ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΙΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin υπό
συνθήκες γενοτοξικού στρες»

ΗΛΙΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΠΑΤΡΑ 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΙΣ ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin υπό
συνθήκες γενοτοξικού στρες»

ΗΛΙΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λυγερού Ζωή
Επίκουρος καθηγήτρια
Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Παν/μιο Πατρών

ΠΑΤΡΑ 2008

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

- Λυγερού Ζωή
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών,
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια.
- Αθανασιάδου Αγλαΐα
Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.
- Συνετός Διονύσιος
Καθηγητής, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

- Λυγερού Ζωή
Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών,
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια.
- Αθανασιάδου Αγλαΐα
Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.
- Συνετός Διονύσιος
Καθηγητής, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.
- Δραΐνας Διονύσιος
Καθηγητής, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.
- Γκρέκα- Σπηλιώτη Βασιλική
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.
- Παληογιάννη Φωτεινή
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.
- Σπυριδωνίδης Αλέξανδρος
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Πατρών.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με τη συγγραφή της εργασίας αυτής, ολοκληρώνεται ένα πρώτο «ταξίδι», μια γλυκιά περιπλάνηση στα πολύπλοκα μονοπάτια της έρευνας, της αναζήτησης, της γνώσης, ένα ταξίδι το οποίο αφήνει πίσω του πλούσιες και ευχάριστες αναμνήσεις. Δεν θα μπορούσα στο σημείο αυτό να μην ευχαριστήσω, ειλικρινά, ανθρώπους που συνέβαλαν καθοριστικά, ο καθένας με τον τρόπο του, στην επιτυχή ολοκλήρωση της προσπάθειας αυτής.

Ευχαριστώ, καταρχήν, την επίκουρο καθηγήτρια κι επιβλέπουσά μου Λυγερού Ζωή, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο πλάι της -ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας- όλα αυτά τα χρόνια. Η συμπαράστασή της, η αφοσίωσή της στην εργασία, η ορθή επιστημονική και κριτική της σκέψη, η επιμονή και η υπομονή της (όποτε αυτή χρειάστηκε), λειτούργησαν καθοριστικά για μένα. Την ευχαριστώ πολύ για αυτό.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, την καθηγήτρια Αθανασιάδου Αγλαΐα και τον καθηγητή Συνετό Διονύσιο, για το χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση και διόρθωση της παρούσας εργασίας, για τις παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους σε συζητήσεις που κατά καιρούς πραγματοποιήσαμε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ στην καθηγήτρια Αθανασιάδου Αγλαΐα, η οποία ως διευθύντρια του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας ήταν καθημερινά κοντά μας όλα αυτά τα χρόνια, στο εργαστήριο, στο γραφείο, στην αίθουσα σεμιναρίων, πάντα πρόθυμη να συζητήσει μαζί μας, να μας συμβουλευσει, να μας βοηθήσει.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, τον καθηγητή Δραΐνα Διονύσιο, την αναπληρώτρια καθηγήτρια Γκρέκα-Σπηλιώτη Βασιλική, την αναπληρώτρια καθηγήτρια Παληογιάννη Φωτεινή και τον επίκουρο καθηγητή Σπυριδωνίδη Αλέξανδρο, αφενός γιατί δέχτηκαν να γίνουν μέλη της επιτροπής μου και αφετέρου για τις εύστοχες παρατηρήσεις και σχόλια που έκαναν με στόχο τη βελτιστοποίηση της παρούσας διατριβής, τόσο κατά την εξέταση όσο και στις προσωπικές μας συζητήσεις. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την αναπληρώτρια καθηγήτρια Γκρέκα-Σπηλιώτη Βασιλική και την διδακτορική της φοιτήτρια Ιουλία Καραγεώργου, για την παροχή των καλλιιεργειών των φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών από βιοψίες ούλου φυσιολογικών ατόμων, τα οποία αποτέλεσαν το βασικότερο σύστημα μελέτης στην εργασία αυτή.

Ένα ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω προς όλα τα μέλη Δ.Ε.Π του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, τους αναπληρωτές καθηγητές Ζαρκάδη Ιωάννη και Σπάθα Διονύσιο, την επίκουρο καθηγήτρια Παπαχαντζοπούλου Αδαμαντία και τον καθηγητή Μοσχονά Νικόλαο γιατί την άψογη συνεργασία που είχαμε και τις πολυάριθμες επιστημονικές συζητήσεις που πραγματοποιήσαμε μέσα κι έξω από τις αίθουσες διδασκαλίας και σεμιναρίων όλα αυτά τα χρόνια. Ένα «ιδιαίτερο» ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου θα ήθελα να αφιερώσω στην επίκουρο καθηγήτρια Παπαχαντζοπούλου Αδαμαντία (Ντούλη) γιατί υπήρξε πάντα δίπλα μου, «σοφή» συμπαραστάτρια και σύμβουλος στις ευχάριστες και ακόμα περισσότερο στις δύσκολες και δυσάρεστες καταστάσεις. Την ευχαριστώ ολόθερμα για αυτό.

Ένα ακόμα ξεχωριστό ευχαριστώ αφιερώνω στην ερευνήτρια αλλά και φίλη μου Δρ. Τροχίδου Καλλιόπη, Διευθύντρια Έρευνας του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, για τη συνεχή παρουσία της και τη συμπαράστασή της, σε προσωπικό κυρίως επίπεδο, καθόλη την πορεία μου, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της παρούσας διδακτορικής εργασίας.

Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Φαρμακολογίας Ταραβήρα Σταύρο (καθώς και τη διδακτορική του φοιτήτρια Κοταντάκη Πανωραία) για την παροχή των εμβρυικών κυττάρων ποντικού (MEFs) αλλά και για τη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική στο σχεδιασμό και την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής. Ευχαριστώ, επίσης, τον Λέκτορα του Εργαστηρίου Γενικής Φαρμακολογίας Τσοπάνογλου Νίκο για την παροχή των καλλιεργειών των ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου ομφάλιου λώρου (HUVECs).

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ανεξαιρέτως όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας και Γενικής Φαρμακολογίας που κατά καιρούς συνεργαστήκαμε, παλιούς και νέους, για το ευχάριστο κλίμα που φρόντιζαν ο καθένας με τον τρόπο του να υπάρχει στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ του συνεργάτες και φίλους μου Δημάκη Μαρία, Κοταντάκη Πανωραία και Ρούκο Βασίλη, με τους οποίους ξεκινήσαμε μαζί 6 χρόνια πριν, συνεργαστήκαμε με τον πιο ιδανικό τρόπο μέσα -αλλά και έξω (!)- από το εργαστήριο. Τα χρόνια αυτά θα μου μείνουν αξέχαστα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στις τρεις καρδιακές μου φίλες, αλλά συναδέλφους, Λόντου Μάντω, Ουρανού Δέσποινα και Μάμαλη Ειρήνη για όλα όσα ζήσαμε και θα ζήσουμε, αλλά πολύ περισσότερο γιατί κατάφεραν και με άντεξαν όλα αυτά τα χρόνια...

Τέλος, ενα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου Στέφανο και Ζωή, γιατί πολύ απλά, χωρίς εκείνους τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε συμβεί....χωρίς εκείνους το «πλοίο» για το ταξίδι αυτό δεν θα είχε καν «σαλπάρει»...

Πάτρα, 4 Νοεμβρίου 2008

Μαρία Ηλιού

Στους γονείς μου

Στέφανο και Ζωή...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α΄

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	1
A.1 ΓΕΝΙΚΑ	1
A.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	2
A.2.1 Γενικά	2
A.2.2 Έναρξη της αντιγραφής του DNA	3
A.2.2.α Γενικά	3
A.2.2.β Αφετηρίες αντιγραφής	3
A.2.2.γ Η αδειοδότηση της αντιγραφής	6
A.2.2.δ Η πυροδότηση της αντιγραφής	9
A.2.3 Κυκλίνες και κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cyclin-Dependent-Kinases ή CDKs)	12
A.2.4 Ρύθμιση των συμπλόκων κινασών-κυκλινών	14
A.2.4.α Ρύθμιση μέσω δράσης άλλων κινασών ή φωσφατασών.....	14
A.2.4.β Μεταγραφική ρύθμιση	15
A.2.4.γ Ρύθμιση μέσω ουβικουΐτινο-εξαρτώμενης πρωτεόλυσης από το πρωτεάσωμα.....	15
A.2.4.δ Μέσω ειδικών αναστολέων των συμπλόκων κυκλινών-κινασών	16
A.2.5 Άλλοι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου	19
A.2.5.α Το μονοπάτι pRb/E2Fs	19
A.2.5.β Η πρωτεΐνη p53.....	22
A.2.5.γ Η πρωτεΐνη Geminin: ένας ιδιαίτερος αναστολέας του κυτταρικού κύκλου με πολυλειτουργική δράση και ξεχωριστή βιολογική σημασία	24
A.2.6 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints)	27
A.2.7 Μηχανισμοί για την αποφυγή της επαναντιγραφής (rereplication) του γονιδιώματος	31

ΜΕΡΟΣ Β΄

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	38
B.1 ΓΕΝΙΚΑ	38

B.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	39
B.3 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	41
B.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	43
B.4.1 Αναπαραγωγική γήρανση (replicative senescence)	43
B.4.2 Πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από στρες (SIPS)	45
B.4.3 Μοριακά μονοπάτια κυτταρικής γήρανσης	47
B.5 ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	50
B.5.1 Η γήρανση ως <i>in vivo</i> ογκοπροστατευτικός μηχανισμός	50
B.5.2 Ο ρόλος του «αντιγραφικού στρες»	53
 2. ΣΤΟΧΟΙ	 58
 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
 A. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ «ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ» ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GEMININ	 59
A.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ GEMININ	59
A.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ GEMININ	61
A.2.1 Γενικά	61
A.2.2 Καλλιέργεια των υβριδωμάτων	62
A.2.2.α Απόψυξη των υβριδωμάτων	63
A.2.2.β Αραίωση των υβριδωμάτων (διαδικασία <i>split</i>)	64
A.2.2.γ Ψύξη των υβριδωμάτων (πάγωμα)	64
A.2.3 Συλλογή του αντισώματος από τις καλλιέργειες των υβριδίων	65
 B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ GEMININ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ «ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ» RNA (RNA interference ή RNAi)	 66
B.1 ΓΕΝΙΚΑ	66
B.2 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ GEMININ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ siRNA ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ.....	66
B.2.1 Γενικά	66
B.2.2 Πρωτόκολλα διαμόλυνσης ανθρώπινων κυττάρων με siRNA ολιγονουκλεοτίδια	

με τη χρήση λιποσωμάτων (lipofection)	67
<i>B.2.2.α Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση Ολιγοφεκταμίνης</i>	68
<i>B.2.2.β Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση Λιποφεκταμίνης 2000</i>	68
B.3 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ GEMININ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ pSUPER ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ.....	69
B.3.1 Γενικά.....	69
B.3.2 Επιλογή των αλληλουχιών-στόχευσης του mRNA της Geminin.....	70
B.3.3 Πορεία κλωνοποίησης των Geminin-pSUPER πλασμιδίων.....	73
B.3.4 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με ηλεκτρο-διάτρηση.....	78
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (MEF).....	80
Γ.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ GEMININ ΚΙ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ.....	80
Γ.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΜΒΡΥΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ.....	81
Γ.2.1 Υλικά.....	81
Γ.2.2 Μέθοδοι διαχείρισης καλλιιεργειών των εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού.....	83
Γ.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ hGEMININ ΣΕ MEF ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΡΕΤΡΟΪΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ.....	84
Γ.3.1 Γενικά περί ρετροϊκών φορέων.....	84
Γ.3.2 Διαμόλυνση 293T κυττάρων με χρήση λιποσωμάτων για την παραγωγή πακεταρισμένων ιϊκών σωματίων (retroviral packaging).....	87
Γ.3.3 Διαμόλυνση των MEF με τους πακεταρισμένους ρετρο-ϊούς (transduction)	88
Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	90
Δ.1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ.....	90
Δ.1.1 Επαγωγή αναπαραγωγικής γήρανσης.....	90
Δ.1.2 Επαγωγή οξειδωτικά-επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης.....	93
Δ.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ ΜΙΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ (PDLs).....	94
Δ.2.1 Μέτρηση αριθμού κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	94
Δ.2.3 Υπολογισμός των κυτταρικών διπλασιασμών μιας καλλιέργειας	95
Δ.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ.....	96
Δ.3.1 Ιστοχημική χρώση β-γαλακτοσιδάσης ειδική για τη γήρανση (<u>S</u> enescence- <u>A</u> ssociated β- <u>G</u> alactosidase assay ή S.A β-Gal assay).....	96
Δ.3.2 Ανάλυση ποσοστού κυττάρων που παραμένουν σε κυτταρικό κύκλο με πείραμα	

ενσωμάτωσης BrdU.....	99
Δ.3.3 Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων (growth assays).....	99
E. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ή mRNA).....	100
E.1 ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	100
E.1.1 Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων για ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western.....	100
E.1.2 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυαμιδίου (SDS-PAGE).....	101
E.1.3 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Western Blot).....	101
E.1.4 Πρωτόκολλο κλασσικού ανοσοφθορισμού και διπλού ανοσοφθορισμού με χρώση BrdU.....	102
E.1.5 Ποσοτικοποίηση των σημάτων στα πειράματα ανοσοφθορισμού.....	103
E.2 ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ mRNA - ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ Real-Time PCR.....	104
E.2.1 Γενικά.....	104
E.2.2 Εκτέλεση πειράματος ποσοτικής Real-Time PCR.....	104
E.2.3 Ανάλυση των πειραμάτων qRT-PCR	109
ΣΤ. ΛΟΙΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	110

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄

Ο παράγοντας αδειοδότησης Cdt1 και ο αρνητικός ρυθμιστής του Geminin ανιχνεύονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε πρωτογενή φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, ενώ τα επίπεδά τους μειώνονται σε κύτταρα προχωρημένης ηλικίας	116
1. Εισαγωγή.....	116
2. Δημιουργία ενός νέου μονοκλωνικού αντισώματος για τη Geminin.....	117
3. Αντίστροφο πρότυπο χρονικής έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin κατά τον κυτταρικό κύκλο καρκινικών και φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων.....	119

4. Η πρωτεΐνη Cdt1 δεν ανιχνεύεται στην S ενώ η Geminin συσσωρεύεται λίγο μετά την έναρξη της S σε καρκινικά και φυσιολογικά πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα.....	121
5. Οι παράγοντες Cdt1 και Geminin δε συνεντοπίζονται στα ίδια κύτταρα – σημασία της πρωτεόλυσης για τη ρύθμιση του παράγοντα Cdt1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.....	125
6. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin είναι μειωμένα σε κύτταρα μεγάλης ηλικίας	127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β'

Έκφραση των μορίων Cdt1 και Geminin κατά την κυτταρική γήρανση ανθρώπινων Ινοβλαστών.....	130
1. Εισαγωγή.....	130
2. Πιστοποίηση εισόδου των WI-38 διπλοειδών ανθρώπινων ινοβλαστών σε αναπαραγωγική γήρανση	131
3. Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin, αν και διατηρούν το σωστό πρότυπο έκφρασης, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης κατά την αναπαραγωγική γήρανση των WI-38 διπλοειδών ανθρώπινων ινοβλαστών.....	132
4. Πιστοποίηση της επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης (SIPS) σε νεαρούς ινοβλάστες ύστερα από την υποβολή τους σε ήπιο οξειδωτικό στρες	136
5. Μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε κύτταρα που εισέρχονται σε H ₂ O ₂ -επαγόμενη γήρανση	139
6. Χρονική συσχέτιση της πτώσης των επιπέδων της Geminin με την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου στα κύτταρα.....	143
7. Η πτώση των επιπέδων έκφρασης του Cdt1 μετά την επίδραση του οξειδωτικού στρες είναι μια ταχεία διαδικασία και εξαρτάται από τη δράση του πρωτεασώματος	145

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ'

Διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας της πτώσης των επιπέδων της Geminin κατά την κυτταρική γήρανση των ανθρώπινων ινοβλαστών.....	148
1. Εισαγωγή.....	148
2. Δοκιμή της αποτελεσματικότητας των siRNAs για την αποσιώπηση του γονιδίου της Geminin σε ανθρώπινα κύτταρα	150

3. Δοκιμή της αποτελεσματικότητας των pSUPER πλασμιδιακών οχημάτων για την αποσιώπηση του γονιδίου της Geminin σε ανθρώπινα κύτταρα	154
4. Παροδική αποσιώπηση της Geminin σε ασύγχρονες καλλιέργειες νεαρών ινοβλαστών επάγει πρόωρη κυτταρική γήρανση.....	156
5. Η αποσιώπηση του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 δείχνει ακόμα μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής πρόωρης γήρανσης σε ασύγχρονες καλλιέργειες νεαρών ινοβλαστών	159
6. Επαγωγή φαινοτύπου πρόωρης γήρανσης ύστερα από αποσιώπηση της Geminin σε HeLa καρκινικά κύτταρα	162
7. Η απώλεια της Geminin καθιστά νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες περισσότερο επιρρεπείς σε πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες	164

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ'

Διερεύνηση της συσχέτισης της διαταραχής των επιπέδων έκφρασης της Geminin με την εμφάνιση κυτταρικής γήρανσης σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού.....	166
---	-----

1. Εισαγωγή.....	166
2. Εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού ετερόζυγοι για Geminin (+/-), ως ένα <i>in vivo</i> μοντέλο μειωμένης γονιδιακής δόσης της Geminin, για τη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης.....	167
3. Ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (+/-) εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά «αυθόρμητης» κυτταρικής γήρανσης σε σχέση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+)	170
4. Ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (+/-) εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης σε σχέση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+) υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	172
5. Εξωγενής ιϊκή υπερέκφραση της Geminin σε εμβρυικούς ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+) οδηγεί σε μικρή μείωση της εμφανιζόμενης γήρανσης	177

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Εισαγωγή.....	183
2. Παρόμοιο το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin στους πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες σε σχέση με κύτταρα προερχόμενα από καρκινικό ιστό και σημασία πρωτεολυτικής ρύθμισης του Cdt1 κατά τη διάρκεια του	

κυτταρικού κύκλου.....	183
3. Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin ρυθμίζονται αρνητικά με τρόπο που δε σχετίζεται με πρωτεόλυση κατά την αναπαραγωγική γήρανση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών.....	187
4. Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin στοχεύονται με διαφορετικό τρόπο κατά την H ₂ O ₂ -επαγόμενη πρόωρη κυτταρική γήρανση, πιθανώς μέσω διαφορετικού μοριακού μηχανισμού.....	191
5. Λειτουργική συσχέτιση των επιπέδων της Geminin με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης.....	193
6. Επαγωγή γήρανσης ύστερα από απώλεια της έκφρασης της Geminin ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες στο DNA.....	196
7. Η πρόκληση «αντιγραφικού στρες» λόγω απουσίας της Geminin, ως πιθανή αιτία ενεργοποίησης των μοριακών μονοπατιών της κυτταρικής γήρανσης	199
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	205
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	223
8. ABSTRACT.....	225
9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ / ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....	227

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α΄ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

A.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα κύτταρα αποτελούν τη θεμελιώδη δομική και λειτουργική μονάδα από την οποία απαρτίζονται όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί. Επιτελούν όλες τις λειτουργίες που είναι συνυφασμένες με τη ζωή, μεταξύ των οποίων η «διαφύλαξη» των κληρονομήσιμων γενετικών πληροφοριών σε κατάλληλες γενετικές δομές (DNA) και η μεταβίβασή τους στην επόμενη γενιά. Η μεταβίβαση αυτή επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας, γνωστή ως μίτωση, κατά την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του γενετικού υλικού σε δύο νέα θυγατρικά κύτταρα. Η μίτωση αποτελεί μέρος μιας αυστηρά ελεγχόμενης διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος. Ο κύκλος ζωής των κυττάρων, εκτός από τη μίτωση, περιλαμβάνει τη μεσόφαση, την περίοδο μεταξύ δύο διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων, η οποία με τη σειρά της υποδιαιρείται στις φάσεις G1, S και G2 (εικόνα 1.1)(Howard and Pelc, 1953)(ανασκόπηση (Brunner and Nurse, 2000; Nurse, 2000))(Voorhees et al., 1976).

Εικόνα 1.1: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου

1. Εισαγωγή

Κατά την φάση S (Synthesis), το κύτταρο διπλασιάζει το γενετικό του υλικό μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA, ενώ τα μεσοδιαστήματα G1 (Gap 1) και G2 (Gap 2) που μεσολαβούν προσφέρουν στο κύτταρο τον απαιτούμενο πρόσθετο χρόνο για να αυξηθεί σε μέγεθος, δίνοντας παράλληλα τη δυνατότητα σε αρμόδια συστήματα ελέγχου (checkpoints) να εξετάσουν εάν οι ένδο- ή εξωκυττάρειες συνθήκες είναι κατάλληλες για μετάβαση του κυττάρου στην επόμενη φάση. Απουσία αυξητικών παραγόντων στο περιβάλλον τα κύτταρα εισέρχονται στη λεγόμενη φάση ηρεμίας ή G0. Το σημείο περιορισμού (σημείο R) ή σημείο εκκίνησης «START» στους κατώτερους ευκαρυώτες αποτελεί το κρίσιμο σημείο στον κύκλο των ευκαρυωτικών οργανισμών, πέρα από το οποίο τα κύτταρα είναι δεσμευμένα να ολοκληρώσουν την κυτταρική τους διαίρεση ακόμα κι αν οι συνθήκες δεν είναι πια ευνοϊκές.

