature **445**(7128): 656-660.

Yang, G., D. G. Rosen, Z. Zhang, R. C. Bast, Jr., G. B. Mills, J. A. Colacino, I. Mercado-Uribe and J. Liu (2006). "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**(44): 16472-16477.

Yang, N. C. and M. L. Hu (2005). "The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells." Exp Gerontol **40**(10): 813-819.

Yegorov, Y. E., S. S. Akimov, R. Hass, A. V. Zelenin and I. A. Prudovsky (1998). "Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells." Exp Cell Res **243**(1): 207-211.

Zhu, W., T. Abbas and A. Dutta (2005). "DNA replication and genomic instability." Adv Exp Med Biol **570**: 249-279.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

°C: Βαθμοί Κελσίου

µg: Microgram (Μικρογραµµάρια)

µl: Microliter (Μικρόλιτρα)

ABL: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome

APS: Ammonium persulfate

ARF: Alternate reading frame protein

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

BCR: Breakpoint Cluster Region

bp: Base pair

BRCA1: Breast cancer type 1 susceptibility protein

BrdU: Bromodeoxyuridine / 5-bromo-2'-deoxyuridine

CDKIs: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors

CDKs: Cyclin-Dependent Kinases

Chk1: Checkpoint kinase 1

Chk2: Checkpoint kinase 2

CIN: Chromosomal Instability

CXCR2: Chemokine (C-X-C motif) receptor 2

Da: Dalton

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

ddH₂O: Double-distilled water

DDR: DNA damage response

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoxyribonucleic acid

Dox: Doxycycline
E2F: E 2 factor
ECL: enhanced chemiluminescence
EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid
EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition
ERBB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ETS: E26 Transformation-Specific
g: Gravitational force
G: Guanine
GTPase: guanosine triphosphatase
GRO: Growth-Regulated Oncogene
H₂O₂: Hydrogen peroxide
H3K9Me: Histone H3 methylated Lys9
HER2: human epidermal growth factor receptor
HIF: Hypoxia-Inducible Factor
HRP: Horseradish peroxidase
hTERT: Human telomerase reverse transcriptase
ID: Inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins
IF: Immunofluorescence
IGFBP7: Insulin-like Growth Factor–Binding Protein 7
IL: interleukin
kb: Kilobase
kDa: Kilodalton
MAPK: Mitogen activated protein kinase
Mdm2: Mouse double minute 2
min: Minute

MKK3/6: Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3/6

ml: Milliliter

MMP: Matrix Metalloproteinase

mRNA: Messenger RNA

NF1: neurofibromin 1

NP-40: Nonidet P-40 substitute

OIS: Oncogene-Induced Senescence

p14^{ARF}: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A alternate reading frame

p16: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS: Phosphate buffered saline

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

pH: negative log of H⁺ ion concentration

PIKK: Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase

PRC: Polycomb repressor complex

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

RB: Retinoblastoma-associated protein

RNA: Ribonucleic acid

ROS: Reactive oxygen species

rpm: Rounds per minute

SAHFs: Senescence Associated Heterochromatin Foci

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype

SA-βgal: Senescence-Associated β-galactosidase

SCF: Skp, Cullin, F-box containing complex

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Ser: Serine

SIPS: Stress-Induced Premature Senescence

SKP2: S-phase Kinase-associated Protein 2

S-phase: synthesis phase

TBS: Tris buffered saline

TEM: Transmission Electron Microscope

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TIS: Therapy-Induced Senescence

TNM: Tumor-Node-Metastasis

TP53: Tumor protein p53

Tris: Trisamine

UV: Ultra violet

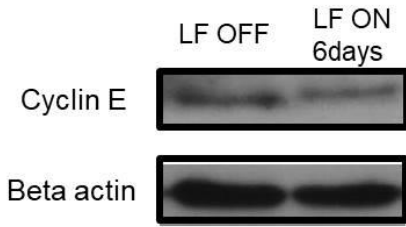
V: Volt

VEGF: Vascular endothelial growth factor

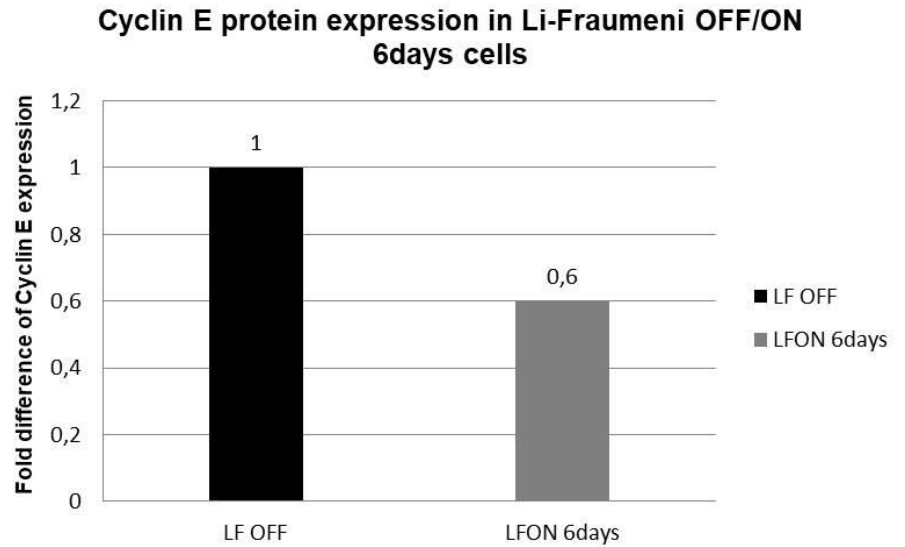
VHL: Von Hippel-Lindau

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: Σύγκριση της έκφρασης της κυκλίνης E ανάμεσα σε Li-Fraumeni OFF και ON 6days

a)



b)



Πρωτεωμική ανάλυση της κυκλίνης E: a) Μειωμένη έκφραση της κυκλίνης E ύστερα από ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου CDK1A. Beta actin = Δείκτης ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων b) Το δεξιό γράφημα απεικονίζει τα ποσοτικά προσδιορισμένα επίπεδα της κυκλίνης E του Western Blot που απεικονίζεται στα αριστερά. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται μια μείωση της τάξης του 40% σε σχέση με τα κύτταρα OFF