Σε αντίθεση με τον κυτταρικό κύκλο των προκαρυωτικών και των κατώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (ζύμες), ο οποίος ρυθμίζεται πρωτίστως βάσει της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον, στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη: η φυσική επιλογή στην περίπτωση τους δρα στο σύνολο των κυττάρων του οργανισμού, κι έτσι, η αύξηση και ο πολλαπλασιασμός των επιμέρους τύπων κυττάρων δεν είναι αυτοσκοπός. Τα εξωκυττάρια μηνύματα από το περιβάλλον ή από τα παρακείμενα κύτταρα και ιστούς, αλλά και το γενικότερο αναπτυξιακό πρόγραμμα έκφρασης των γονιδίων φαίνεται ότι επηρεάζουν τόσο το ρυθμό αύξησης όσο και της κυτταρικής διαίρεσης (Tapon et al., 2001).

A.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

A.2.1 Γενικά

Βασικό μέλημα των κυττάρων που βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο είναι η διατήρηση της ακεραιότητας της γενετικής πληροφορίας που περιέχεται στον πυρήνα και η σωστή μεταβίβασή της στους απογόνους. Αυτό προϋποθέτει ότι κάθε κύτταρο είναι σε θέση να αντιγράψει το γενετικό του υλικό και να το διαμοιράσει με απόλυτη ακρίβεια στα προκύπτοντα θυγατρικά κύτταρα. Δεδομένου του μεγέθους και της πολυπλοκότητας των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων απαιτείται να υπάρχουν μηχανισμοί-ελέγχου που θα εξασφαλίζουν στο ακέραιο την πιστότητα των διαδικασιών αυτών, μηχανισμοί οι οποίοι θα ελέγχουν ότι κανένα κύτταρο δεν θα εισέρχεται σε φάση S αν πρώτα δεν περάσει από M, και το αντίστροφο, περιορίζοντας, έτσι, τον κίνδυνο επαναντιγραφής ή απώλειας τμημάτων DNA κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου. Κεντρικό ρόλο σε ένα μοριακό μηχανισμό που ρυθμίζει χρονικά και τοπικά την έναρξη της αντιγραφής του DNA έχει δειχθεί ότι

1. Εισαγωγή

κατέχουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία της *αδειοδότησης της χρωματίνης* για αντιγραφή (licensing). Επιπρόσθετα, πολλαπλά μοριακά μονοπάτια που απαρτίζουν τα λεγόμενα *σημεία ελέγχου του κύκλου* (checkpoints), επιτηρούν τις διεργασίες του κυτταρικού κύκλου, σταματώντας τον όποτε αυτό κρίνεται απαραίτητο, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντιμετώπιση των βλαβών στο DNA. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η εύρυθμη διαδοχή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου αλλά και οι σωστοί ρυθμοί ανάπτυξης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

A.2.2 Έναρξη της αντιγραφής του DNA

A.2.2.α Γενικά

Για καιρό μετά την ανακάλυψη της δομής του DNA από τους Watson και Crick (1953) και τη διαλεύκανση των βασικών βημάτων της αντιγραφής του DNA, ο μηχανισμός που εξασφάλιζε την ορθή χωρικά και χρονικά έναρξη της αντιγραφής του DNA και του συντονισμού αυτής με τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου παρέμενε άγνωστος. Απαντήσεις στα ερωτήματα αυτά δόθηκαν τα τελευταία περίπου 20 χρόνια, όταν ανακαλύφθηκε, με μελέτες κυρίως στις ζύμες και στο αμφίβιο *Xenopus laevis*, το συστατικό της *αδειοδότησης της χρωματίνης* για αντιγραφή. Με το πέρασμα από τη μίτωση, μια σειρά πρωτεϊνών, *οι παράγοντες αδειοδότησης*, σχηματίζουν τα λεγόμενα *προαντιγραφικά σύμπλοκα* σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, τις *αφετηρίες αντιγραφής*, παρέχοντας έτσι στη χρωματίνη ένα είδος «άδειας» για να προχωρήσει σε έναν ακόμα κύκλο αντιγραφής (Bell and Dutta, 2002; Blow and Hodgson, 2002; Perkins et al., 2001).

A.2.2.β Αφετηρίες αντιγραφής

Σε όλα τα κύτταρα η έναρξη της αντιγραφής γίνεται από συγκεκριμένες περιοχές του DNA που καλούνται αφετηρίες αντιγραφής. Στους *προκαρυωτικούς οργανισμούς* όπως η *Escherichia coli* (*E. coli*), η αντιγραφή του κυκλικού μορίου DNA ξεκινά με τον σχηματισμό δύο διχάλων αντιγραφής που κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις από ένα μοναδικό σημείο του γονιδιώματος που ονομάζεται OriC (Bramhill and Kornberg, 1988a; Bramhill and Kornberg, 1988b)(ανασκόπηση (Stillman, 1993)). Το oriC είναι ένα γενετικό στοιχείο μεγέθους 245 bp το οποίο λειτουργεί ως σημείο αναγνώρισης και πρόσδεσης των εναρκτήριων πρωτεϊνών. Απαρτίζεται από δύο λειτουργικές υποπεριοχές: 1) 5 μοτίβα όπου προσδένεται η εναρκτήρια πρωτεΐνη DnaA (μια πρωτεΐνη με ενεργότητα ATPάσης), και 2) μια υποπεριοχή πλούσια σε A/T. Η αρχική πρόσδεση λίγων μορίων

1. Εισαγωγή

της DnaA, προκαλεί την προσέλκυση περισσότερων μορίων DnaA, τα οποία προκαλούν την μερική τήξη της παρακείμενης -πλούσιας σε A/T- περιοχής. Με τον τρόπο αυτόν επιτρέπεται η πρόσδεση δύο εξαμερικών συμπλόκων της πρωτεΐνης DnaB, υποβοηθούμενη από την πρωτεΐνη DnaC. Η DnaB, πρωτεΐνη με ρόλο ελικάσης, ξετυλίγει τη διπλή έλικα, προσελκύοντας έτσι τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA, όπως η πριμάση, η DNA pol III, το PCNA (Katayama, 2001).

Παρόμοιες μελέτες **σε ευκαρυωτικά κύτταρα** αποκάλυψαν την ύπαρξη περισσότερων του ενός σημείων έναρξης της αντιγραφής (από 300-400 στη ζύμη μέχρι και 50.000 πιθανές αφετηρίες αντιγραφής στον άνθρωπο), το οποίο συνάδει με την απαίτηση για γρήγορη αντιγραφή των -κατά πολύ μεγαλύτερων σε μέγεθος- ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα σημεία έναρξης της αντιγραφής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι αυτά του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), τα οποία ονομάζονται «αυτόνομα πολλαπλασιαζόμενες αλληλουχίες» ή ARS (Autonomous Replicating Sequences)(DePamphilis, 1993a; DePamphilis, 1993b; Marahrens and Stillman, 1992; Struhl et al., 1979). Οι περιοχές ARS είναι μεγέθους περίπου 100-150 bp και περιέχουν συντηρημένες αλληλουχίες μήκους 11bp πλούσιες σε αδενίνη/θυμίνη (ARS Consensus Sequences, ACS), τα λεγόμενα στοιχεία A. Το πιο γνωστό ARS στον ζυμομύκητα, το ARS1, περιέχει καθοδικά του στοιχείου A ακόμα 3 στοιχεία, τα B1, B2 και B3, τα οποία δεν δείχνουν να είναι συντηρημένα, έχουν, όμως, ρυθμιστική σημασία, καθώς πιθανότατα καθορίζουν την συχνότητα με την οποία χρησιμοποιείται η αφετηρία αντιγραφής (Marahrens and Stillman, 1992; Rao et al., 1994).

Όσον αφορά στον έτερο μύκητα, τον *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), οι αφετηρίες της αντιγραφής του φαίνεται ότι είναι πολύ μεγαλύτερες, μεγέθους έως και 1000 bp, αλλά και περισσότερο πολύπλοκες καθώς δεν περιέχουν κάποια συντηρημένη αλληλουχία που να τις χαρακτηρίζει ή που να είναι απολύτως απαραίτητη για τη λειτουργικότητα της περιοχής ως αφετηρία. Περιλαμβάνουν και πάλι πολλαπλά μικρά στοιχεία, μήκους 20-50 bp, πλούσια σε αδενίνη/θυμίνη με λειτουργική σημασία (Chuang and Kelly, 1999; Okuno et al., 1999).

Στους **ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (μετάζωα)**, η αντίστοιχη έρευνα για ταυτοποίηση πιθανών αφετηριών της αντιγραφής ήταν λιγότερο επιτυχής, αφού από τη μία ήταν δύσκολη η μοριακή απομόνωση κι ο χαρακτηρισμός τους, και από την άλλη προέκυπταν περιοχές DNA χωρίς ιδιαίτερη ομοιότητα όσον αφορά στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Στα έμβρυα του *Xenopus*, για παράδειγμα, η αντιγραφή του DNA φάνηκε ότι ξεκινάει από τυχαία σημεία του γονιδιώματος (ανά περίπου 9-12 kb), χωρίς και πάλι να υπάρχει ιδιαίτερη ομοιότητα μεταξύ των εναρκτήριων DNA αλληλουχιών (Donovan and Diffley, 1996), με εξαίρεση ότι περιελάμβαναν περιοχές πλούσιες σε αδενίνη/θυμίνη και παρουσίαζαν σχετική ευκολία στο ξετύλιγμα της διπλής

1. Εισαγωγή

έλικας. Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί βιοχημικά αρκετές πιθανές αφετηρίες αντιγραφής σε κύτταρα θηλαστικών (Sun et al., 2002).

Είχε προταθεί κατά το παρελθόν ότι στα ανώτερα ευκαρυωτικά ίσως να μην υπάρχουν συγκεκριμένες και αυστηρά καθορισμένες βάσει νουκλεοτιδικής σύστασης περιοχές έναρξης της αντιγραφής, αλλά άλλοι παράγοντες, όπως η διαμόρφωση και η δομή της χρωματίνης, είναι εκείνοι που καθορίζουν το εάν θα χρησιμοποιηθεί μία περιοχή DNA ως αφετηρία αντιγραφής (Donovan and Diffley, 1996; Hamlin and Dijkwel, 1995). Ολοένα αυξάνονται οι μελέτες που υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση και αποδεικνύουν ότι ο ορισμός μιας περιοχής ως αφετηρία φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από την τοπική οργάνωση της χρωματίνης, από το εάν βρίσκεται πλησίον κάποιου υποκινητή ή ενισχυτή ενός γονιδίου, καθώς και από τις επιγενετικές τροποποιήσεις της περιοχής (ακετυλίωση ιστονών, μη μεθυλιωμένες νησίδες CpGs), παρά από το εάν φέρει κάποια συγκεκριμένα δομικά στοιχεία (Calvi et al., 2007; Danis et al., 2004; Delgado et al., 1998; Iizuka et al., 2006). Αυτός, μάλιστα, θα μπορούσε να είναι κι ένας τρόπος με τον οποίο συνδέεται η ρύθμιση της αντιγραφής του DNA (και άρα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων) με την εφαρμογή του μεταγραφικού προγράμματος των κυττάρων κατά την ανάπτυξη (Aggarwal and Calvi, 2004).

Αναφορικά με την πυροδότηση των αφετηριών, είναι γνωστό ότι: 1) δεν πυροδοτούνται όλες οι αφετηρίες σε κάθε κυτταρικό κύκλο, 2) δεν πυροδοτούνται πάντα οι ίδιες αφετηρίες σε διαδοχικές διαιρέσεις, και 3) δεν πυροδοτούνται όλες ταυτόχρονα με την έναρξη της αντιγραφής. Οι αφετηρίες ενεργοποιούνται για ένα μικρό χρονικό διάστημα της S κατά ομάδες (των 20-80 αφετηριών). Διακρίνονται σε αυτές που πυροδοτούνται νωρίς κατά την S, κατά το μέσο της S και κατά το τέλος της S, ενώ σε κάθε χρονική στιγμή, τα σημεία όπου γίνεται η αντιγραφή του DNA (replication sites ή foci) προσδίδουν στον πυρήνα ένα συγκεκριμένο και ιδιαίτερο πρότυπο χρώσης σε πείραμα ενσωμάτωσης BrdU και ανοσοφθορισμού (εικόνα 1.2)(Dimitrova et al., 2002). Περισσότερες λεπτομέρειες αναφορικά με τη συγκεκριμένη μέθοδο παρακολούθησης της χρονικής εξέλιξης της φάσης S βάσει του προτύπου της BrdU χρώσης παρατίθενται στο τμήμα των αποτελεσμάτων.

Εικόνα 1.2: Απο αριστερά προς τα δεξιά: η κατανομή των αντιγραφόμενων τμημάτων DNA (replication foci), νωρίς κατά την S φάση, στο μέσο της S και στο τέλος της S αντίστοιχα, όπως φαίνεται σε πείραμα ενωμάτωσης BrdU (Dimitrova et al., 2002).

1. Εισαγωγή

Η δομή της χρωματίνης στην ευρύτερη περιοχή των αφετηριών φαίνεται να διαδραματίζει βασικό ρόλο στο χρονικό πρότυπο πυροδότησης των αφετηριών αντιγραφής του DNA. Για παράδειγμα, αφετηρίες που βρίσκονται σε περιοχή ετεροχρωματίνης, η οποία παραμένει σε ιδιαίτερα συμπυκνωμένη μορφή και κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, πυροδοτούνται αργά κατά την εξέλιξη της S φάσης.

A.2.2.γ Η αδειοδότηση της αντιγραφής

Η διαδικασία της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA (Blow and Laskey, 1988) αποτελεί το μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα επιτυγχάνουν τη σωστή χρονικά και τοπικά έναρξη της αντιγραφής του DNA, ενώ συγχρόνως εξασφαλίζουν -μέσω της αυστηρής ρύθμισής της- ότι καμία αφετηρία δεν θα πυροδοτηθεί περισσότερο από μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο. Η αδειοδότηση λαμβάνει χώρα με το πέρασμα των κυττάρων από μίτωση (τέλος μίτωσης-αρχή G1 φάσης) και συνίσταται στη διαδοχική στρατολόγηση στις αφετηρίες της αντιγραφής μιας σειράς πρωτεϊνών που θα συγκροτήσουν το προαντιγραφικό σύμπλοκο (preRC). Τελικός στόχος της αδειοδότησης είναι η προσέλκυση και η δέσμευση επί των αφετηριών των πρωτεϊνών MCM. Πρόκειται για μια ομάδα πρωτεϊνών με ενεργότητα ελικάσης οι οποίες, με τη συνδρομή κι άλλων παραγόντων, συμβάλλουν στην προσέλκυση της αντιγραφικής μηχανής και την πυροδότηση της αντιγραφής. Μετά την έναρξη της αντιγραφής κατά τη μετάβαση από την G1 στην S, το προαντιγραφικό σύμπλοκο αποσυναρμολογείται και οι αφετηρίες που πυροδοτήθηκαν μεταπίπτουν σε ανενεργή, μη αδειοδοτημένη κατάσταση. Στην κατάσταση αυτή παραμένουν μέχρις ότου το κύτταρο περάσει ξανά από μίτωση, οπότε και λαμβάνει χώρα ξανά η αδειοδότηση. Αφετηρίες που τελικά δεν πυροδοτήθηκαν, αλλά αντιγράφονται από παρακείμενες αφετηρίες, μεταπίπτουν και αυτές στην ανενεργή μη αδειοδοτημένη κατάσταση. Έτσι, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου έχουμε συνεχή εναλλαγή της κατάστασης των αφετηριών της αντιγραφής, από την αδειοδοτημένη (licensed state) στη μη αδειοδοτημένη (unlicensed state), ενώ ο αυστηρός χρονικός διαχωρισμός των διαδικασιών αδειοδότησης και πυροδότησης εξασφαλίζει στο κύτταρο την αποφυγή επαναπυροδότησης κι επαναντιγραφής του DNA (Diffley, 1996).

Η διαδικασία της αδειοδότησης περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής βήματα (εικόνα 1.3):

1. Το σύμπλοκο αναγνώρισης των αφετηριών ORC (Origin Recognition Complex)(Bell and Stillman, 1992), ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελούμενο από 6 υπομονάδες (ORC1-6) και συντηρημένο κατά την πορεία της εξέλιξης από τις ζύμες μέχρι και τον άνθρωπο, κατέχει

1. Εισαγωγή

πολλαπλούς ρόλους κατά το σχηματισμό του προαντιγραφικού συμπλόκου (Zhang et al., 2007). Κατά την έξοδο από τη μίτωση, αναγνωρίζει τις αφετηρίες αντιγραφής και προσδένεται ειδικά σε αυτές, ενώ προσελκύει άλλα μέλη του προαντιγραφικού συμπλόκου, όπως το Cdc6 με το οποίο έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά απευθείας (Mizushima et al., 2000; Speck et al., 2005), το Cdt1 και τις πρωτεΐνες MCM (Zhang et al., 2007). Η μικρότερη υπομονάδα του ORC συμπλόκου, η Orc6, φαίνεται ότι λειτουργικά διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες υπονάδες του ORC συμπλόκου, καθώς είναι η μόνη που δεν κατέχει ενεργότητα AAA+ATPάσης (Erzberger et al., 2006; Speck et al., 2005), ενώ ενδείξεις στον ζυμομύκητα *S. cerevisiae* δείχνουν ότι είναι η μοναδική υπομονάδα του ORC συμπλόκου που δεν απαιτείται για την πρόσδεση των υπολοίπων ORC πρωτεϊνών στο DNA (Woods et al., 1997). Πρόσφατες εργασίες στον ζυμομύκητα την εμπλέκουν πιο καθοδικά της πρόσδεσης του ORC συμπλόκου στις αφετηρίες, προτείνοντας ότι ρόλος της είναι η διατήρηση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών MCM στη χρωματίνη (Da-Silva and Duncker, 2007; Semple et al., 2006). Στον *S. cerevisiae* οι πρωτεΐνες ORC παραμένουν προσδεδεμένες στη χρωματίνη καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Diffley and Cocker, 1992), ενώ στα θηλαστικά, με την έναρξη της φάσης S, η υπομονάδα Orc1 αποδεσμεύεται από το DNA και υφίσταται ουβικουΐτινο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση (Kreitz et al., 2001; Li and DePamphilis, 2002; Mendez et al., 2002).

2. Ο παράγοντας Cdc6 προσελκύεται στις αφετηρίες όπου είναι ήδη συνδεδεμένο το σύμπλοκο των ORC πρωτεϊνών. Έχει περιγραφεί άμεση αλληλεπίδραση του συμπλόκου ORC και του Cdc6 (Mizushima et al., 2000; Speck et al., 2005). Οι πρωτεΐνες ORC και Cdc6 δρουν συντονισμένα για τη στρατολόγηση, αρχικά του Cdt1 κι εν συνεχεία των πρώτων μορίων MCM στη χρωματίνη (Bowers et al., 2004; Coleman et al., 1996; Donovan et al., 1997; Nishitani et al., 2000; Randell et al., 2006; Speck et al., 2005; Tada et al., 2001; Tanaka et al., 1997). Τελευταία δεδομένα στον ζυμομύκητα δείχνουν ότι στο στάδιο αυτό κύριο ρόλο διαδραματίζει η πρωτεΐνη Orc6: χωρίς την Orc6 γίνεται η πρόσδεση των ORC στην χρωματίνη αλλά δεν γίνεται η στρατολόγηση του Cdt1, ενώ σε *in vitro* πειράματα ανασυγκρότησης του προαντιγραφικού συμπλόκου παρουσία ORC6 είναι δυνατή η πρόσδεση των πρωτεϊνών MCM. Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι η αλληλεπίδραση του Cdt1 με τα μέλη του προαντιγραφικού συμπλόκου δεν είναι σταθερή, αλλά δυναμική,

Εικόνα 1.3: Το τρέχον μοντέλο της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA. Η αδειοδότηση της αντιγραφής ξεκινά κατά το τέλος της μίτωσης και περιλαμβάνει τη διαδοχική πρόσδεση επί των αφετηριών: των πρωτεϊνών ORC, του Cdc6, του Cdt1 και των πρωτεϊνών MCM. Η αδειοδότηση ολοκληρώνεται με τη στρατολόγηση του συμπλόκου των πρωτεϊνών MCM, οι οποίες πιθανότατα αναλαμβάνουν ρόλο ελικάσης του DNA, τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά την επιμήκυνση της αντιγραφής. Μετά την αδειοδότηση, οι CDK/DDK κινάσες ενεργοποιούν το προαντιγραφικό σύμπλοκο, προκαλώντας την πυροδότηση της αντιγραφής.

δεσμεύεται δηλαδή μόνο παροδικά και γρήγορα αποσυνδέεται (Gillespie et al., 2001; Randell et al., 2006; Xouri et al., 2007a; Xouri et al., 2007b), χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο λειτουργικός χαρακτήρας μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης (Zhang et al., 2007). Στον *S. cerevisiae* το Cdt1 εισέρχεται στον πυρήνα μαζί με τις πρωτεΐνες MCM (Tanaka and Diffley, 2002), ενώ έχει καταγραφεί απευθείας αλληλεπίδρασή του με μέλη των πρωτεϊνών MCM (MCM6)(Yanagi et al., 2002), γεγονός που σημαίνει ότι, ενδεχομένως, λειτουργεί ως μεταφορέας των πρωτεϊνών MCM στο προαντιγραφικό σύμπλοκο, ενώ πρόσφατη εργασία προτείνει ότι η δυναμική αλληλεπίδραση του Cdt1 με τις αφετηρίες της αντιγραφής εξυπηρετεί την στρατολόγηση πολλών μορίων MCM στο DNA, χωρίς την απαίτηση ταυτόχρονης στρατολόγησης των πρωτεϊνών ORC και Cdc6 (Zhang et al., 2007). Στις ζύμες, με την έναρξη της φάσης S, η πρωτεΐνη Cdc6 πρωτεολύεται, ενώ η πρωτεΐνη

1. Εισαγωγή

Cdt1 μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, αντίστροφα με ό,τι συμβαίνει στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα.

3. Οι πρωτεϊνικές υπομονάδες που απαρτίζουν το σύμπλοκο MCM στρατολογούνται στη χρωματίνη χάρη στην ύπαρξη των ήδη δεσμευμένων παραγόντων ORC-Cdc6-Cdt1, μια διαδικασία που απαιτεί υδρόλυση ATP από το Cdc6 (Randell et al., 2006). Το σύνολο των παραπάνω πρωτεϊνών συγκροτούν το προαντιγραφικό σύμπλοκο (preRC). Οι πρωτεΐνες MCM, σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα μέλη του preRC, είναι πιθανότατα απαραίτητες και κατά τη διάρκεια της S φάσης, αφού λειτουργούν ως αντιγραφική ελικάση για το ξετύλιγμα της διπλής έλικας μπροστά από την αντιγραφική διχάλα (Lee and Hurwitz, 2000). Βιοχημική *in vitro* ανάλυση στον *S. pombe* και στον άνθρωπο αποκάλυψε ενεργότητα ελικάσης του συμπλόκου των υπομονάδων MCM4, MCM6 και MCM (Braig et al., 2005; Masai et al., 2000). Στα μετάζωα και στον μύκητα *S. pombe*, οι πρωτεΐνες MCM παραμένουν πυρηνικές καθόλη τη διάρκεια του κύκλου και μετά την S αποδεσμεύονται από τη χρωματίνη, σε αντίθεση με τον *S. cerevisiae*, όπου μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

A.2.2.δ Η πυροδότηση της αντιγραφής

Με την πρόσδεση των MCMs στις αφετηρίες ολοκληρώνεται η αδειοδότηση της αντιγραφής και ο ρόλος των πρωτεϊνών ORCs, Cdc6 και Cdt1 έχει θεωρητικά ολοκληρωθεί. Η αντιγραφή, ωστόσο, του DNA ξεκινά αν δεν ενεργοποιηθεί πρώτα το -έως τότε ανενεργό- προαντιγραφικό σύμπλοκο. Με τη δραστηριοποίηση κατά τη μετάβαση από την G1 στην S δύο κατηγοριών κινασών, των **κυκλινοεξαρτώμενων κινασών της S φάσης** (S-CDK) και της **Cdc7/Dbf7** ή DDK (**D**bf7-**D**ependent **K**inase)(Johnston et al., 1999), ενεργοποιούνται τα συστατικά του προαντιγραφικού συμπλόκου, και το προαντιγραφικό (preRC) μεταπίπτει σε προ-εναρκτήριο σύμπλοκο (pre-IC). Μετά την πυροδότηση, η δράση των κινασών αυτών συμβάλει στην αποτροπή επαναδειοδότησης της αντιγραφής εντός του ίδιου κύκλου (βλ. κεφάλαιο 1.2.6 εισαγωγής)(εικόνα 1.4). Στους κατώτερους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (αναλυτικά βλ. κεφ. A.2.3) που ενεργοποιούνται για τη μετάβαση στην S είναι η Cdc2/Cig2 στον *S. pombe* και η Cdc28/Clb5,6 στον *S. cerevisiae*, ενώ στα μετάζωα είναι η Cdk2/κυκλίνη E και A στα μετάζωα. Η κινάση Cdc7/Dbf4 (DDK) ανακαλύφθηκε στον *S. cerevisiae* ως πρωτεΐνη απαραίτητη για την μετάβαση από την G1 στην S (Hereford and Hartwell, 1974). Η Cdc7 είναι η καταλυτική υπομονάδα της οποίας η περιοδική ενεργότητα ρυθμίζεται από τη ρυθμιστική υπομονάδα Dbf4 (Chapman and Johnston, 1989; Jackson et al., 1993; Kitada et al., 1992).

1. Εισαγωγή

Η πυροδότηση της αντιγραφής κατά τη G1/S μετάβαση επιτυγχάνεται με τη φωσφορυλίωση (από τις κινάσες CDK/DDK) πρωτεϊνών-στόχων και την προσέλκυση αυτών στις αφετηρίες. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε στον *S. cerevisiae* η φωσφορυλίωση από τις κινάσες CDK δύο βασικών εναρκτήριων πρωτεϊνών της αντιγραφής, των **Sld2** και **Sld3**, ως η ελάχιστη απαίτηση προκειμένου να ενεργοποιηθεί η αντιγραφή του DNA (εικόνα 1.4)(Tanaka et al., 2007a; Tanaka et al., 2007b; Zegerman and Diffley, 2007). Η φωσφορυλίωση αυτή διευκολύνει την αλληλεπίδρασή τους με την πρωτεΐνη **Dpb11**, σε μια αμινοτελική περιοχή του μορίου πλούσια σε BRCT-επαναλήψεις (**BRCA1-C-Terminal**). Όσον αφορά στην DDK, κύριος στόχος αυτής θεωρούνται οι πρωτεΐνες MCM, και συγκεκριμένα η MCM2 (Jackson et al., 1993; Lei et al., 1997; Masai et al., 2000).

Οι παραπάνω φωσφορυλιώσεις προκαλούν αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του προαντιγραφικού συμπλόκου, διευκολύνοντας τη δέσμευση επί των αφετηριών πρόσθετων βασικών παραγόντων για την έναρξη της αντιγραφής, όπως της **Cdc45** (Jares and Blow, 2000; Masuda et al., 2003; Wohlschlegel et al., 2000; Zou and Stillman, 2000) και του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου **GIN5** (**G**o **I**chi **N**i **S**an = 5,1,2,3 στην ιαπωνική γλώσσα)(Lei and Tye, 2001)(εικόνα 1.4). Η πρωτεΐνη Cdc45 είναι απαραίτητη για την έναρξη και τη εξέλιξη της αντιγραφής των ευκαρυωτικών κυττάρων αφού προσελκύει άλλες πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή, όπως την RPA, την DNA πολυμεράση α και το PCNA (Mimura and Takisawa, 1998; Miyake and Yamashita, 1998; Owens et al., 1997; Takisawa et al., 2000; Tercero et al., 2000; Walter and Newport, 2000), και συμβάλει στο ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA (Nedelcheva et al., 2005; Pacek and Walter, 2004), ενώ οι πρωτεΐνες GINS, το πιο πρόσφατα ανακαλυφθέν συστατικό της αντιγραφικής μηχανής, διαδραματίζουν ρόλους τόσο κατά τη φάση της έναρξης όσο και κατά την επιμήκυνση της αντιγραφής του DNA (σταθεροποιούν την Cdc45 στις αφετηρίες και συμβάλουν στην αλληλεπίδραση αυτής με τις πρωτεΐνες MCM, ξετυλίζουν το δίκλωνο DNA, σταθεροποιούν την DNA πολυμεράση α και προσελκύουν άλλους παράγοντες της αντιγραφής, όπως την τοποϊσομεράση I, την MCM10 και την RPA) (Aparicio et al., 1997; Gambus et al., 2006; Kanemaki et al., 2003; Tercero et al., 2000). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη Cdc45 μαζί με τις GINS (Kanemaki et al., 2003; Kubota et al., 2003; Takayama et al., 2003) είναι απαραίτητες για την πυροδότηση της αντιγραφής *in vivo* αλλά και για τη συγκρότηση και τη σταθερότητα των διχάλων αντιγραφής, ενώ αλληλεπιδρούν και οι δύο σταθερά καθόλη της διάρκεια της S με τις πρωτεΐνες MCM (Kanemaki and Labib, 2006).

Μετά την πυροδότηση, η Cdc45 και οι GINS μεταναστεύουν (μαζί με τις πρωτεΐνες MCM) μπροστά από την αντιγραφική διχάλα, ενώ τα συστατικά του preRC και η Sld3 απομακρύνονται από τις αφετηρίες (Kanemaki and Labib, 2006).

Εικόνα 1.4: Τρέχον μοντέλο ενεργοποίησης του προαντιγραφικού συμπλόκου ύστερα από τη δράση των κινασών CDK/DDK. Τα προαντιγραφικά συμπλόκα συγκροτούνται στις αφετηρίες της αντιγραφής νωρίς κατά την G1 φάση. Όταν οι κινάσες S-CDK και DDK ενεργοποιηθούν, φωσφορυλιώνονται βασικές πρωτεΐνες-στόχοι, μεταξύ των οποίων οι Sld2, Sld3 και οι πρωτεΐνες MCM. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές συμβάλουν στην προσέλκυση πρόσθετων πρωτεϊνών απαραίτητων για την έναρξη της αντιγραφής, με κυριότερες τις Dpb11, GINS, MCM10, Cdc45, RPA και τις αντιγραφικές πολυμεράσες α, δ και ε. Με την έναρξη της αντιγραφής, τα συστατικά του προαντιγραφικού συμπλόκου καθώς και η πρωτεΐνη Sld3 (*S. cerevisiae*) απομακρύνονται από τις διχάλες αντιγραφής (τροποποιημένη εικόνα από Tanaka S. et al., Cell Div 2007).

Ορθόλογα του Dpb11 (*S. cerevisiae*) έχουν αναγνωριστεί σε άλλους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Cut5/Rad4 στον *S. pombe*, η Mus101 στον *C. elegans*, στον *Xenopus* και στη *Drosophila* και η πρωτεΐνη TopBP1 στον άνθρωπο. Δομικά ομοιάζουν στην πρωτεΐνη Dpb11 καθώς περιλαμβάνουν πολλαπλές BRCT-επαναλήψεις, ενώ θεωρούνται πρωτεΐνες αναγκαίες για την έναρξη της αντιγραφής (ανασκόπηση (Garcia et al., 2005)). Ορθόλογα της Sld2/Drc1 των ζυμών θεωρείται η πρωτεΐνη RTS/RecQ4 στον *Xenopus*, στον ποντικό και στον άνθρωπο (με ελάχιστη όμως ομοιότητα) (Matsuno et al., 2006). Αντίθετα, η Sld3 είναι λιγότερο συντηρημένη και ομόλογά της δεν έχουν ακόμα βρεθεί, παρά μόνο στις ζύμες και στους μύκητες (Nakajima and Masukata, 2002).

A.2.3 Κυκλίνες και κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (*Cyclin-Dependent-Kinases* ή *CDKs*)

Πειράματα σε θερμοευαίσθητα μεταλλαγμένα στελέχη του ζυμομύκητα *S. cerevisiae* ανέδειξαν μία κατηγορία γονιδίων, τα *cdc* γονίδια (cell division cycle genes), των οποίων τα προϊόντα ήταν απολύτως απαραίτητα προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει από τη μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη (Hartwell et al., 1974). Συγχρόνως, ο Paul Nurse και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα θερμοευαίσθητα στελέχη του μύκητα *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), ανακάλυψαν ένα δίκτυο πρωτεϊνών που ήταν απολύτως απαραίτητο προκειμένου να πραγματοποιηθούν διαδικασίες όπως η συσπείρωση χρωμοσωμάτων και η κατάρρευση πυρηνικού φακέλου που χαρακτηρίζουν τη μετάβαση από την G2 στη μίτωση (Nurse, 1975). Πυρήνας του δικτύου αυτού αποδείχτηκε ότι ήταν μια κινάση, η **Cdc2**, της οποίας η ενεργότητα ήταν κρίσιμη για τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G2 στην M (Nurse, 1975). Ομόλογη πρωτεΐνη βρέθηκε και στον *S. cerevisiae*, η κινάση **Cdc28**. Τα *cdc* γονίδια ήταν τόσο εξελικτικά συντηρημένα μεταξύ των ειδών, ώστε ήταν δυνατό το ανθρώπινο ανάλογο γονίδιο να «συμπληρώσει» τη λειτουργία του αντίστοιχου ελαττωματικού γονιδίου σε μεταλλαγμένα στελέχη ζυμών (Lee and Nurse, 1987). Παράλληλα βιοχημικά πειράματα σε ωοκύτταρα του αμφιβίου *Xenopus* (Masui and Markert, 1971; Rao and Johnson, 1970) οδήγησαν στην απομόνωση και το βιοχημικό χαρακτηρισμό του παράγοντα MPF (Mitosis Promoting Factor), του αντίστοιχου παράγοντα των μεταζώων για τη μετάβαση από τη φάση G2 στην M (Lohka, 1998). Η ενεργότητα του MPF ήταν υψηλή στη μίτωση και χαμηλή στα μεσοφασικά κύτταρα.

Οι παραπάνω μελέτες οδήγησαν στην ανακάλυψη των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ή **CDK** (Cyclin Dependent Kinases). Η βιοχημική ανάλυση του παράγοντα MPF έδειξε ότι πρόκειται για ένα σύμπλοκο με ενεργότητα κινάσης σερίνης και θρεονίνης, αποτελούμενο από την μια **κυκλίνη** (ρυθμιστική υπομονάδα) και από μια **κυκλίνο-εξαρτώμενη κινάση** (λειτουργική υπομονάδα) (Lohka, 1998; Sible et al., 1998). Οι κυκλίνες ανακαλυφθεί αρχικά από τους Evans και Hunt και ονομάστηκαν έτσι λόγω της περιοδικής (κυκλικής) έκφρασης που παρουσίαζαν κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Evans et al., 1983). Η συσσώρευσή τους ξεκινούσε με την έναρξη της μεσόφασης φτάνοντας στο μέγιστο στη μίτωση (στο όριο ανάφασης-τελόφασης), οπότε και καταστρέφονταν (Hunt et al., 1992). Η κυκλίνη που αποτελούσε τον βασικό ρυθμιστή του παράγοντα MPF ονομάστηκε *μιτωτική κυκλίνη* καθώς θεωρήθηκε υπεύθυνη για τη ρύθμιση της εισόδου των κυττάρων σε μίτωση. Εκτός από τη μιτωτική κυκλίνη ή κυκλίνη B (στα μετάζωα), μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 16 κυκλίνες, χωρίς να σχετίζονται όμως όλες με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Peng et al., 1998; Rickert et al., 1996). Διαφορετικές κυκλίνες απαιτούνται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Στα μετάζωα, οι κυκλίνες της

οικογένειας D (κυκλίνες D1,D2,D3) ενεργοποιώντας τις κινάσες Cdk4/6 είναι απαραίτητες για την είσοδο των κυττάρων στη φάση G1 (Polyak et al., 1994b), είτε για την επανείσοδο από τη G0 στη φάση G1, ανταποκρινόμενες σε μιτογόνα ερεθίσματα (Kamijo et al., 1997). Οι κυκλίνες E (κυκλίνες E1,E2) ενεργοποιούν την κινάση Cdk2 προωθώντας την G1/S μετάβαση (Ohtsubo et al., 1995). Οι κυκλίνες A (κυκλίνες A1,A2) προσδένονται και πάλι στην κινάση Cdk2 και το σύμπλοκο αυτό είναι απαραίτητο για την είσοδο στην S (Danis et al., 2004; Walker and Maller, 1991). Τέλος, για την είσοδο των κυττάρων σε μίτωση απαραίτητη είναι η αλληλεπίδραση της μιτωτικής κινάσης Cdk1 με τις μιτωτικές κυκλίνες (κυκλίνες B) (Arellano and Moreno, 1997; King et al., 1994).

Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, στους ζυμομύκητες οι διαφορετικές κυκλίνες σχηματίζουν σύμπλοκα με μία μόνο κινάση, την Cdc2 στον *S. pombe* και την ομόλογή της, Cdc28, στον *S. Cerevisiae* (Moser and Russell, 2000) Αναλυτικά τα σύμπλοκα κινασών-κυκλινών που δραστηριοποιούνται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου στους ανθρώπους και στις ζύμες παρουσιάζονται στην εικόνα 1.5.

Καθεμία από τις κυκλίνες συνδεόμενη με την κατάλληλη κινάση δημιουργεί το σύμπλοκο κινάσης/κυκλίνης, το οποίο θα φωσφορυλιώσει τα κατάλληλα υποστρώματα, προωθώντας τον κυτταρικό κύκλο από την G1 στην S κι από τη G2 στην M (van den Heuvel and Harlow, 1993). Μετά την ολοκλήρωση του ρόλου τους, οι κυκλίνες προετεολύονται μέσω ουβικουΐτινο-εξαρτώμενου μηχανισμού. Δίκαια, επομένως, οι Murray και Hunt παρομοίασαν τις CDK με «μηχανές» του κυτταρικού κύκλου (Minshull et al., 1991), που «ανάβουν» και «σβήνουν» την κατάλληλη χρονική στιγμή. Οι κινάσες ρυθμίζονται, κυρίως, βάσει της διαθεσιμότητας των κυκλινών στο κύτταρο, αλλά και με πολλούς άλλους τρόπους τους οποίους θα αναλύσουμε στη συνέχεια.

1. Εισαγωγή

Κυκλίνη	Α. Στους ανθρώπους Κινάση	Προώθηση φάσης
D	Cdk4/6	Εξέλιξη G1
E	Cdk2	Μετάβαση από G1 σε S
A	Cdk2	Εξέλιξη S
A	Cdk1	Εξέλιξη G2-M
B	Cdk1	Μετάβαση από G2 σε M

Κυκλίνη		Β. Στους μύκητες Κινάση		Προώθηση φάσης
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	
Cln 1,2,3	Cig2	Cdc28	Cdc2	Φύση G1, πέρασμα του σημείου START
Clb 5,6	Cig2	Cdc28	Cdc2	Μετάβαση από G1 στην S
Cln 1,2,3,4	Cdc3	Cdc28	Cdc2	Μετάβαση από G2 στην M
Cln 2,3,4	Cdc3	Cdc28	Cdc2	Εξέλιξη M φάσης

Εικόνα 1.5: Πάνω: Τα σύμπλοκα κινασών-κυκλινών που δραστηριοποιούνται στις διάφορες φάσεις του κύκλου Α) στον άνθρωπο, και Β) στους δύο κύριους εκπροσώπους των μυκήτων. Κάτω: σχηματική αναπαράσταση της δραστηριότητας των συμπλόκων κινασών-κυκλινών στα ανθρώπινα κύτταρα.

A.2.4 Ρύθμιση των συμπλόκων κινασών-κυκλινών

A.2.4.α Ρύθμιση μέσω δράσης άλλων κινασών ή φωσφατασών

Η ενεργότητα των κινασών εξαρτάται πρωτίτως από την παρουσία ή όχι των αντίστοιχων ρυθμιστικών τους υπομονάδων, των κυκλινών, στην κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου. Απουσία

1. Εισαγωγή

της κυκλίνης, η κινάση είναι ανενεργή. Η πρόσδεση, όμως, της κυκλίνης στην κινάση δεν είναι από μόνη της σε θέση να την ενεργοποιήσει αν δεν συμβούν και οι κατάλληλες φωσφορυλιώσεις/αποσφωσφορυλιώσεις στο σύμπλοκο (Morgan, 1995). Έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα των συμπλόκων κινασών/κυκλινών ενισχύεται από 80 μέχρι και 300 φορές ύστερα από φωσφορυλίωσή τους σε συγκεκριμένα κατάλοιπα θρεονίνης (πχ. T161 για την Cdk1) των κινασών. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές γίνονται από άλλες κινάσες, τις **CAK** (Cdks Activating Kinases), με κύριο εκπρόσωπο την κινάση CDK7/κυκλίνη H. Αντίθετα, οι φωσφορυλιώσεις στο αμινοτελικό άκρο των κινασών είναι συνήθως ανασταλτικές. Η ρύθμιση, για παράδειγμα, της σπουδαιότερης μιτωτικής κινάσης, της Cdk1, γίνεται με τη συνδυασμένη δράση μίας κινάσης, της Mik1/Wee 1 και μίας φωσφατάσης, της Cdc25. Η Mik1/Wee 1 φωσφορυλιώνει την Cdk1 στην τυροσίνη 15 (Y15) απενεργοποιώντας την κι εμποδίζοντας, έτσι, οποιαδήποτε πρόωρη δράση της πριν τη μίτωση. Η αφαίρεση αυτής της αρνητικής φωσφορυλίωσης γίνεται κατά τη G2/M μετάβαση από τη φωσφατάση Cdc25. Αυτή η αποφωσφορυλίωση είναι που τελικά θα ενεργοποιήσει το σύμπλοκο Cdc2/κυκλίνης B και θα πυροδοτήσει τη μίτωση.

A.2.4.β Μεταγραφική ρύθμιση

Τα σύμπλοκα κυκλινών/κινασών που δρουν σε μια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου επηρεάζουν τη μεταγραφή κι επομένως την έκφραση κυκλινών που δρουν σε μεταγενέστερη φάση, ενεργοποιώντας τους κατάλληλους μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ αναστέλλουν παράλληλα τη δική τους μεταγραφή (Xouri et al., 2007b). Στα θηλαστικά, για παράδειγμα, στην αρχή της μεσόφασης παρατηρείται συσσώρευση του συμπλόκου Cdk4/κυκλίνης D, το οποίο φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη pRb απελευθερώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα E2F. Ο τελευταίος είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για την αντιγραφή του DNA, μεταξύ των οποίων είναι τα γονίδια των κυκλινών E και A (Leone et al., 1998; Stevaux and Dyson, 2002). Το σύμπλοκο Cdk2/κυκλίνης E που συσσωρεύεται αργότερα στη G1, ενισχύει την απελευθέρωση του E2F, φωσφορυλιώνοντας επιπλέον την πρωτεΐνη pRb (Broceno et al., 2002; Kamijo et al., 1997; Katayama, 2001; Lundberg and Weinberg, 1998; Matsushime et al., 1994; Meyerson and Harlow, 1994; Weinberg, 1995). Το σύμπλοκο Cdk2/κυκλίνης A που συσσωρεύεται στην S, φωσφορυλιώνει τελικά τον E2F, προκαλώντας την αναστολή του και την αποδέσμευσή του από το DNA, παύοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή των γονιδίων της S.

A.2.4.γ Ρύθμιση μέσω ουβικουϊτίνο-εξαρτώμενης πρωτεόλυσης από το πρωτεάσωμα

Η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη επιτυγχάνεται, μεταξύ άλλων, με την ειδική ουβικουϊτίνο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση πρωτεϊνών-κλειδιών του κυτταρικού

1. Εισαγωγή

κύκλου από το 26S πρωτεόσωμα. Δύο είναι οι μεγάλες ομάδες E3 λιγασών της ουβικουϊτίνης που διαθέτει το κύτταρο για τον έλεγχο πρωτεϊνών μέσω πρωτεόλυσης, οι οποίες δρουν στα δύο πιο κομβικά σημεία του κύκλου: 1) το σύμπλοκο **SCF** (Skp1/Cullin/E-box protein) που δραστηριοποιείται από την S μέχρι και την M συμβάλλοντας στην G1/S μετάβαση, και 2) το σύμπλοκο **APC/C** (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) το οποίο δρα από την M μέχρι την S, ρυθμίζοντας την M/G1 μετάβαση. Μεταξύ των πρωτεϊνών που στοχεύονται για πρωτεόλυση είναι οι μιτωτικές κυκλίνες κατά τη μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση (από το σύμπλοκο APC/C) (Hershko et al., 1994; Minshull et al., 1989; Murray et al., 1989; Osaka et al., 1997; Townsley et al., 1997; Yu et al., 1996; Zachariae et al., 1996), και οι G1-κυκλίνες (D και E) κατά την είσοδο στην S (από το σύμπλοκο SCF^{Skp1}).

Η ρύθμιση παραγόντων του κυτταρικού κύκλου μέσω πρωτεόλυσης φαίνεται πως είναι μια γενικότερη στρατηγική του κυττάρου για την άμεση αλλαγή του ενδοκυττάρου αποθέματος πρωτεϊνών-κλειδιών που χαρακτηρίζουν μια φάση ή με την παρουσία τους εμποδίζουν τη μετάβαση στην επόμενη. Έτσι, για παράδειγμα, το APC/C, κατά τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση εκτός από τις μιτωτικές κυκλίνες πρωτεολύει τις συγκολλητίνες (cohesins), τις πρωτεΐνες που συγκρατούν τις αδελφές-χρωματίνες μαζί, καθώς και τον αναστολέα της αδειοδότησης Geminin (βλ. κεφάλαιο A.2.5.δ). Το SCF^{Skp2} με τη σειρά του στοχεύει, κατά την G1/S μετάβαση τους παράγοντες αδειοδότησης Cdt1 και Cdc18 (στον άνθρωπο και στις ζύμες αντίστοιχα), ενώ στον μύκητα στοχεύει τον αναστολέα της βασικής κινάσης Cdc2, Rum1, επιτρέποντας έτσι στο σύμπλοκο Cdc2/Cig2 (σύμπλοκο κινάσης-κυκλίνης S φάσης) να επάγει την είσοδο σε S (Benito et al., 1998).

A.2.4.δ Μέσω ειδικών αναστολέων των συμπλόκων κυκλινών-κινασών

Δύο είναι οι οικογένειες αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors ή CKIs) που αναστέλλουν τα σύμπλοκα κινασών/κυκλινών στα **θηλαστικά** (Morgan, 1995) κατόπιν επίδρασης εξωκυττάρων στρεσογόνων μηνυμάτων, ιών ή ογκογονιδίων:

- Η οικογένεια αναστολέων του κυτταρικού κύκλου **INK4a** (Inhibitors of Kinase 4), στην οποία ανήκουν οι παράγοντες: p15^{Ink4b} (Alcorta et al., 1996), p16^{Ink4a} (Serrano et al., 1993), p18^{Ink4c} (Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995), p19^{Ink4d} (Chan et al., 1995; Dutta et al., 1995; Hirai et al., 1995). Πρόκειται για προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός πρώιμου mRNA που μεταγράφεται από τον γονιδιακό τόπο INK4a. Από τον ίδιο γονιδιακό τόπο κωδικοποιείται και ο ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου ARF (p19^{ARF}), ο οποίος, όμως, δε σχετίζεται με την οικογένεια των CKI. Οι CKIs της οικογένειας Ink4a αναστέλλουν ειδικά τις κινάσες CDK4 και 6, και μαζί με τον ARF εμπλέκονται στη ρύθμιση σημαντικών πρωτεϊνών της κυτταρικής αύξησης, όπως του p53 και του pRb (εικόνα 1.6)(βλ.κεφάλαιο A.2.5). Οι συγκεκριμένοι αναστολείς

1. Εισαγωγή

φαίνεται ότι συνδέουν την ρύθμιση των CDK/κυκλινών με εξωτερικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα με τη δράση αντι-αυξητικών παραγόντων ή ορμονών. Για παράδειγμα, ο $p15^{\text{Ink4b}}$ επάγεται με ενεργοποίηση του μονοπατιού TGF- β και συμβάλλει στην ικανότητά του να επάγει την G1-παύση του κύκλου (Alcorta et al., 1996; Reynisdottir and Massague, 1997). Το $p16^{\text{Ink4a}}$ συσσωρεύεται σταδιακά με τη γήρανση (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Kamijo et al., 1997; Palmero et al., 1997; Serrano, 1997), ενώ τα $p18^{\text{Ink4c}}$ και $p19^{\text{Ink4d}}$ εκφράζονται τοπικά σε συγκεκριμένους ιστούς κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση του εμβρύου (Alcorta et al., 1996; Morse et al., 1997). Η δράση των προϊόντων του INK4 γονιδιακού τύπου ασκείται μέσω της πρωτεΐνης Rb, όπως θα δούμε στη συνέχεια.

Εικόνα 1.6: Από τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος των πρώιμων mRNAs του γονιδιακού τύπου INK4a προκύπτουν οι παράγοντες $p14^{\text{ARF}}$ (ή $p19$ στον ποντικό) και $p16^{\text{Ink4a}}$, οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση δύο εκ των βασικότερων μονοπατιών κυτταρικής αύξησης, των $p53$ και $pRb/E2F$. Αριστερά, το β μετάγραφο του INK4a γονιδιακού τύπου (που περιλαμβάνει μέρος των εξωνίων 1β και 2) κωδικοποιεί τον παράγοντα $p19^{\text{ARF}}$. Ο $p19^{\text{ARF}}$ δεσμεύει τον Mdm2 (αρνητικό ρυθμιστή του $p53$), προκαλώντας έτσι την σταθεροποίηση και την ενεργοποίησή του. Δεξιά, ένα άλλο μετάγραφο (που περιλαμβάνει μέρος των εξωνίων 1^α, 2 και 3) κωδικοποιεί τον CKI $p16^{\text{Ink4a}}$, ο οποίος, αναστέλοντας τα G1-σύμπλοκα κυκλινών/κινασών επάγει την υποφωσφορυλίωση του pRb , κι επομένως, την ενεργοποίησή του.

1. Εισαγωγή

- Η οικογένεια αναστολέων του κυτταρικού κύκλου **CIP/KIPs**(ή WAF/KIP) (**C**yclin/**K**inase **I**nhibitory **P**roteins). Σε αυτήν την οικογένεια ανήκουν οι αναστολείς p21^{Cip1/Waf1} (Alcorta et al., 1996; Dulic et al., 1994; Gu et al., 1993), p27^{Kip1} (Polyak et al., 1994a; Polyak et al., 1994b; Toyoshima and Hunter, 1994) και p57^{Kip2} (Matsuoka et al., 1995; Ramsey et al., 1995). Έχουν μικρότερη ειδικότητα, με αποτέλεσμα να αναστέλουν με ικανοποιητικό τρόπο μια μεγάλη ποικιλία συμπλόκων cdk/κυκλινών G1 φάσης (σύμπλοκα κυκλινών D, E και A), ενώ μπορούν και αναστέλουν λιγότερο αποτελεσματικά και το μιτωτικό σύμπλοκο Cdk1-κυκλίνης B (Dulic et al., 1993). Από δομικές μελέτες βρέθηκε ότι οι αναστολείς αυτοί προσδένονται τόσο στην κινάση όσο και στην κυκλίνη του συμπλόκου.

Στην εικόνα 1.7, παρουσιάζεται σχηματικά η συμβολή των δύο παραπάνω οικογενειών CKIs στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ανθρώπινων φυσιολογικών (A) και καρκινικών (B) κυττάρων.

A. Φυσιολογικός κυτταρικός κύκλος

B. Καρκινικός κυτταρικός κύκλος

Εικόνα 1.7: A: Σχηματική απεικόνιση της δράσης των δύο οικογενειών CKI στα σύμπλοκα κινασών-κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε φυσιολογικά κύτταρα θηλαστικών. Η ανασταλτική δράση των αναστολέων CKI έχει ως στόχο τον μηχανισμό ελέγχου της μετάβασης από την G1 στην S. B: Όπως είναι

1. Εισαγωγή

εμφανές, τα μονοπάτια αυτά είναι τα πρώτα που απενεργοποιούνται κατά την καρκινογένεση, με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητα των συμπλόκων Cdk-κυκλινών και το ανεξέλεγκτο πέρασμα από την G1 στην S φάση (εικόνα από Berthet C. et al. (Berthet and Kaldis, 2007)).

Οι παραπάνω αναστολείς (με σπουδαιότερους τους p16^{Ink4a} και p21^{Cip1/Waf1}) ανήκουν στην οικογένεια των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των οποίων ο κύριος ρόλος, όπως θα δούμε και στο δεύτερο μέρος της εισαγωγής, είναι η συμμετοχή σε σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε σήματα στρες και βλαβών του DNA καθώς και η επαγωγή και η διατήρηση της κυτταρικής γήρανσης στα ανθρώπινα κύτταρα. Συνολικά, ο ρόλος των CKI είναι να περιορίζουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα κυττάρων με βλάβες στο DNA με την ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών που οδηγούν σε παύση του κυτταρικού κύκλου (στην G1 ή G2 φάση).

Στον *S. pombe* ο αναστολέας της βασικής κινάσης Cdc2 (ή Cdk1) είναι η πρωτεΐνη Rum1, η οποία συσσωρεύεται από την ανάφαση της μίτωσης και παραμένει καθόλη την G1. Ρόλος του είναι να αναστέλει την δράση της περίσσειας του συμπλόκου κινάσης-κυκλίνης της μίτωσης (Cdc2-cdc13) αλλά και του συμπλόκου επαγωγής της S φάσης (Cdc2-cig2). Κατά την G1/S μετάβαση, ο Rum1 φωσφορυλιώνεται, με αποτέλεσμα να στοχεύεται για πρωτεόλυση, και με τη δράση του συμπλόκου Cdc2-cig2 επάγεται η είσοδος στην S φάση (Benito et al., 1998; Moser and Russell, 2000). Στον *S. cerevisiae* αντίστοιχος αναστολέας του κυτταρικού κύκλου είναι ο Sic1.

A.2.5 Άλλοι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου

A.2.5.a Το μονοπάτι pRb/E2Fs

Το γονίδιο Rb πρωτοανακαλύφθηκε στη σπάνια παιδική περίπτωση καρκίνου του αμφιβληστροειδούς (ρετινοβλάστωμα) (Friend et al., 1986; Fung et al., 1987; Lee and Nurse, 1987), ενώ σήμερα γνωρίζουμε ότι βρίσκεται απενεργοποιημένο λόγω επίκτητης μετάλλαξης ή απαλοιφής του στις περισσότερες μορφές καρκίνου. Η κύρια δράση της πρωτεΐνης pRb εστιάζεται στη φάση G1: σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται το Rb βρίσκεται στην υπερφωσφορυλιωμένη του μορφή, ενώ κατά την έξοδο σε φάση ηρεμίας (G0) μέσω της G1, κατά τη διαφοροποίηση ή τη γήρανση, το Rb υποφωσφορυλιώνεται (Chen et al., 1989). Πολλές οικογένειες ιών, όπως ο SV40 και ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων τύπου 16 (HPV16) εκμεταλλεύονται το μονοπάτι της οικογένειας του Rb (τις πρωτεΐνες Rb, p107 και p130) για να επιβάλλουν την είσοδο των κυττάρων σε S φάση, προς όφελος του πολλαπλασιασμού του ιού. Αυτό γίνεται μέσω πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα ιικά γονιδιώματα (το μεγάλο αντιγόνο του SV40, SV40 large T antigen και η πρωτεΐνη E7 του

1. Εισαγωγή

HPV16 αντίστοιχα), οι οποίες προσδένουν τις πρωτεΐνες της οικογένειας Rb (μέσω του LXCXXE-μοτίβου που φέρουν) και τις απενεργοποιούν (DeCaprio et al., 1988; Stevaux and Dyson, 2002). Το ίδιο συμβαίνει και με την πρωτεΐνη E1A του ανθρώπινου αδενοϊού (Quinlan et al., 1988).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rb ασκούν τις ποικίλες δράσεις τους μέσω πρόσδεσης σε μια ποικιλία ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, ωστόσο η βασική τους λειτουργία ως πρωτεϊνών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, και κυρίως της G1/S μετάβασης, επιτυγχάνεται μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2F (Helin, 1998; Michaloglou et al., 2005; Stevaux and Dyson, 2002). Δύο είναι οι κατηγορίες γονιδίων που υπόκειται σε μεταγραφή εξαρτώμενη από τους παράγοντες E2F: α) γονίδια που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του DNA, και β) γονίδια-ρυθμιστές φάσεων του κύκλου (εικόνα 1.8) (Helin, 1998; Lavia and Jansen-Durr, 1999; Sladek, 1997; Vigo et al., 1999). Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2F συμμετέχουν πιθανότατα στη μεταγραφική ρύθμιση και του παράγοντα αδειοδότησης, Cdt1, αλλά και του αναστολέα αυτού, Geminin (Bartkova et al., 2006; Whittaker et al., 2000; Yoshida et al., 2005).

Γονίδια που ρυθμίζονται από τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες			
Ρυθμιστικά γονίδια		Γονίδια για την αντιγραφή του DNA	
Rb, p107	cycA, cycE	DNA Polymerase α	TK
E2F1, E2F2, E2F3a	B-myb	DHFR	PCNA
cdc2, cdc6,	c-myc	Histone H2A	RRM2
cdc25A, cdc25C		ORC1	SRP20
		TS	

Εικόνα 1.8: Βασικά γονίδια-στόχοι των E2F-μεταγραφικών παραγόντων.

Κατά τη φάση ηρεμίας (G0) και κατά την έξοδο από τη μίτωση (αρχή G1), η πρωτεΐνη Rb μεταπίπτει στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή κι ενεργοποιείται, με αποτέλεσμα να προσδένεται στον παράγοντα E2F και να μη του επιτρέπει την πρόσβαση σε υποκινητές γονιδίων-στόχων (εικόνα 1.8). Κατά την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο και κατά την πρόοδο της G1, γίνεται η φωσφορυλίωση του Rb αρχικά από τα σύμπλοκα Cdk4/6-κυκλίνης D κι εν συνεχεία από τα σύμπλοκα Cdk2-κυκλινών E και A, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ο E2F και να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων της φάσης S (Kamijo et al., 1997; Katayama, 2001; Lundberg and Weinberg, 1998; Nevins, 1998; Stevaux and Dyson, 2002; Weinberg, 1995) (εικόνα 1.9). Στη συνέχεια δρουν τα σύμπλοκα των κυκλινών A και B, τα οποία με τη δράση τους διατηρούν το Rb σε υπερφωσφορυλιωμένη μορφή (και συνεπώς ανενεργό) μέχρι και την έξοδο από τη μίτωση, οπότε και μεταπίπτει στην υποφωσφορυλιωμένη του μορφή κι ενεργοποιείται ξανά, εμποδίζοντας

1. Εισαγωγή

την πρόωρη έναρξη της φάσης S (Kamijo et al., 1997; Ludlow et al., 1993; Ludlow et al., 1990). Την πρόωρη έναρξη της φάσης S εμποδίζει καθόλη τη διάρκεια της G1 και η παρουσία αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (CKIs, βλ. κεφ. Α.2.4δ), όπως για παράδειγμα του p27^{Cip1/Kip1} (εικόνα 1.9), ο οποίος προσδένεται στα σύμπλοκα των κυκλινών D με την Cdk4/6 και τα απενεργοποιεί (Blain et al., 2003).

Εικόνα 1.9: Ο ρόλος του μονοπατιού Rb/E2F στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. (1) Όσο η πρωτεΐνη Rb είναι αποφωσφορυλιωμένη παραμένει ενεργή, συγκρατώντας τον E2F. (2) Έτσι, δεν του επιτρέπει να μεταγράψει τα γονίδια-στόχους του. (3) Παρουσία κάποιου μιτογόνου ερεθίσματος ή κατά τη φάση G1 ενεργοποιείται το σύμπλοκο CDK4/κυκλίνης D, το οποίο (5) θα φωσφορυλιώσει τον παράγοντα Rb, (6) αναγκάζοντάς τον να απελευθερώσει το μεταγραφικό παράγοντα των γονιδίων της S φάσης, τον E2F. (7) Το Rb φωσφορυλιώνεται περαιτέρω με τη δράση των συμπλόκων Cdk2/κυκλινών E που αρχίζουν σταδιακά να συσσωρεύονται, οπότε αυξάνεται ακόμα περισσότερο η μεταγραφική ενεργότητα του παράγοντα E2F. (8) Παρατηρούμε την αρνητική δράση των CKI (πχ. του p27^{Kip1/Cip1}) στη ρύθμιση του μονοπατιού των Rb/E2F μέσω αναστολής των συμπλόκων Cdk4/6-κυκλίνης D, καθώς και (9) την απενεργοποίηση του Rb ύστερα από υπερέκφραση της πρωτεΐνης E7 του ιού HPV, το οποίο επιτρέπει στον ελεύθερο, πλέον, παράγοντα E2F να επάγει συνεχώς τη μεταγραφή των γονιδίων της S φάσης.

1. Εισαγωγή

Εκτός από το να δεσμεύει τους παράγοντες E2F αναστέλοντας τη μεταγραφική τους ενεργότητα, άλλος μηχανισμός δράσης που προτείνεται για το Rb είναι η πρόσδεσή του ως σύμπλοκο με τους παράγοντες E2F στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων τους, με αποτέλεσμα την ενεργή αναστολή της μεταγραφής. Στο σύμπλοκο αυτό προσελκύονται πρωτεΐνες με τις οποίες το Rb αλληλεπιδρά, όπως είναι οι πρωτεΐνες Brg1/Brm (τα κύρια συστατικά του συμπλόκου SWI/SNF) και οι πρωτεΐνες HDACs (αφαιρούν ακετυλομάδες από τις ουρές των ιστονών) (Harbour and Dean, 2000; Sellers et al., 1995; Weintraub et al., 1995). Μέσω των αλληλεπιδράσεων αυτών στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων επιτυγχάνεται τοπικά η αναδιοργάνωση της χρωματίνης και η απόκτηση μιας πιο κλειστής δομής, που αναστέλει την πρόοδο της μεταγραφής τους.

Τέλος, και σε συμφωνία με τα όσα είδαμε, η πρωτεΐνη Rb θεωρείται ένας από τους βασικότερους παράγοντες που συμβάλουν στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση κατά την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης, το οποίο θα αναλυθεί και στη συνέχεια (βλ. μέρος δεύτερο εισαγωγής).

A.2.5 β Η πρωτεΐνη p53

Πάνω από το 50% των περιπτώσεων καρκίνου οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου p53. Το p53 επάγει τη μεταγραφή πολλών -γνωστών σήμερα- γονιδίων, μεταξύ των οποίων είναι το p21^{WAF1/CIP1} (ανήκει στους αναστολείς CKI), το Mdm2 (ογκογονίδιο, αναστέλει τη δράση του ίδιου του p53), η κυκλίνη G (χωρίς κυκλική έκφραση όπως οι άλλες κυκλίνες, λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου συμμετέχοντας πιθανότατα σε μονοπάτια απόκρισης σε βλάβες και την απόπτωση) και το γονίδιο Bax (μέλος της Bcl ομάδας γονιδίων που επάγει απόπτωση)(Agarwal et al., 2007; Harvey and Levine, 1991). Κεντρικός είναι ο ρόλος του p53 στην ενεργοποίηση σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (G1/S και G2/M) ύστερα από βλάβες στο DNA (αναλυτικά στο κεφάλαιο A.2.6). Εκτός από το να καθυστερεί τον κυτταρικό κύκλο όποτε αυτό απαιτείται, συμμετέχει και σε άλλες -ζωτικής σημασίας- κυτταρικές διεργασίες όταν το γονιδίωμα και η ομοιόσταση του κυττάρου απειλείται, όπως η επαγωγή της απόπτωσης και της γήρανσης (εικόνα 1.10). Δεν είναι άδικο, επομένως, που χαρακτηρίστηκε ως «φύλακας του γονιδιώματος» (guardian of the genome) (Lane, 1992).

1. Εισαγωγή

Σε φυσιολογικά διαιρούμενα κύτταρα η πρωτεΐνη p53 βρίσκεται σε πολύ χαμηλά πρωτεϊνικά επίπεδα αφού υπόκειται σε ταχεία πρωτεόλυση (μέσω της δράσης της πρωτεΐνης Mdm2). Κατόπιν επίδρασης κάποιου γενοτοξικού ή στρεσογόνου παράγοντα που προκαλεί βλάβες στο DNA (κυρίως γ-ακτινοβολία και UV ή η παρουσία ανώμαλων ενδιάμεσων δομών στη χρωματίνη κατά την επιδιόρθωση βλαβών) το p53 αρχίζει να συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά και να ενεργοποιείται. Άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν την ενεργοποίηση του p53 είναι η υποξία, η μείωση του αποθέματος νουκλεοτιδίων, το θερμοκρασιακό σοκ, παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση (ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου) και η ογκογονιδιακή υπερδιέγερση.

Στην εικόνα 1.10 παρουσιάζονται σχηματικά οι βασικοί ρόλοι της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Όπως φαίνεται, οι ρόλοι αυτοί εστιάζονται κατά κύριο λόγο στην ενεργοποίηση των βασικών σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, τα οποία θα συζητηθούν στη συνέχεια (βλ. Κεφ. Α.2.6).

Εικόνα 1.10: Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση τόσο του G1/S όσο και του G2/M σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ύστερα από πρόκληση βλαβών στο DNA. Επιπλέον, εμπλέκεται και στην επαγωγή άλλων βασικών κυτταρικών διεργασιών, όπως η απόπτωση και η κυτταρική γήρανση (τροποποιημένη εικόνα από βιβλίο: “Cell Cycle Checkpoints”, Mikhail Blagosklonny, 2001)(πιο αναλυτικά, βλ. «Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου», κεφ. Α.2.6).

A.2.5 γ Η πρωτεΐνη Geminin: ένας ιδιαίτερος αναστολέας του κυτταρικού κύκλου με πολυλειτουργική δράση και ξεχωριστή βιολογική σημασία

- Γενικά

Η Geminin, είναι μία μικρή πρωτεΐνη (~25KDa) με κύριο ρόλο την αναστολή του κυτταρικού κύκλου των ανώτερων ευκαρυωτών, μέσω δέσμευσής της στον παράγοντα αδειοδότησης της χρωματίνης, Cdt1 (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Εκτός, όμως, από το ρόλο της ως αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, η Geminin εμπλέκεται και σε άλλες σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως στην εμβρυική ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση.

Η Geminin ανακαλύφθηκε στον *Xenopus* σε πείραμα σάρωσης γονιδίων για ανεύρεση πρωτεολυτικών στόχων του συμπλόκου APC/C (McGarry and Kirschner, 1998). Στο αμινοτελικό της άκρο (αμινοξέα 33-41 στον *Xenopus*) φέρει μία αλληλουχία 9 αμινοξέων στην οποία οφείλεται η ουβικουιτίνιο-εξαρτώμενη πρωτεόλυσή της από το APC/C, η οποία καλείται «μοτίβο καταστροφής» (destruction box) (McGarry and Kirschner, 1998). Ονομάστηκε «δίδυμη» («Gemini») αρχικά επειδή βρέθηκαν δύο μορφές αυτής στον *Xenopus* (Geminin H, Geminin L), ενώ πλέον η ονομασία της σηματοδοτεί και τον διττό ρόλο που γνωρίζουμε ότι η πρωτεΐνη κατέχει: ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αλλά και επαγωγή νευρογένεσης. Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε ότι ορθόλογα της Geminin απαντώνται μόνο στους ανώτερους εξελικτικά οργανισμούς (μετάζωα), όπως στον *C. elegans*, στη *Drosophila*, στους ιχθύες, στον ποντικό, στον άνθρωπο (McGarry and Kirschner, 1998; Quinn et al., 2001), ενώ προόσφατες εργασίες πιθανολογούν την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης (μεταγραφικό παράγοντα) στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, με παρόμοια λειτουργία με τη Geminin χωρίς, όμως, σχετιζόμενη αλληλουχία με αυτήν (Caro and Gutierrez, 2007; Wildwater et al., 2007). Η Geminin αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μέσω μιας κεντρικής περιοχής (αμινοξέα 112-147 της hGeminin) όπου εδράζεται ένα μοτίβο σπειροειδούς σπειράματος (coiled-coil) (Okorokov et al., 2004; Thepaut et al., 2002). Δεν αποκλείεται ορθόλογα αυτής να υπάρχουν και σε κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αλλά οι αλληλουχίες τους να είναι τόσο ελάχιστα συντηρημένες που να μην μπορούν να ταυτοποιηθούν. Από την άλλη, η ύπαρξη της μόνο σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ίσως να υποδηλώνει ότι το σύστημα «Cdt1-Geminin» αποκτά βαρύτητα ειδικά σε εκείνους, συνιστώντας έναν εξαιρετικά συντηρημένο μηχανισμό ρύθμισης του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, και της ισορροπίας αυτών, κατά την πολύπλοκη διαδικασία της εμβρυικής ανάπτυξης (Lygerou and Nurse, 2000).

- Κύριος ρόλος της Geminin

Όσον αφορά στη βιολογική σημασία της Geminin, τα πρώτα πειράματα υπερέκφρασής της σε έμβρυα του *Xenopus* (McGarry and Kirschner, 1998) έδειξαν ότι η κύρια δράση της Geminin εστιάζεται στην αναστολή της διαδικασίας της έναρξης της αντιγραφής (κι όχι της επιμήκυνσης της σύνθεσης του DNA), στη διαδικασία δηλαδή συγκρότησης του προαντιγραφικού συμπλόκου. Συγκεκριμένα, αναστέλλει την πρόσδεση των MCM στην χρωματίνη, ενώ ο Cdc6 συνδέεται κανονικά. Πειράματα σε *Xenopus* έδειξαν ότι η Geminin αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη με τρόπο που εξαρτάται από το Cdt1, άρα φαίνεται να αναστέλλει τη δράση του απευθείας πάνω στις αφετηρίες της αντιγραφής. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων πειραμάτων (Blow and Tada, 2000; Wohlschlegel et al., 2000) που έδειξαν ότι μεταξύ Geminin και Cdt1 υπάρχει και φυσική αλληλεπίδραση, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η Geminin αναστέλλει την έναρξη της αντιγραφής αναστέλοντας τον Cdt1, ο οποίος αποδεικνύεται ο κρισιμότερος ίσως παράγοντας αδειοδότησης στα ανώτερα ευκαρυωτικά (Lygerou and Nurse, 2000).

Το γονίδιο της Geminin, όπως και του Cdt1, φέρει σημεία πρόσδεσης των E2F μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή της, ωστόσο, λίγες είναι οι γνώσεις μας σχετικά με τη ρύθμισή της από το συγκεκριμένο μεταγραφικό κύκλωμα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Κατά κύριο λόγο ρυθμίζεται μέσω πρωτεόλυσης, διατηρώντας ένα περίπου σταθερό ρυθμό μεταγραφής σε διαιρούμενα κύτταρα θηλαστικών κατά τη διάρκεια ενός φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου (παρουσιάζει μια ελάχιστη αύξηση στη μετάβαση από την G1 στην S) (Kulartz et al., 2003; Markey et al., 2004; Yoshida et al., 2005). Η πρωτεΐνη συσσωρεύεται από την S φάση (οπότε και σταματά η πρωτεόλυσή της από το APC/C) έως και τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση (τέλος μίτωσης), οπότε και γίνεται ξανά στόχος του APC/C. Η απουσία της Geminin καθόλη τη διάρκεια της G1, σε συνδυασμό με χαμηλή CDK ενεργότητα κατά το διάστημα αυτό, ευνοεί τη συγκρότηση του προαντιγραφικού συμπλόκου στις αφετηρίες της αντιγραφής, κι επομένως, την αδειοδότηση της αντιγραφής. Η Geminin, επομένως, δρα ως «δικλείδα ασφαλείας» αναστέλλοντας την αδειοδότηση νέων αφετηριών ή αφετηριών που μόλις πυροδοτήσαν μετά την έναρξη της S. Έτσι, αποφεύγονται φαινόμενα επαναδειοδότησης κι επαναντιγραφής του DNA μέσα στον ίδιο κύκλο αντιγραφής. Εκτός από τον πρωτεολυτικό και τον μεταγραφικό, έχουν περιγραφεί πρόσφατα και άλλοι τρόποι ρύθμισης του μορίου της Geminin, όπως για παράδειγμα, μέσω αλλαγής της ενδοκυτταρικής της εντόπισης (Boos et al., 2006; Luo et al., 2007; Δημάκη, 2008 M, Διδακτορική Διατριβή), αλλά και μέσω ουβικουιλίωσης του μορίου, η οποία αναστέλλει την ενεργότητά της χωρίς να την οδηγεί για πρωτεόλυση από το πρωτεάσωμα (Hodgson et al., 2002; Tachibana et al., 2005).

1. Εισαγωγή

- Geminin: ένα ξεχωριστό μόριο με πολλαπλούς ρόλους

Η Geminin δεν αποτελεί μια κλασσική περίπτωση αναστολέα του κυτταρικού κύκλου. Μία ασυνήθιστη συμπεριφορά της είναι ότι, παρόλο που είναι ο αναστολέας του Cdt1 και έχει ταυτοποιηθεί η φυσική τους αλληλεπίδραση, δεν έχει αποδειχτεί ποτέ έως σήμερα η συνέκφραση των δύο στα ίδια κύτταρα (Nishitani et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι ο ρόλος της είναι αρνητικός στη διαδικασία της αδειοδότησης και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, θα περίμενε κανείς να υπερεκφράζεται ως επί το πλείστον σε κύτταρα μη διαιρούμενα ή που βρίσκονται εκτός κυτταρικού κύκλου, όπως συμβαίνει με τους υπόλοιπους τυπικούς αναστολείς, πχ. p21^{waf1/cip1}, p16^{Ink4A} και p53. Ωστόσο, φαίνεται ότι η έκφραση της Geminin χαρακτηρίζει αποκλειστικά διαιρούμενα κύτταρα, ενώ ρυθμίζεται αρνητικά σε κύτταρα που εγκαταλείπουν τον κυτταρικό κύκλο για να εισέλθουν σε φάση ηρεμίας (G0) (Wohlschlegel et al., 2002).

Εκτός του ρόλου της στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η Geminin εμπλέκεται και σε διεργασίες διαφοροποίησης. Πρόκειται για πρωτεΐνη με νευρογενετική δράση (Kroll et al., 1998; Quinn et al., 2001), ενώ πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν την αλληλεπίδρασή της με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το Six3, μέσω των οποίων ρυθμίζει τη διαφοροποίηση της ίριδας του ματιού των σπονδυλωτών (Del Bene et al., 2004). Η Geminin, συγκεκριμένα, δρα ανταγωνιστικά του Six3 για τη δέσμευση στο Cdt1, και φαίνεται πως στον ανταγωνισμό αυτό στηρίζεται η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης κατά την ανάπτυξη του ματιού των σπονδυλωτών (Del Bene et al., 2004). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η Geminin αλληλεπιδρά τόσο με μορφογενετικούς μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας των homeobox-πρωτεϊνών Hox (Luo et al., 2004), όσο και με μέλη της οικογένειας των polycomb πρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές απομακρύνουν την Geminin από το Cdt1 ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό, ενώ αναστέλει τη λειτουργία των Hox πρωτεϊνών (ως μεταγραφικών παραγόντων) προσδεδεμένη σε αυτές (Li and Rosenfeld, 2004; Luo et al., 2004). Τέλος, αλληλεπιδρά και με συστατικά του συμπλόκου αναδιοργάνωσης της χρωματίνης SWI/SNF, τις πρωτεΐνες Brg1/Brm. Τα προνευρικά γονίδια που επάγουν νευρογένεση έχει βρεθεί ότι απαιτούν τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών του συμπλόκου SWI/SNF στους υποκινητές τους για την τοπική αναδιοργάνωση της χρωματίνης, το οποίο γίνεται μέσω προσέγκυσης της καταλυτικής του υπομονάδας Brg1 (Seo et al., 2005). Η Geminin αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Brg1 και δεν της επιτρέπει να αλληλεπιδράσει με υποκινητές προνευρικών γονιδίων για να επάγει -σε συνεργασία με τις bHLH πρωτεΐνες NeuroD και Ngn- τη μεταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλεται η νευρική διαφοροποίηση πρόδρομων νευρικών κυττάρων (Aigner and Gage, 2005; Seo et al., 2005).

A.2.6 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (*checkpoints*)

Η διατήρηση της γενωμικής ακεραιότητας είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου *απαρτίζονται* από μοριακές σηματοδοτικές οδούς οι οποίες ελέγχουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου και *αντιλαμβάνονται* τυχόν βλάβες, προάγοντας την προσωρινή ή μόνιμη παύση του κυτταρικού κύκλου (Hartwell et al., 1974; Painter and Young, 1980). Βλάβες στο DNA οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών κυτταρικής απόκρισης (εικόνα 1.11) που εξαρτώνται από τη φύση και την έκταση της βλάβης, αλλά και τη φάση του κυτταρικού κύκλου.

Κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις ή στερούνται των συστατικών των σημείων ελέγχου, επιβιώνουν ευκολότερα παρουσία σημαντικών βλαβών ή έντονης μιτογονικής διέγερσης (τα οποία υπό άλλες συνθήκες θα οδηγούσαν το κύτταρο στον θάνατο), τελικά, όμως, παρουσιάζονται επιρρεπή σε γενωμική αστάθεια και κακοήγη εξαλλαγή (Massague, 2004). Τελευταία, τα σημεία ελέγχου που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε **βλάβες στο DNA**, και συγκεκριμένα σε διπλές θραύσεις στο DNA, έχουν συσχετιστεί με μονοπάτια που ενεργοποιούνται σε πολύ **πρώιμα στάδια** της **καρκινογένεσης** αλλά με εκείνα που φαίνεται να ενεργοποιούνται κατά την πορεία της **κυτταρικής γήρανσης** (βλ.κεφ. B.5.2 και εικόνα 1.11).

Εικόνα 1.11: Κυτταρικές αποκρίσεις στην πρόκληση βλαβών στο DNA ύστερα από την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων, ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης. Οι αποκρίσεις αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν ενεργοποίηση κάποιου σημείου ελέγχου, ενεργοποίηση ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού προγράμματος, ενεργοποίηση μονοπατιών επιδιόρθωσης των βλαβών, επαγωγή της γήρανσης ή της απόπτωσης σε περίπτωση

1. Εισαγωγή

που η βλάβη είναι εκτεταμένη ή μη επιδιορθώσιμη (τροποποιημένη εικόνα από R&D systems 2003 online catalog).

Τα κυριότερα σημεία ελέγχου για απόκριση στις βλάβες στο DNA είναι (εικόνα 1.12):

- 1) **το σημείο ελέγχου G1/S,**
- 2) **το σημείο ελέγχου στη φάση S,**
- 3) **το σημεία ελέγχου G2/M.**

Αρχικό βήμα για την ενεργοποίηση των παραπάνω μονοπατιών είναι η αναγνώριση των περιοχών του DNA που έχουν υποστεί βλάβες. Οι απλές (Single Strand Breaks ή SSBs) και οι διπλές θραύσεις (Double Strand Breaks ή DSBs) του DNA αναγνωρίζονται από διαφορετικά πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα (πρωτεΐνες-αισθητήρες) τα οποία συσσωρεύονται στις περιοχές των βλαβών. Τέτοια είναι η πρωτεΐνες RPA, Rad17 και το σύμπλοκο 9-1-1 (Rad9/Hus1/Rad1) (Niida and Nakanishi, 2006; Parrilla-Castellar et al., 2004) για τις απλές θραύσεις και το σύμπλοκο MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) για τις διπλές θραύσεις στο DNA (Lee and Paull, 2005; Petrini and Stracker, 2003). Κεντρική θέση στην ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών απόκρισης στις βλάβες του DNA (DNA Damage Response ή DDR) κατέχουν οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης ATM και ATR (πρωτεΐνες-διαβιβαστές του σήματος της βλάβης) (Abraham, 2001; Shiloh, 2001), καθώς και η πρωτεΐνη p53 (βλ.κεφ Α.2.5β). Η κινάση ATM ανταποκρίνεται κυρίως στις διπλές θραύσεις του DNA, ενώ η ATR στις απλές θραύσεις καθώς και σε «ανώμαλες δομές» του DNA ή σε σταματημένες διχάλες αντιγραφής. Τα υποστρώματα αυτών, κατόπιν ενεργοποίησής τους, διαμεσολαβούν την παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1, την S ή την G2 φάση αντίστοιχα, ενώ επιπλέον εμπλέκονται στην ενεργοποίηση μονοπατιών επιδιόρθωσης των βλαβών και της απόπτωσης (εικόνα 1.12) (Bakkenist and Kastan, 2004; Melixetian et al., 2004; Shiloh, 2001). Συχνή κατάληξη των μονοπατιών αυτών είναι η αναστολή της ενεργότητας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως ενεργοποίηση των αναστολέων CKI, μη αφαίρεση της αδρανοποιητικής φωσφορικής ομάδας των CDK, καταστροφή των κυκλινών ή έξοδος στο κυτταρόπλασμα των συμπλόκων κινασών-κυκλινών.

Πιο αναλυτικά:

- **Σημείο ελέγχου G1/S:** Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου αποτρέπει κύτταρα με βλάβες στο DNA να εισέλθουν σε φάση S (Melixetian et al., 2004). Βασικής σημασίας για την ενεργοποίηση του G1/S σημείου ελέγχου είναι η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 από τις κινάσες ATM/ATR (εικόνα 1.12). Το p53, που φυσιολογικά βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα

1. Εισαγωγή

εξαιτίας της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Mdm2, ενεργοποιείται μέσω των κινασών $ATM \rightarrow Chk2$ (Matsuoka et al., 2000) κι αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή του με την Mdm2 συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά. Πρόσθετες φωσφορυλιώσεις σε διαφορετικά κατάλοιπα του p53 (από τις κινάσες ATM/ATR) ενεργοποιούν τον p53 ως μεταγραφικό παράγοντα (Dumaz and Meek, 1999), με αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής ποικίλων γονιδίων, πολλά εκ των οποίων εμπλέκονται στα μονοπάτια απόκρισης στις βλάβες του DNA (πχ. Mdm2, GADD45a, p21^{Cip1/Waf1}). Η συσσώρευση του p21^{Cip1/Waf1} στοχεύει τελικά τα σύμπλοκα Cdk2/κυκλίνης E που δραστηριοποιούνται προς το τέλος της G1 φάσης, προκαλώντας παύση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο αυτό (Melixetian et al., 2004).

- **Σημείο ελέγχου στη φάση S:** Το συγκεκριμένο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καθυστερεί ή σταματά την εξέλιξη της φάσης S σε περίπτωση βλάβης στο DNA (Melixetian et al., 2004). Μελέτες της επίδρασης ιονίζουσας ακτινοβολίας (IR) σε κύτταρα έδειξαν τη συμμετοχή της κινάσης ATM και της πρωτεΐνης Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome-1) στο συγκεκριμένο σημείο ελέγχου. Η ενεργοποίησή του μπορεί γίνει μέσω δύο σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία απαιτούν και τα δύο την κινάση ATM (Falck et al., 2002; Kim et al., 2002; Steinborn et al., 2002) (εικόνα 1.12). Στο πρώτο μονοπάτι, η βλάβη (κυρίως διπλές θραύσεις στο DNA) από την ακτινοβολία στοχεύει τη φωσφατάση Cdc25A για πρωτεόλυση (Falck et al., 2001; Mailand et al., 2000), κατόπιν φωσφορυλίωσής της από τις πρωτεΐνες $ATM \rightarrow Chk2$ (Hsu et al., 2002). Απουσία της Cdc25A, η Cdk2 παραμένει υπό καταστολή λόγω της αδρανοποιητικής φωσφορικής ομάδας που φέρει (Falck et al., 2001), με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργότητας των συμπλόκων Cdk2/κυκλίνης E και Cdk2/κυκλίνης A και την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Εναλλακτικά, η ακτινοβολία IR ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες ATM/Nbs1 (Falck et al., 2002; Kim et al., 2002; Steinborn et al., 2002), κι αυτές εν συνεχεία φωσφορυλιώνουν μια σειρά υποστρωμάτων, μεταξύ των οποίων το BRCA1, BRCA2, FANCD2 και SMC1, τα οποία, με διαφορετικό τρόπο δράσης, καθυστερούν την εξέλιξη της φάσης S. Και η κινάση ATR δείχνει ικανή να προάγει την καθυστέρηση της S φάσης, κυρίως ως απόκρισης σε βλάβες από UV ακτινοβολία ή λόγω ύπαρξης ενδιάμεσων ανώμαλων δομών της χρωματίνης κατά την αντιγραφή (Abraham, 2001).
- **Σημείο ελέγχου G2/M:** Το συγκεκριμένο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου παρακολουθεί την εξέλιξη των γεγονότων κατά την G2 και μέχρι πριν τον αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά τη μίτωση. Κύριος στόχος του σημείου ελέγχου G2/M είναι η κινάση Cdk1 που είναι υπεύθυνη

1. Εισαγωγή

για την είσοδο των κυττάρων στη μίτωση (Blow and Nurse, 1990). Οι κινάσες ATM/ATR δραστηριοποιούνται και πάλι για τη διατήρηση της αδρανοποιητικής φωσφορικής ομάδας επί της Cdk1 και την παρεμπόδιση εισόδου στη μίτωση (μέσω στόχευσης της Cdc25C) (Peng et al., 1997). Σε αντίθεση με τα άλλα σημεία ελέγχου, η αντιμετώπιση των βλαβών ύστερα από επίδραση IR ακτινοβολίας (καθώς και UV ακτινοβολίας ή η ύπαρξη ανώμαλων ενδιάμεσων αντιγραφικών δομών) διαμεσολαβείται πρωτίστως από την ATR και δευτερευόντως από την ATM κινάση (Graves et al., 2000). Οι κινάσες Chk1/Chk2 φωσφορυλιώνοντας την φωσφατάση Cdc25C, δημιουργούν σημείο δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών, οι οποίες την κατευθύνουν στο κυτταρόπλασμα. Όλα τα παραπάνω συγκρατούν το σύμπλοκο Cdk1/κυκλίνης B σε ενεργή μορφή, αναστέλοντας τη μετάβαση στη μίτωση.

Εικόνα 1.12: Τα κυριότερα σημεία ελέγχου για την απόκριση σε βλάβες στο DNA ύστερα από την επίδραση κάποιου γενοτοξικού παράγοντα. Μέσω των ATM (Ataxia telangiectasia mutated) και ATR (ATM and Rad3-related) πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης-θρεονίνης γίνεται η φωσφορυλίωση πληθώρας υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ενεργότητα, η σταθερότητα ή η ενδοκυτταρική τους εντόπιση. Με αυτόν τον τρόπο

1. Εισαγωγή

ενεργοποιούνται σηματοδοτικές οδοί που τελικά θα σταματήσουν ή θα καθυστερήσουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (τροποποιημένη εικόνα από R&D systems 2003 online catalog).

A.2.7 Μηχανισμοί για την αποφυγή της επαναντιγραφής (rereplication) του γονιδιώματος

Η έρευνα στον τομέα της βιολογίας του καρκίνου τα τελευταία χρόνια έχει αναδείξει μηχανισμούς με τους οποίους τα κύτταρα καταφέρνουν να διαφυλάξουν τη γονιδιωματική τους σταθερότητα και να μεταβιβάσουν με ακεραιότητα το γενετικό τους υλικό. Όπως προαναφέρθηκε, η αντιγραφή μόνο μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο εξασφαλίζεται τη συναρμολόγηση κι αποσυναρμολόγηση των προαντιγραφικών συμπλόκων (pre-RC) στις αφετηρίες της αντιγραφής (αδειοδότηση). Οι κινάσες CDK και DDK διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση των συμπλόκων και την πυροδότηση της αντιγραφής του DNA. Τρεις είναι οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που εξασφαλίζουν ότι δεν θα λάβει χώρα επαναδειοδότηση της αντιγραφής μέσα στον ίδιο κυτταρικό κύκλο: αρνητική ρύθμιση των συστατικών του προαντιγραφικού συμπλόκου μέσω CDKs, πρωτεόλυση μέσω των συστημάτων APC/C και SCF και η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ Cdt1 – Geminin. Οι μηχανισμοί αυτοί, δρώντας συντονισμένα κι αλληλοεξαρτώμενα, στοχεύουν με την έναρξη της αντιγραφής τα μέλη των προαντιγραφικών συμπλόκων με σκοπό να τα απενεργοποιήσουν. Η απενεργοποίηση αυτή κρατά έως ότου το κύτταρο να περάσει και πάλι από μίτωση.

- Ο ρόλος των CDKs

Η περιοδική μεταβολή της ενεργότητας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών έχει καθοριστικό ρόλο στη χρονικότητα του σχηματισμού του προαντιγραφικού συμπλόκου. Η αδειοδότηση, η οποία αποτελεί προϋπόθεση για την έναρξη της αντιγραφής, συμβαίνει μόνο μετά τη μίτωση και καθόλη τη διάρκεια της G1, όταν η ενεργότητα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών είναι χαμηλή. Κατά την G1/S, όταν γίνεται η πυροδότηση της αντιγραφής, η S-CDK ενεργότητα είναι πλέον αυξημένη, προκαλώντας τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση των μελών του προαντιγραφικού συμπλόκου, εξασφαλίζοντας ότι οι MCMs δεν θα μπορέσουν να προσδεθούν ξανά στις αφετηρίες για να αδειοδοτήσουν τη χρωματίνη μέσα στον ίδιο κύκλο. Η ρύθμιση των επιμέρους συστατικών του προαντιγραφικού συμπλόκου ύστερα από τη δράση των CDKs κατά την είσοδο στην S γίνεται με ποικίλους τρόπους στα διάφορα είδη (εικόνα 1.13).

Εικόνα 1.13: Διάφοροι μηχανισμοί μετα-μεταφραστικής τροποποίησης πρωτεϊνών επιστρατεύονται από τα κύτταρα διαφορετικών ειδών για τη ρύθμιση των μελών των pre-RCs μετά την πυροδότηση της αντιγραφής: φωσφορυλίωση (P), πρωτεόλυση (κόκκινο X), αλλαγή ενδοκυτταρικής εντόπισης (μαύρα βέλη) και αναστολή μέσω αλληλεπίδρασης με ειδικό αναστολέα (Geminin). Η βασική αρχή, ωστόσο, παραμένει η ίδια: με την είσοδο στη φάση S, τα μέλη του προαντιγραφικού συμπλόκου παύουν να είναι διαθέσιμα ή λειτουργικά, ενώ κινητήριο μοχλό σε όλες τις περιπτώσεις αποτελεί η αύξηση της ενεργότητας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που λαμβάνει χώρα ακριβώς κατά το συγκεκριμένο χρονικό «παράθυρο» της μετάβασης από την G1 στην S. Εκτός από τη δράση των CDKs, σημαντικός είναι ο ρόλος της πρωτεόλυσης αλλά και της πρωτεΐνης Geminin (εικόνα από Kearsay S, *et al.*)(Kim *et al.*, 2003)).

Το γεγονός ότι η απενεργοποίηση της μιτωτικής κινάσης CDK1 σε κύτταρα που βρίσκονται στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου ή στη μίτωση επάγει την άμεση στρατολόγηση των ORC και των πρωτεϊνών MCM στη χρωματίνη και συνεπώς την πρόωρη αδειοδότηση (Ballabeni *et al.*, 2004; Broek *et al.*, 1991; Coverley *et al.*, 1996; Coverley *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1998; Hayles *et al.*, 1994; Li and Blow, 2004; Nishitani *et al.*, 2006), καταδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο της υψηλής ενεργότητας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών στην αποφυγή φαινομένων επαναντιγραφής του DNA. Στον μύκητα *S. cerevisiae*, η αναστολή της ρύθμισης των πρωτεϊνών ORC, MCM και Cdc6 από τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, οδηγεί σε μερική μόνο επαναντιγραφή του γονιδιώματος, γεγονός που δείχνει ότι η δράση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών δεν είναι για όλους τους οργανισμούς ο κύριος μηχανισμός αποφυγής φαινομένων επαναντιγραφής (Blow and Hodgson, 2002; Chiang *et al.*, 2006).

- Ο ρόλος των E3 λιγασών της ουβικουΐτινης (APC και SCF) και της πρωτεόλυσης

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η άρτια εναλλαγή των φάσεων του στηρίζεται στην περιοδικότητα της ενεργότητας των κυκλινεξαρτώμενων κινασών (Nakayama and Nakayama, 2006). Αυτή σε ένα μεγάλο βαθμό οφείλεται στη συντονισμένη δράση δύο πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων E3 λιγασών της ουβικουΐτινης, του APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) και του SCF (Skp-Cullin-E box), τα οποία, μεταξύ άλλων, στοχεύουν για πρωτεόλυση κυκλίνες και αρνητικούς ρυθμιστές (CKIs) του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 1.14).

Εικόνα 1.14: Τα δύο σύμπλοκα E3 λιγασών της ουβικουΐτινης, APC/C και SCF, με την περιοδική αυξομείωση της ενεργότητάς τους συντονίζουν το διαθέσιμο μοριακό ρεπερτόριο της κάθε φάσης του κύκλου, συμβάλλοντας στη σωστή εναλλαγή των φάσεων αλλά και στην αδειοδότηση της χρωματίνης μονάχα μετά το πέραςμα από τη μίτωση (τροποποιημένη εικόνα από «Kimball Biology Pages», www.biology.kenyon.edu).

1. Εισαγωγή

Το APC/C δρα κατά την είσοδο στη μίτωση (ενεργοποιείται από τις ίδιες τις μιτωτικές κυκλίνες), εξασφαλίζοντας την έξοδο από αυτήν και την προώθηση του κύκλου στην G1, όπου λαμβάνει χώρα η αδειοδότηση της χρωματίνης για αντιγραφή. Αυτό γίνεται με τη στόχευση των κυκλινών της S φάσης (κυκλίνες A) και των μιτωτικών κυκλινών (κυκλίνες B), καθώς και του ειδικού αναστολέα της αδειοδότησης, Geminin (Diffley, 2004). Το APC/C δρα καθόλη τη διάρκεια της G1, στοχεύοντας μεταξύ άλλων, την Geminin (McGarry and Kirschner, 1998). Πρόσφατα βρέθηκε ότι επιπλέον ρόλος του APC/C είναι η στόχευση, κατά τη διάρκεια της G1, της πρωτεΐνης Skp2 (Bashir et al., 2004). Το Skp2 είναι μέλος του SCF συμπλόκου το οποίο πρωτεολύοντας κατά το τέλος της G1 τα κατάλληλα υποστρώματα -κυρίως μέλη του προαντιγραφικού συμπλόκου- προάγει την είσοδο στη φάση S. Έτσι, με τη δράση του APC/C καθόλη την G1 αποτρέπεται η πρόωρη είσοδος των κυττάρων στην S κι εξασφαλίζονται οι προϋποθέσεις (κυρίως η απουσία της Geminin) για επαρκή αδειοδότηση. Ανάμεσα στους στόχους του APC/C δεν συγκαταλέγεται η G1-ενεργότητα κίνησης, δηλ. τα σύμπλοκα Cdk4/6- κυκλινών D, τα οποία ανταποκρίνονται και ρυθμίζονται πρωτίστως από την παρουσία μιτογόνων ερεθισμάτων.

Κατά το τέλος της G1 και την είσοδο στη φάση S, το APC/C απενεργοποιείται εξαιτίας της δράσης της πρωτεΐνης Emi1 αλλά και της αύξησης της ενεργότητας των G1 κυκλινεξαρτώμενων κινασών (Hsu et al., 2002; Sivaprasad et al., 2007; Zachariae and Nasmyth, 1999), επιτρέποντας την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων της Geminin και της κυκλίνης A (Hsu et al., 2002). Με την απενεργοποίηση του APC/C κατά την είσοδο στην S, η πρωτεΐνη Skp2 συσσωρεύεται και το σύμπλοκο SCF^{Skp2} ενεργοποιείται (Bashir et al., 2004; Wei et al., 2004). Η ενεργοποίηση του συμπλόκου SCF στο σημείο αυτό είναι καταλυτική για την αποφυγή επαναντιγραφής του DNA: από τη μια πρωτεολύει μέλη του προαντιγραφικού συμπλόκου, όπως το Cdt1 και την πρωτεΐνη Orc1, για να μην επιτρέψει την επανασυγκρότηση προαντιγραφικών συμπλόκων στον ίδιο κύκλο αντιγραφής, και από την άλλη στοχεύει τις G1-κυκλίνες καθώς και αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (πχ. p27) που δρούσαν προηγουμένως κατά την G1 (εικόνα 1.14) (Fujita et al., 2002; Mendez et al., 2002; Nishitani et al., 2006; Perkins et al., 2001; Zhu et al., 2004). Επομένως, οι συντονισμένες δράσεις του APC/C και του SCF καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή επαναδειοδότησης κι επαναντιγραφής του DNA (Sivaprasad et al., 2007).

Τέλος, είναι γνωστό ότι μέσω πρωτεόλυσης ρυθμίζονται πολλά μέλη του προαντιγραφικού συμπλόκου και πολλοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Fujita, 2006; Nakayama and Nakayama, 2006). Ειδικά, όμως, για τον παράγοντα Cdt1, αυτού του είδους η ρύθμιση συμβαίνει με τη διαμεσολάβηση διαφορετικών πρωτεολυτικών συμπλόκων E3 λιγασών της ουβικουιτίνης, τόσο κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου, όσο και μετά από πρόκληση βλαβών στο

1. Εισαγωγή

DNA (εικόνα 1.15) (Fujita, 2006; Senga et al., 2006). Η αναγκαιότητα ύπαρξης πολλών διαφορετικών μηχανισμών ρύθμισης των επιπέδων του Cdt1, αναδεικνύει τον τελευταίο, ως τον βασικότερο, ίσως, παράγοντα στην προσπάθεια αποφυγής επαναντιγραφής του DNA. Πράγματι, υπερέκφραση του Cdt1 σε ανθρώπινα κύτταρα που στερούνταν του p53, είχε ως αποτέλεσμα μερική επαναντιγραφή του γονιδιώματος (Vaziri et al., 2003). Ομοίως, σταθεροποίηση των επιπέδων του Cdt1 στον *C. elegans* οδήγησε σε έντονα φαινόμενα επαναντιγραφής (Zhong et al., 2003), ενώ αντίστοιχα πειράματα στον *S. pombe* οδήγησαν σε εκτεταμένη επαναντιγραφή του DNA, αυτή τη φορά με τη συνδρομή του Cdc18 (Cdc6) (Gopalakrishnan et al., 2001; Nishitani et al., 2000; Yanow et al., 2001).

Εικόνα 1.15: Τα τρία (3) είδη E3 λιγασών της ουβικουιτίνης που εμπλέκονται στα διαφορετικά μονοπάτια ρύθμισης μέσω πρωτεόλυσης του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 στα κύτταρα των θηλαστικών, και τα σημεία πάνω στο μόριο του Cdt1 μέσω των οποίων γίνεται η στόχευσή του στην κάθε περίπτωση. Επιπρόσθετο μηχανισμό αποτελεί η αναστολή της δράσης του μέσω της πρωτεΐνης Geminin σε μια πιο καρβοξυτελική περιοχή του μορίου. Με *D-box συμβολίζονται τα μοτίβα αποικοδόμησης (destruction boxes) του μορίου, οι περιοχές, δηλαδή, που αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο APC/C^{Cdh1} (εικόνα από Fujita M.*et al.* (Fujita, 2006)).

- Ο ρόλος της Geminin

Ο ρόλος της πρωτεΐνης Geminin στην αποτροπή της επαναντιγραφής του DNA, εστιάζεται στην αναστολή του Cdt1 μετά την έναρξη της S φάσης μέχρι και το πέρας της μίτωσης. Η συμβολή της Geminin στη διασφάλιση της γονιδιωματικής σταθερότητας των κυττάρων φαίνεται από τα αποτελέσματα πειραμάτων γενετικής παρεμβολής του RNA της (RNAi)(εικόνα 1.16).

1. Εισαγωγή

Γενετική απενεργοποίηση του γονιδίου της Geminin στο ποντίκι οδήγησε σε πρόωμο εβρικό θάνατο, ενώ τα κύτταρα εμφάνιζαν έντονα χαρακτηριστικά υπερδιπλασιασμού του γονιδιώματος και βλαβών στο DNA (Gonzalez et al., 2006; Hara et al., 2006). Σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειών, αποσιώπηση της Geminin με χρήση της τεχνολογίας RNAi, οδήγησε σε επαναντιγραφή του γονιδιώματος (μερική ή ολική), μεγέθυνση πυρήνων και πρόκληση βλαβών στο DNA, ανεξάρτητα της παρουσίας ή όχι του p53, σε ανθρώπινα πρωτογενή ή καρκινικά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος φάνηκε να εξαρτάται από τον παράγοντα αδειοδότησης Cdt1, αφού συν-αποσιώπηση αυτού μετρίασε τις συνέπειες της απώλειας της Geminin από τα κύτταρα (Melixetian et al., 2004; Zhu et al., 2004). Τέλος, η απώλεια της Geminin δείχθηκε ότι προκαλεί ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος σε μονοπάτια απόκρισης σε βλάβες κατά την αντιγραφή (ενεργοποίηση κυρίως των ATR/Chk1 και δευτεροευόντως των ATM/Chk2) (Lin and Dutta, 2007; Melixetian et al., 2004; Zhu et al., 2004). Αξιοσημείωτο είναι, τέλος, το γεγονός ότι ανάλογο φαινότυπο με αυτόν της αποσιώπησης της Geminin λαμβάνουμε και ύστερα από υπερέκφραση του παράγοντα Cdt1 (εικόνα 1.16). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, διαπιστώνουμε πόσο κρίσιμο αποδεικνύεται το **ενδοκυτταρικό ισοζύγιο** των πρωτεϊνών Cdt1~Geminin και πόσο η διατάραξή του, προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση, μπορεί να προσβάλει τη γονιδιωματική σταθερότητα των κυττάρων.

Διατάραξη επιπέδων Cdt1~Geminin	οργανισμός	φαινότυπος
<p>↑ Cdt1</p>	Fission yeast (<i>S.pombe</i>)	• Εκτοπική έκφραση του Cdt1 στην G2 οδηγεί σε επανααδειοδότηση κι επαναντιγραφή
	<i>C. elegans</i>	• υπερέκφραση μιας μορφής του Cdt1 που δεν μπορεί να πρωτοαλυθεί οδηγεί σε πολλαπλούς γύρους αντιγραφής
	Κύτταρα θηλαστικών	• υπερέκφραση του Cdt1 οδηγεί σε επαναντιγραφή κι ενεργοποίηση των ATM/ATR και p53-εξαρτούμενων σημείων ελέγχου
	Drosophila	• κύτταρα NIH3T3 που υπερεκφράζουν Cdt1 προκαλούν λεμφοβλαστικά λεμφώματα όταν ενόνται σε πολιτικά, απαισιό ενεργού p53
↓ Geminin		• Μεταλλαγμένα για Geminin στελέχη Drosophila παρουσιάζουν ιστούς με έντονη ενδοαντιγραφή (endoreplication) και φαινόμενα πολλαπλασιασμού του γονιδιώματος (DNA amplification).
	Κύτταρα θηλαστικών	• siRNA για Geminin οδηγεί σε μερική επαναντιγραφή του γονιδιώματος και γιγαντίους πυρήνες, σταματώντας τον κύκλο με τρόπο που δεν εξαρτάται από το G2/M σημείο ελέγχου (ενεργοποίηση Chk1/Chk2 μονοπατιών απόκρισης στις βλάβες του DNA)

1. Εισαγωγή

Εικόνα 1.16: Σύνοψη των αποτελεσμάτων των σπουδαιότερων πειραμάτων αποσιώπησης της Geminin ή υπερέκφρασης του Cdt1 σε διάφορους οργανισμούς, τα οποία αναδεικνύουν τη σπουδαιότητα της ενδοκυττάριας ισορροπίας της έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin.

Αντίθετα, έκφραση μιας μορφής της Geminin που δε δύναται να πρωτεολυθεί οδήγησε σε μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων και αύξηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης-ελέγχου p53 σε καρκινικά ανθρώπινα κύτταρα (Yoshida et al., 2004). Η Geminin είχε, αρχικά, χαρακτηριστεί ως πιθανή ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, λόγω αυτής ακριβώς της ιδιότητάς της να αναστέλλει την αδειοδότηση και άρα την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αποτελεί δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Montanari et al., 2006; Wharton et al., 2004), ενώ δείχνει να υπερεκφράζεται σε καρκινικές καταστάσεις: συγκεκριμένα, υπερέκφραση της Geminin, καθώς και άλλων δεικτών πολλαπλασιασμού (όπως του Ki-67 και των πρωτεϊνών MCM) έχειδειχθεί σε αρκετούς τύπους καρκίνων (εντερικού επιθηλίου, λεμφώματα Β-κυττάρων, όρχεων, μαστού, παχέος εντέρου, ολιγοδενδρογλιώματα και αστροκυτώματα), και μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις εξ αυτών η έκφρασή της φάνηκε να συμβαδίζει με την κακοήθεια και τη μεταστατικότητα (Bravou et al., 2005). Επιπλέον, υπερέκφραση της Geminin έχει καταγραφεί και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Nishitani et al., 2001) Wohlschlegel et al. 2002, (Bartkova et al., 2006; Bravou et al., 2005; Dudderidge et al., 2005; Gonzalez et al., 2004; Kulkarni et al., 2007; Montanari et al., 2005; Petropoulou et al., 2008; Salabat et al., 2008; Shrestha et al., 2007; Vargas et al., 2008; Wharton et al., 2004; Wharton et al., 2007; Wohlschlegel et al., 2002; Xouri et al., 2004).

Τέλος, μεταλλαγές σε βασικά γονίδια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, όπως του Rb και του p53, έχουνδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις καρκίνων, το ίδιο, όμως, δε φαίνεται να συμβαίνει με την Geminin: μεταλλαγμένες μορφές αυτής σε καρκινικές περιπτώσεις δεν έχουν ακόμα αναφερθεί. Η Geminin δε φαίνεται να είναι μια κλασσική ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, απώλεια της οποίας οδηγεί τα κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Δεδομένων των όσων γνωρίζουμε για την σπουδαιότητα της Geminin και τους πολλαπλούς της ρόλους, πιθανή μεταλλαγή της Geminin και πλήρης απώλεια όλων των λειτουργιών της ίσως να μην ευνοεί την επιβίωση κανενός τύπου κυττάρων, ούτε των καρκινικών.

ΜΕΡΟΣ Β΄ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

B.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα περισσότερα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού δεν βρίσκονται σε κυτταρικό κάθε χρονική στιγμή. Ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού και σύμφωνα με τα μηνύματα που δέχονται από το περιβάλλον τους, τα κύτταρα μπορεί να βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο αναπαράγοντας τον εαυτό τους, μπορεί, όμως, να έχουν αποσυρθεί προσωρινά ή μόνιμα από αυτόν έχοντας εισέλθει σε διάφορες άλλες καταστάσεις, όπως η φάση ηρεμίας η G0, η απόπτωση, η διαφοροποίηση και η γήρανση (εικόνα 1.17).

Εικόνα 1.17: Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, στα πλαίσια ενός πολύπλοκα οργανωμένου συστήματος όπως είναι οι πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, δεν είναι αυτοσκοπός. Για την επίτευξη της ομοιόστασης του οργανισμού και της εύρυθμης λειτουργίας των ποικίλων συστημάτων του, τα κύτταρα οφείλουν να υπακούουν στα έξω- και ένδο-κυττάρια μηνύματα που δέχονται, και να πράττουν ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού: αυτό μπορεί να σημαίνει είτε παραμονή σε κυτταρικό κύκλο, είτε μόνιμη ή προσωρινή έξοδος από αυτόν.

B.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Πριν 40 περίπου χρόνια, πρώτος ο Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961), με μελέτες που πραγματοποίησε σε πρωτογενείς διπλοειδείς ινοβλάστες, όρισε την κατάσταση που σήμερα καλούμε «αναπαραγωγική γήρανση», ως τη διαδικασία εκείνη κατά την οποία όλα τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού παρουσιάζουν σταδιακά μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα όταν καλλιεργούνται *in vitro* για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα αυτά πραγματοποιούν ένα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων (περίπου 50-70), το οποίο ονόμαστηκε «όριο Hayflick», πέρα από το οποίο δε δύνανται να πολλαπλασιαστούν άλλο. Οι παρατηρήσεις του Hayflick και η υπόθεσή του ότι θα πρέπει να λειτουργεί κάποιος μηχανισμός μέσα στα κύτταρα καταμέτρησης των κυτταρικών διπλασιασμών ήταν πρωτοποριακό για την εποχή του. Μέχρι τότε επικρατούσε η θεώρηση ότι τα κύτταρα είναι αθάνατα, ότι μπορούν δηλαδή να διαιρούνται επ'άπειρον σε καλλιέργεια και ο μοναδικός λόγος που αυτό δεν είναι πρακτικά εφικτό είναι η ανεπάρκεια των τεχνικών μέσων να διατηρηθούν κατά το βέλτιστο τρόπο σε καλλιέργεια (Carrel and Lindbergh, 1935; Kamijo et al., 1997).

Η γήρανση είναι μια μη αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου παρουσία μιτογονικών ερεθισμάτων («υπερμιτογονική παύση»)(Blagosklonny, 2003), γεγονός το οποίο την διακρίνει από άλλες καταστάσεις εκτός κυτταρικού κύκλου, όπως η φάση ηρεμίας ή G0. Είναι μία βιώσιμη και μεταβολικά ενεργή κατάσταση εκτός κυτταρικού κύκλου στην οποία τα κύτταρα εισέρχονται με τρόπο που δεν εξαρτάται από το θρεπτικό περιβάλλον, αλλά από άλλους, τόσο εξωγενείς όσο κι ενδογενείς παράγοντες τους οποίους θα αναλύσουμε στη συνέχεια. Έτσι, σε αντίθεση με τα κύτταρα σε φάση ηρεμίας ή G0, τα γηρασμένα κύτταρα δεν μπορούν να επανέλθουν σε κυτταρικό κύκλο με την προσθήκη μιτογονικών ή αυξητικών παραγόντων. Σύμφωνα με την «θεωρία της υπερμιτογονικής παύσης», για να επαχθεί γήρανση δύο είναι οι βασικές προϋποθέσεις: 1) να υπάρχουν ισχυρά μιτογονικά ερεθίσματα στο περιβάλλον, και 2) να ανασταλεί με οποιονδήποτε τρόπο η λειτουργικότητα των κινασών της φάσης G1 (G1-CDK), των κινασών, δηλαδή, των οποίων η λειτουργικότητα ορίζει, σύμφωνα με τα όσα είδαμε στο πρώτο μέρος της εισαγωγής, το πέρασμα από τη G1 στην S (περιοριστικό σημείο R)(βλ. κεφ. Α.2.4δ, εικόνα 1.7). Αυτή η αναστολή επιτυγχάνεται με την αύξηση της έκφρασης των CKIs (εικόνα 1.18).

1. Εισαγωγή

Εικόνα 1.18: Η γήρανση ως υπερμιτογονική παύση του κύκλου, το οποίο την διαφοροποιεί από την κατάσταση προσωρινής απόσυρσης από τον κυτταρικό κύκλο, γνωστή ως φάση ηρεμίας ή G0. Τα κύτταρα γερούνουν παρουσία μιτογονικών ερεθισμάτων, έχοντας αυξημένους CKIs και μηδενική CDK ενεργότητα (τροποποιημένη εικόνα από Blagosklonny et al. (Blagosklonny, 2003)

Στα φυσιολογικά κύτταρα τα μιτογόνα (ως επί το πλείστον αυξητικοί παράγοντες) επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό: αρχικά, ενεργοποιούν τα μονοπάτια των MAP κινασών (Ras, Raf, MEK, ERK, JNK, p38), τα οποία επάγουν την αύξηση της ενεργότητας των συμπλόκων κυκλινών-κυκλινωεξαρτούμενων κινασών (CDK4/6-κυκλίνης D), τα οποία με τη σειρά τους, οδηγούν στην φωσφορυλίωση του Rb, την απελευθέρωση του E2F και την επιτυχή μετάβαση από την G1 στην S. Τα μονοπάτια, όμως, των MAP κινασών ενεργοποιούν και τους CKIs του κυτταρικού κύκλου (p21^{Cip1/Waf1}, p16^{Ink4a}, p53 κλπ), δίνοντας έτσι στο κύτταρο τη δυνατότητα να επιλέξει ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό ή την παύση του κύκλου του (Chang et al., 2002; Marshall, 1995; Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997). Η ένταση και η διάρκεια του μιτογονικού ερεθίσματος θα καθορίσει ποιο μονοπάτι θα επικρατήσει. Γήρανση επάγεται μόνο όταν μετά από κάποιο ερέθισμα στρεσογόνο ή/και μιτογονικό, προκληθεί αύξηση των CKIs, κι επομένως, αναστολή των CDKs. Το κύτταρο συνεχίζει να μεταβολίζει και να αυξάνεται σε μέγεθος, δεν μπορεί όμως να συνεχίσει τον κυτταρικό του κύκλο, εφόσον αδυνατεί να περάσει το σημείο ελέγχου G1/S, που ελέγχεται από το μονοπάτι Rb/E2F.

B.3 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η γήρανση αποτελεί μια κατάσταση μόνιμης παύσης του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία τα κύτταρα εμφανίζουν πλήθος μορφολογικών, μοριακών, βιοχημικών και γονιδιακών αλλαγών. Η λειτουργική σημασία των παραπάνω αλλαγών δεν έχει αξιολογηθεί πλήρως, καθώς είναι συχνά δύσκολο να γίνει η διάκριση ανάμεσα στις αλλαγές που ευθύνονται για την εμφάνιση της γήρανσης ή στις συνέπειες αυτής (Ran and Pereira-Smith, 2000). Τα κύτταρα που εισέρχονται σε γήρανση εγκαταλείπουν, συνήθως, τον κυτταρικό κύκλο με G1 περιεχόμενο DNA στους πυρήνες τους. Σήμανση με BrdU (χημικό ανάλογο της θυμιδίνης) στο θρεπτικό μέσο κυττάρων και ανοσοχημική χρώση έναντι αυτής δεν βάφει θετικά τα γηρασμένα κύτταρα, αφού αυτά αδυνατούν να εισέλθουν σε S για να συνθέσουν DNA. Παραμένουν μεταβολικά ενεργά για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς, όπως αναφέρθηκε, να ανταποκρίνονται σε μιτογονικά ερεθίσματα. Παρουσιάζουν υπερέκφραση των αναστολέων των CDKs (CKIs) (Alcorta et al., 1996; Campisi, 1996), ενώ συχνά αντιστέκονται σε αποπτωτικό θάνατο (Wang, 1995).

Χαρακτηριστικός βιομάρτυρας της γήρανσης είναι η κυτταρική μορφολογία. Τα γηρασμένα κύτταρα αποκτούν έναν ιδιαίτερο μορφολογικό φαινότυπο: γίνονται μεγαλύτερα και πιο πεπλατυσμένα, αυξάνοντας τη σχέση κυτταροπλάσματος/πυρήνα. Για το λόγο αυτό, καλλιέργειες γηρασμένων κυττάρων έχουν μικρότερη κυτταρική πυκνότητα σε σχέση με τις νεότερες. Επίσης, έχουν κοκκιώδες κυτταρόπλασμα (λόγω υπερέκκρισης ουσιών) και, συχνά, αποκτούν μακριές κυτταροπλασματικές προεξοχές (Rodemann et al., 1989).

Η πιο χαρακτηριστική, μέχρι σήμερα, ιδιότητα των γηρασμένων κυττάρων είναι η θετική χρώση τους (στο pH=6) με την ειδική για γηρασμένα κύτταρα ιστοχημική μέθοδο της β-γαλακτοσιδάσης (Dimri et al., 1995). Η χρώση αυτή στηρίζεται στην υδρόλυση του υποστρώματος X-gal από το ενδοκυτταρικό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, το οποίο στα φυσιολογικά κύτταρα πραγματοποιείται από τη λυσοσωμική υδρολάση στο pH=4, με αποτέλεσμα να βάφει όλα τα ζωντανά κύτταρα, ενώ στα γηρασμένα κύτταρα και μόνο αυτή η υδρόλυση πραγματοποιείται και στο pH=6. Ακριβής βιοχημική εξήγηση της παραπάνω ιδιότητας της β-γαλακτοσιδάσης που να τη συσχετίζει ειδικά με τα γηρασμένα κύτταρα δεν έχει δοθεί ακόμα, ωστόσο, σήμερα αποτελεί μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους ανίχνευσης γηρασμένων κυττάρων σε καλλιέργειες και ιστούς (Dimri et al., 1995; Toussaint et al., 2000b).

Στα χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων συγκαταλέγεται και η έκκριση μιας σειράς μορίων, όπως πρωτεΐνες, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και μεταλλοπρωτεΐνες, τα οποία μάλιστα έχουν ενοχοποιηθεί για τη μετέπειτα καρκινική εξαλλαγή παρακείμενων σε αυτά κυττάρων (Campisi, 1997; Campisi, 2000; Campisi et al., 1996; Suzuki and

Boothman, 2008). Τα μόρια αυτά δρουν παρακρινώς στους ιστούς, αλλάζοντας δραστικά το μικροπεριβάλλον τους. Αλλάζουν τις ιδιότητες των παρακείμενων ιστών, καθώς έστω και προσωρινά αποκόπτουν τις φυσιολογικές διασυνδέσεις των κυττάρων του επιθηλίου και του στρώματος, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία των ιστών. Αποτέλεσμα αυτών είναι, ίσως, η εύνοια ανάπτυξης παρακείμενων προ-νεοπλαστικών κυττάρων (Campisi, 1997; Krtolica et al., 2001).

Τέλος, άλλα χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων που έχουν καταγραφεί είναι:

- Η μεταβολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των “πρωτεϊνών θερμικού σοκ” (heat shock proteins), αύξηση των πρωτεϊνών οστεονεκτίνη, φμπρονεκτίνη, απολιποπρωτεΐνη J, προκολλαγόνο τύπου II και μεταλλοπρωτεϊνάσες που αποσυνθέτουν την εξωκυττάρια ύλη σε γηρασμένα κύτταρα (Dumont et al., 2000; Gonos, 1998; Sasaki et al., 2001).
- Η αλλαγή της μορφολογίας και της οργάνωσης συγκεκριμένων υποπυρηνικών δομών χωρίς, όμως, να έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής λειτουργικός της ρόλος κατά τη γήρανση. Για παράδειγμα παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης και της οργάνωσης/κατανομής των PML σωματίων (promyelocytic leukemia bodies) στον πυρήνα με τη γήρανση των κυττάρων ύστερα από ογκογονιδιακό στρες, ενώ επιπλέον βρέθηκε ότι υπερέκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PML ήταν ικανή να επάγει γήρανση εξαρτώμενη από το μονοπάτι p53 (Borden, 2002; Ferbeyre et al., 2000; Frampton et al., 2000). Επιπλέον, στα γηρασμένα κύτταρα έχει καταγραφεί ο σχηματισμός υποπυρηνικών δομών γνωστών ως SAHFs (Senescence-Associated Heterchromatin Foci) (Ye et al., 2007). Υποκυτταρική ανίχνευση των SAHFs γίνεται με χρώση DAPI (4-6 diamidino-2-phenylindole), στην οποία εμφανίζονται με τη μορφή μικρών στιγμάτων στον πυρήνα των γηρασμένων κυττάρων. Τα SAHFs περιέχουν τροποποιήσεις ιστονών που χαρακτηρίζουν τις μεταγραφικά ανενεργές ετεροχρωματινικές περιοχές του DNA, όπως η μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης 3 (H3K9Me), η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη HP1 και HP1-γ (γνωστή και ως CBX3), καθώς και η macro-H2A, μία παραλλαγή της ιστόνης H2A. Τα SAHFs θεωρείται ότι διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην επαγωγή της γήρανσης, καθώς σχηματίζονται πάνω σε υποκινητές γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό (πχ. κυκλίνης A), οδηγώντας τα σε αποσιώπηση (Duan et al., 2005; Narita et al., 2006; Narita et al., 2003; Zhang et al., 2007). Μπορεί ο ρόλος των SAHFs και ο τρόπος δημιουργίας τους να μην έχουν διευρινιστεί ακόμα, ωστόσο, αποτελούν ένα μορφολογικό γνώρισμα των γηρασμένων κυττάρων και χρησιμοποιούνται μάλιστα και στην ταυτοποίηση της *in vivo* γήρανσης επαγόμενης από ογκογονίδια (βλ. κεφάλαιο B.4.2 και B.5) (Braig et al., 2005; Collado et al., 2005; Lazzerini Denchi et al., 2005).

1. Εισαγωγή

- Τέλος, πολυπλοειδία, γιγαντιαίοι πυρήνες και φαινόμενα έντονης γονιδιακής αστάθειας έχει συσχετιστεί με κάποιους τύπους γηρασμένων κυττάρων. Αρκετές πρωτογενείς κυτταρικές σειρές (πχ. ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου, HUVECs) εμφανίζουν γιγαντιαίους πυρήνες με περιεχόμενο >4N με την αύξηση της ηλικίας τους (Wagner et al., 2001). Η γενικότερη δυσλειτουργία των τελομερών κατά τη γήρανση μπορεί να αποτελεί την αιτία εμφάνισης πολυπλοειδικών κυττάρων σε ορισμένες κυτταρικές σειρές: τα τελομέρη που έχουν φθαρεί χάνουν την ιδιαίτερη δομή τους, με συνέπεια να είναι επιρρεπή σε διάφορους τύπους ανακατατάξεων και συμπτύξεων, όπως δημιουργία γεφυρών (δικεντρικών χρωμοσωμάτων)(Gisselsson et al., 2001; Gisselsson et al., 2005; Plug-DeMaggio et al., 2004) και συνδέσεις των άκρων τους (end-to-end-fusions). Αποτέλεσμα αυτής της γονιδιωματικής αστάθειας είναι η γενικότερη δυσλειτουργία των μηχανισμών ελέγχου με αποτέλεσμα την αύξηση της πλοειδίας τους.

B.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

B.4.1 Αναπαραγωγική γήρανση (replicative senescence)

Ρόλος των τελομερών

Ήδη από το 1975, ο διδακτορικός φοιτητής του Hayflick, Woodring Wright, τοποθέτησε τη μοριακή βάση του «μιτωτικού ρολογιού» (του μηχανισμού εκείνου που καταγράφει τον αριθμό διπλασιασμών που επιτελεί κάθε φυσιολογικό κύτταρο) στον πυρήνα (Wright and Hayflick, 1975). Με την κατανόηση της βιοχημείας της αντιγραφής του DNA, έγινε αντιληπτό ότι τα άκρα των χρωμοσωμάτων, γνωστά ως τελομερή (Moyzis et al., 1988), ήταν αδύνατο να αντιγραφούν πλήρως και να μεταβιβαστούν κατά το ακέραιο στα θυγατρικά κύτταρα (end-replication problem) (Levy et al., 1992; Olovnikov, 1973; Watson, 1972). Αποτελέσματα μελετών που ακολούθησαν αναδείκνυαν τα τελομερή ως την βασική αιτία *αναπαραγωγικής γήρανσης*: Από τη μία, η μείωση του μήκους των τελομερών οδηγούσε σε αύξηση της παρατηρούμενης γήρανσης, και από την άλλη με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων στις περισσότερες κυτταρικές σειρές το μήκος των τελομερών μειωνόταν (Chiang et al., 2006; Linskens et al., 1995). Τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι η μοριακή βάση του μιτωτικού ρολογιού βρίσκεται στα τελομερή (Allsopp and Harley, 1995; Linskens et al., 1995).

Τα τελομερή είναι εξαμερείς, επαναλαμβανόμενες, μη κωδικές αλληλουχίες του DNA της μορφής (TTAGGG)_n. Στις αλληλουχίες αυτές συγκροτούνται ειδικές δομές της χρωματίνης, στις

1. Εισαγωγή

οποίες συμμετέχει πλήθος πρωτεϊνών (Takai et al., 2003). Τα τελομερή προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων αποτρέποντας την σύμπτυξη αυτών (end-to-end chromosomal fusions). Σε όλα τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, τα τελομερή φθείρονται με τους συνεχείς διπλασιασμούς, λόγω έλλειψης ή ανεπαρκούς έκφρασης του ενζύμου της τελομεράσης, το μόνο ένζυμο που αντιγράφει τα τελομερή (Feldser et al., 2003). Η μείωση των τελομερών πέραν ενός κρίσιμου μήκους (από ~10 kb σε ~4 kb), ενεργοποιεί σηματοδοτικές οδούς παρόμοιες με τις οδούς που αντιλαμβάνονται διπλές θραύσεις στο DNA. Αποτέλεσμα αυτών είναι η ενεργοποίηση των μονοπατιών της αναπαραγωγικής γήρανσης και η παύση του κυτταρικού κύκλου (Takai et al., 2003). Φαίνεται ότι δεν είναι το μειωμένο μήκος των τελομερών αυτό καθαυτό αλλά η αποσυγκρότηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων που προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων, γεγονός το οποίο εκλαμβάνεται από το κύτταρο ως διπλές θραύσεις στο DNA.

Εικόνα 1.18: Τα τελομερή, οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (TTAGGG)_n στα άκρα των χρωμοσωμάτων, αποτελούν τη μοριακή βάση του «μιτωτικού ρολογιού» που περιορίζει την διάρκεια ζωής όλων των φυσιολογικών κυττάρων κι ευθύνεται για την εκδήλωση του μη αντιστρεπτού φαινομένου της αναπαραγωγικής γήρανσης.

Τα τελομερή αποτελούν σήμερα τον πιο αποδεκτό, ίσως, μηχανισμό που αιτιολογεί την εμφάνιση της αναπαραγωγικής γήρανσης στα κύτταρα. Αν και υπήρχε από νωρίς η υποψία περί

συσχέτισης της φθοράς των τελομερών και της εμφάνισης της γήρανσης, ωστόσο, σχετικά πρόσφατα αποδείχτηκε πειραματικά (Bodnar et al., 1998; Yang et al., 1999). Η τελομεράση, το ένζυμο που καταλύει την αντιγραφή των τελομερών (Feldser et al., 2003), μειώνεται ή χάνεται στους περισσότερους ανθρώπινους ιστούς νωρίς κατά την εμβρυογένεση. Η εξωγενής έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT σε ανθρώπινα κύτταρα οδήγησε στην ενεργοποίηση αυτής κι ακολούθως στη διατήρηση του μεγέθους των τελομερών των κυττάρων αυτών, με αποτέλεσμα την παράταση της χρονικής διάρκειας της *in vitro* ζωής τους.

Πρόσφατες μελέτες, υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό στρες που βιώνουν τα κύτταρα είναι υπεύθυνο για την φθορά των τελομερών ή για την επιτάχυνση αυτής (Forsyth et al., 2003; Kurz et al., 2004; Tchirkov and Lansdorp, 2003; von Zglinicki, 2002). Το οξυγόνο φυσιολογικά στους ιστούς κυμαίνεται μεταξύ 2-5%, ενώ στις *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες είναι περίπου ~20%, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να βιώνουν έντονο οξειδωτικό στρες (Campisi, 2001; Forsyth et al., 2003). Έχει αποδειχτεί ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες στις αλληλουχίες των τελομερών, κατατμώντας το DNA στην περιοχή με τα επαναλαμβανόμενες γουανοσίνες, παράγοντας διπλές θραύσεις της έλικας (Kawanishi and Oikawa, 2004; Oikawa and Kawanishi, 1999). Αντίστοιχη πρόκληση διπλών θραύσεων στο DNA, όπως θα δούμε και παρακάτω (βλ. κεφ.Β.4.2), έχει καταγραφεί και σε περιπτώσεις υποβολής των κυττάρων σε πρόσθετο οξειδωτικό στρες με τη δράση παραγόντων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) στο θρεπτικό μέσο (Petersen et al., 2000; Sitte et al., 2000).

Ένα άλλο γεγονός που προτείνεται ως αιτία για την παρατηρούμενη μείωση του μήκους των τελομερών είναι η μείωση της αποτελεσματικότητας των μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων, ιδιαίτερα στην περιοχή των τελομερικών αλληλουχιών DNA. Στην περίπτωση αυτή, μη επιδιορθωμένη βλάβη σε τελομερική περιοχή παραμένει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, γεγονός το οποίο δυσχεραίνει τη δίοδο της αντιγραφικής μηχανής. Το αποτέλεσμα είναι συχνός πρόωρος τερματισμός της αντιγραφής των τελομερών, το οποίο επιταχύνει ακόμα περισσότερο τη φθορά τους (Sitte et al., 2000; von Zglinicki, 2002).

B.4.2 Πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από στρες (SIPS)

Ορισμένες μελέτες κατέδειξαν ότι η σταδιακή φθορά των τελομερών δεν είναι ο μοναδικός δρόμος που μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε γήρανση (ανασκόπηση Campisi J., 2000a). Από τη μια, όπως ήδη αναφέρθηκε, τα κατεστραμμένα τελομερή αποδείχτηκε ότι ενεργοποιούν τους

μηχανισμούς απόκρισης σε βλάβες (σημεία ελέγχου του κύκλου) που εξαρτώνται από τα μονοπάτια των p53 και pRb. Αυτό σήμαινε ότι η γήρανση θα μπορούσε να είναι η κυτταρική απάντηση στη συσσώρευση βλαβών στα χρωμοσώματα. Επιπλέον, κύτταρα ποντικού γερνούσαν μέσα σε λίγες σχετικά μιτωτικές διαιρέσεις, πριν προλάβουν τα τελομερή τους να υποστούν καμία αλλοίωση του αρχικού τους μήκους. Τέλος, κυτταρικές σειρές ποντικού γερνούσαν παρά το γεγονός ότι εξέφραζαν τελομεράση, το οποίο σήμαινε ότι το ένζυμο αυτό δεν αποτελούσε πάντα, για όλα τα κύτταρα, όλων των ειδών, τον μοναδικό περιοριστικό παράγοντα της διάρκειας ζωής (Chen et al., 2001).

Πειράματα που ακολούθησαν αποκάλυψαν ότι, πράγματι, νεαρά κύτταρα μπορούσαν να εισέλθουν σε μία αντίστοιχη κατάσταση εκτός κυτταρικού κύκλου η οποία δεν εξαρτάται από το μήκος των τελομερών, και η οποία προσομοιάζει, τόσο φαινοτυπικά όσο και μοριακά, την αναπαραγωγική γήρανση. Η κατάσταση αυτή ονομάστηκε **πρόωρη γήρανση** προκαλούμενη από **στρεσογόνους παράγοντες** (Stress Induce Premature Senescence ή SIPS)(Dumont et al., 2000; Toussaint et al., 2002; Toussaint et al., 2000a). Νεαρά κύτταρα μπορούσαν να εμφανίσουν *in vitro* όλα τα χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων ύστερα από την επίδραση ποικίλων παραγόντων όπως: οξειδωτικοί παράγοντες (H_2O_2), ακτινοβολίες, χημειοθεραπευτικά φάρμακα ή φάρμακα που επηρεάζουν τη δομή των μικροσωληνίσκων, παράγοντες ή φάρμακα που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης, καθώς κι έπειτα από ογκογονιδιακό στρες (εικόνα 1.19). Τι κοινό έχουν όλα τα παραπάνω ώστε να είναι σε θέση να προκαλέσουν SIPS; Τι κοινό μπορεί να υπάρχει ανάμεσα ένα άκρως μιτογονικό ερέθισμα όπως είναι η ογκογονιδιακή υπερδιέγερση και στην περισσότερο κυτταροστατική και κυτταροτοξική επίδραση των υπολοίπων παραγόντων;

Η απάντηση στο ερώτημα αυτό προκύπτει αναλογιζόμενοι ότι κοινή βάση όλων των παραπάνω παραγόντων είναι η **συσσώρευση βλαβών** στο γονιδίωμα και η πρόκληση στρες σε επίπεδο DNA. Οι **ελεύθερες ρίζες**, παραπροϊόν του μεταβολισμού των κυττάρων, καθώς και διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες μπορούν αποδεδειγμένα να προκαλέσουν διπλές θραύσεις στο DNA προάγοντας την εμφάνιση χαρακτηριστικών γήρανσης (Duan et al., 2005; Dumont et al., 2000; Fripiat et al., 2001; Zhang et al., 2007; Zhu et al., 2004). **Χημειοθεραπευτικά φάρμακα** (όπως η adriamycin και η cisplatin) που προσβάλλουν τη δομή ή τη σύσταση της χρωματίνης, μπορούν να προκαλέσουν φαινότυπο πρόωρης γήρανσης (Brewer and Fangman, 1991; Elmore et al., 2002; Sliwinski et al., 2008; Wang et al., 1998), ενώ παράγοντες που προκαλούν χαλάρωση της δομής της χρωματίνης μπορούν επίσης να προκαλέσουν πρόωρη γήρανση σε κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού (Lei et al., 1997; Ogryzko et al., 1996). Για παράδειγμα, κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Bmi-1 (πρωτεΐνη αναδιοργάνωσης χρωματίνης-chromatin remodelling protein), εμφανίζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, αφού το Bmi-1 κρατά σε αναστολή το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p16^{Ink4a} και μέσω

1. Εισαγωγή

αυτού το Rb, αναστέλλοντας έτσι τη γήρανση, ενώ αντίθετα, απώλεια του Bmi-1 οδηγεί σε SIPS (Jacobs et al., 1999).

Η **επίδραση ογκογονιδίων**, τέλος, έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιολογία της γήρανσης και του καρκίνου τα τελευταία χρόνια, και αρκετά είναι πλέον τα ευρήματα που ενοχοποιούν ως αιτία πρόκλησης της γήρανσης το λεγόμενο **αντιγραφικό στρες**, το οποίο θα αναλύσουμε σε επόμενο κεφάλαιο (βλ. κεφάλαιο B.5.2.). Στο στρες αυτό οφείλεται η γένεση βλαβών στη διπλή έλικα του DNA και η ενεργοποίηση, αφενός των μονοπατιών απόκρισης στις βλάβες, κι αφετέρου των μονοπατιών εισόδου των κυττάρων σε γήρανση. Η μελέτη της πρόωρης γήρανσης επαγόμενης από την υπερέφραση ογκογονιδίων και τα ευρήματά της αποτέλεσαν τη βάση για τον χαρακτηρισμό της γήρανσης ως ενός ***in vivo* ογκοπροστατευτικού μηχανισμού** που διαθέτει ο οργανισμός για να προστατευτεί από τις ποικίλες ενδο- ή έξω-κυττάρειες γενοτοξικές απειλές (βλ. κεφ. B5).

Εικόνα 1.19: Πολλοί δρόμοι οδηγούν σε κυτταρική γήρανση. Κοινό όλων αυτών είναι η πρόκληση σοβαρών βλαβών στη δομή της διπλής έλικας του DNA (εικόνα από (Collado and Serrano, 2006)).

B.4.3 Μοριακά μονοπάτια κυτταρικής γήρανσης

Έχει δειχτεί κατά το παρελθόν ότι η συγκέντρωση των CKIs, p21^{Cip1/Waf1} (Johnson et al., 1994) και p16^{Ink4a} (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996) αυξάνεται κατά πολύ στα γηρασμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας των κυκλίνo-εξαρτώμενων κινασών (Stein and Dulic, 1995). Στην εικόνα 1.20 παρουσιάζονται σχηματικά τα δύο κύρια μοριακά μονοπάτια που γνωρίζουμε

1. Εισαγωγή

σήμερα ότι εμπλέκονται στη σηματοδότηση για την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης, είτε πρόκειται για την αναπαραγωγική (A), είτε για την γήρανση προκαλούμενη από στρεσογόνους παράγοντες (B). Όπως είναι εμφανές, και στις δύο περιπτώσεις, στόχος των μονοπατιών της γήρανσης είναι η ενεργότητα των συμπλόκων κινασών-κυκλινών της G1/S φάσης και -κατά συνέπεια- η υποφωσφορυλίωση του pRb.

Εικόνα 1.20: Τελομερικά (A) και μη τελομερικά (B) σήματα επάγουν κυτταρική γήρανση μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και p16^{Ink4a} σε κύτταρα ανθρώπου και ποντικού.

Πιο συγκεκριμένα, η επαγωγή των p21^{Cip1/Waf1} και p16^{Ink4a} συμβάλλει στην αναστολή των κινασών Cdk2 και Cdk4/6, το οποίο οδηγεί με τη σειρά του στην υποφωσφορυλίωση του Rb και το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Στα ανθρώπινα κύτταρα μη λειτουργικά τελομερή επάγουν γήρανση κατά κύριο λόγο μέσω του μονοπατιού του ATM → p53 → Rb, ενώ πρόωρη γήρανση ανεξαρτήτων τελομερών μπορεί να επαχθεί και με τη δράση του p16^{Ink4a} → Rb μονοπατιού. Στα κύτταρα του ποντικού, όμως, το μονοπάτι γήρανσης που κυρίως επικρατεί είναι του p19^{ARF} → p53 → p21^{Cip1/Waf1} → Rb, ως απόκριση σε σήματα που δε σχετίζονται με τα τελομερή. Στα κύτταρα αυτά, γήρανση που οφείλεται στη φθορά των τελομερών δεν υφίσταται, κι έτσι τα κύτταρα γερνούν σχετικά γρήγορα (εντός 10-15 διπλασιασμών) έχοντας μακριά τελομερή.

Όπως προαναφέρθηκε, κοινό χαρακτηριστικό των δύο τύπων γήρανσης είναι η πρόκληση βλαβών στο DNA, και ως εκ τούτου η κυτταρική γήρανση θα πρέπει να θεωρείται σήμερα ως μια μορφή απόκρισης των κυττάρων στο στρες και στις βλάβες που προκαλούνται στο γονιδίωμα. Στην περίπτωση της πρόωρης γήρανσης προκαλούμενης από τη δράση γενοτοξικών παραγόντων (SIPS), η πρόκληση της βλάβης είναι μάλλον εμφανής. Στην περίπτωση της *αναπαραγωγικής γήρανσης*, η

σταδιακή φθορά των τελομερών «απογυμνώνει» τα άκρα των χρωμοσωμάτων, τα οποία εκλαμβάνονται ως βλάβες στο DNA (κατά κύριο λόγο διπλές θραύσεις στο DNA). Με τη σειρά τους αυτές διεγείρουν τους μηχανισμούς απόκρισης του κυττάρου, ενεργοποιώντας τα κατάλληλα μοριακά μονοπάτια για την αντιμετώπισή τους. Τα μονοπάτια που εξαρτώνται από τη δράση των p16^{Ink4a}/Rb και p53 είναι αυτά που κατά κύριο λόγο δραστηριοποιούνται για να οδηγήσουν τα κύτταρα είτε σε γήρανση, είτε σε p53-διαμεσολαβούμενη απόπτωση, σε περίπτωση που η βλάβη είναι μη επιδιορθώσιμη και η κατάσταση δεν κρίνεται βιώσιμη (d'Adda di Fagagna et al., 2003).

Η συσχέτιση της γήρανσης με την ενεργοποίηση μονοπατιών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και απόκρισης σε βλάβες του DNA έχει πιστοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις. Με τη χρήση παλαιότερα της τεχνικής COMET-assay και πιο πρόσφατα μέσω της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των πυρήνων για γ-H2AX (η συγκεκριμένη τροποποίηση της ιστόνης μαρκάρει περιοχές με βλάβες και συγκεκριμένα με διπλές θραύσεις στο DNA)(Rogakou et al., 1999) παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των διπλών θραύσεων αυξάνεται σε γηρασμένα ανθρώπινα κύτταρα (Chevanne et al., 2003) αλλά και σε ιστούς γηρασμένων ποντικών (Singh et al., 2001). Αυξημένος αριθμός φθορίζοντων στιγμάτων γ-H2AX παρατηρήθηκε και σε «μη προστατευμένα» (deprotected) τελομερή (Takai et al., 2003), ενώ πρωτογενείς άνθρωποι ινοβλάστες που εισέρχονται σε αναπαραγωγική γήρανση συσσωρεύουν χρώση γ-H2AX συνεντοπισμένη με παράγοντες επιδιόρθωσης διπλών θραύσεων του DNA (Bakkenist et al., 2004; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Sedelnikova et al., 2004). Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν αδιαμφισβήτητα τη συμμετοχή των μονοπατιών απόκρισης στις διπλές θραύσεις του DNA στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (von Zglinicki and Martin-Ruiz, 2005).

Σε κύτταρα με απενεργοποιημένα τα συγκεκριμένα μονοπάτια, η φθορά των τελομερών συνεχίζεται, με αποτέλεσμα τη γένεση χρωμοσωματικών ανωμαλιών και την έντονη γενωμική αστάθεια, μια κατάσταση γνωστή ως «κρίση» (crisis)(Feldser et al., 2003). Μια τέτοια κατάσταση θέτει το κύτταρο σε κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής (εικόνα 1.21). Από τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι η μείωση των τελομερών μπορεί να αποτελεί έναν φραγμό στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν βλάβες στον γενετικό τους υλικό, αυτό όμως εξαρτάται στο μέγιστο από την ακεραιότητα των διαθέσιμων μηχανισμών ελέγχου για τη διαχείριση μια τέτοιας κρίσης.

Η γενετική αστάθεια των κυττάρων που γερνούν έχει καταγραφεί με κυτταρολογικές μεθόδους κατά το παρελθόν (Martin, 1985; Ramsey et al., 1995). Πράγματι, αυξημένα φαινόμενα χρωμοσωματικών ανωμαλιών (μετατοπίσεις, ενθέσεις, δικεντρικά και ακεντρικά χρωμοσωματικά τμήματα) έχουν παρατηρηθεί σε γηρασμένες καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων (Ramsey et al., 1995), καθώς και κυττάρων νεφρού γηρασμένων ποντικών (Martin, 1985).

1. Εισαγωγή

Διαπιστώνουμε, λοιπόν, ότι κάθε παράγοντας που προκαλεί σοβαρές βλάβες στο DNA μπορεί, εν δυνάμει, να αποτελέσει και αιτία επαγωγής κυτταρικής γήρανσης. Πάνω σε αυτήν ακριβώς την υπόθεση, ότι η γήρανση αποτελεί έναν εγγενή *in vivo* μηχανισμό απόκρισης στο στρες και στις βλάβες του DNA, στηρίζεται η *σύγχρονη θεώρηση της κυτταρικής γήρανσης*.

Εικόνα 1.21: Οι συνέπειες της δυσλειτουργίας των τελομερών, τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται και ο κίνδυνος της καρκινικής εξαλλαγής σε περίπτωση απενεργοποίησής τους (τροποποιημένη εικόνα από Cheung A. et al. (Cheung and Deng, 2008).

B.5 ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

B.5.1 Η γήρανση ως *in vivo* ογκοπροστατευτικός μηχανισμός

Η ικανότητα της γήρανσης να παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οδήγησε πρόσφατα στον χαρακτηρισμό της ως εγγενούς μηχανισμού ογκοκαταστολής που λαμβάνει χώρα *in vivo* στον

οργανισμό. Πράγματι, κύτταρα που έχουν συσσωρεύσει βλάβες στο DNA, είτε λόγω φθοράς των τελομερών, είτε λόγω επίδρασης γενοτοξικών παραγόντων, οδηγούνται σε γήρανση με την ενεργοποίηση μονοπατιών που εξαρτώνται από ογκοκατασταλτικά γονίδια (p53, p21^{Cip1/Waf1} και p16^{Ink4a}). Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα, ύστερα από ογκογονιδιακή υπερδιέγερση (με υπερέκφραση του Ras), χρησιμοποιούν παρόμοια μονοπάτια (p16^{Ink4a} και p53) για να εισέλθουν σε μία κατάσταση που προσομοιάζει την κυτταρική γήρανση (Barradas et al., 2002). Πρόκειται για τη «γήρανση-επαγόμενη από ογκογονίδια» (Oncogene-Induced-Senescence ή OIS), η οποία χαρακτηρίστηκε ως ένας εγγενής μηχανισμός του οργανισμού καταστολής των προκαρκινικών κυττάρων.

Η συσχέτιση της γήρανσης με την ογκοκαταστολή είχε φανεί και παλαιότερα, όταν είχε παρατηρηθεί ότι η απώλεια συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων (που είναι κεντρικά στα μονοπάτια της γήρανσης) είναι αρκετή για την κακοήγη εξαλλαγή των ανθρώπινων κυττάρων *in vitro* (Hahn and Weinberg, 2002). Επιπλέον, τα μονοπάτια αυτά χάνονται στις περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινων καρκίνων (Gil and Peters, 2006; Hollstein et al., 1991; Kim and Sharpless, 2006; Sharpless and DePinho, 1999). Ωστόσο, τα περισσότερα στοιχεία που συνέδεαν τη γήρανση με τα μονοπάτια ογκοκαταστολής προέρχονταν από πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες, χωρίς να υπάρχουν αποδείξεις ότι η γήρανση συμβαίνει, πράγματι, *in vivo*, σε επίπεδο οργανισμού. Μέχρι πρόσφατα, το πιο πειστικά στοιχεία προέρχονταν από πειράματα σε ποντίκια, στα οποία τα γονίδια των p53 και p16^{Ink4a} ήταν απενεργοποιημένα στη γαμετική σειρά. Τα κύτταρα που προέρχονταν από τα συγκεκριμένα ζώα αδυνατούσαν να γεράσουν παρουσία διαφόρων γενοτοξικών παραγόντων (SIPS). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα ζώα ανέπτυσαν καρκίνους σε πολύ μικρή ηλικία (Ghebranious and Donehower, 1998).

Η επιβεβαίωση ότι η γήρανση δεν είναι απλά μια κατάσταση στρες των κυττάρων που απαντάται μονάχα στην καλλιέργεια, έγινε μόλις πρόσφατα, με μια σειρά δημοσιεύσεων στο περιοδικό Nature το καλοκαίρι του 2005 (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005). Η κάθε ερευνητική ομάδα ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας διαφορετικό σύστημα ογκογονιδιακής υπερδιέγερσης, απέδειξαν ότι η γήρανση συμβαίνει πράγματι *in vivo* στον οργανισμό, ως απάντηση σε μηνύματα ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (συγκεκριμένα, ύστερα από δράση των ογκογονιδίων). Έτσι, γηρασμένα κύτταρα ανιχνεύονταν σε καλοήθεις αλλοιώσεις του δέρματος στην περίπτωση μετάλλαξης του γονιδίου BRAF (Michaloglou et al., 2005), σε νευροϊνώματα ασθενών με υπερέκφραση του Ras (Courtois-Cox et al., 2006) και σε καλοήθεις όγκους του προστάτη σε ανθρώπινα δείγματα (Chen et al., 2005). Ομοίως, γηρασμένος φαινότυπος εμφανίστηκε σε καλοήθεις προκαρκινικές αλλοιώσεις προστάτη ποντικών που στερούνταν το ογκοκατασταλτικό PTEN (Chen et al., 2005). Πιο πρόσφατα, ο Sarkisian και οι

1. Εισαγωγή

συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας K-Ras διαγονιδιακά ποντίκια (με την ιδιότητα να ρυθμίζονται τα επίπεδα έκφρασης του Ras), απέδειξαν ότι μικρή σχετικά έκφραση του Ras μπορούσε να επάγει υπερπλασίες στο μαστό, χωρίς αυτές όμως να μπορούν να εξελιχθούν σε κακοήγη όγκο. Γήρανση επαγόταν όταν αυξάνονταν τα επίπεδα έκφρασης του Ras, ενώ οι υπερπλασίες οδηγούνταν σε κακοήθεις όγκους όταν αναστέλλονταν τα μονοπάτια της γήρανσης (Sarkisian et al., 2007).

Συμπερασματικά, λοιπόν, η γήρανση φαίνεται ότι εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης, με σκοπό να περιορίσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί κάποιες πρώιμες προκαρκινικές αλλοιώσεις, προστατεύοντας τον οργανισμό από την περαιτέρω κακοήγη εξαλλαγή τους, που θα οδηγούσε σε επιτάχυνση της ανάπτυξης του όγκου (εικόνα 1.22). Ίσως, μελλοντικά, η γήρανση να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ακόμα και ως δείκτης του σταδίου στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος (Collado and Serrano, 2006).

Εικόνα 1.22: Η γήρανση λειτουργεί ως *in vivo* ογκοπροστατευτικός μηχανισμός. Μεταλλαγές ικανές να ενεργοποιήσουν ογκογονίδια όπως τα Ras, το BRAF ή το PTEN δημιουργούν προκαρκινικές αλλοιώσεις (Α) στους ιστούς. Παρουσία των μονοπατιών της γήρανσης τα κύτταρα αυτά, που βρίσκονται σε ένα πρώιμο καρκινικό στάδιο, μπορούν να εισέλθουν σε γήρανση (Β). Αν, όμως, χαθεί η λειτουργία των p16/p53/Rb, τότε τα κύτταρα αδυνατώντας να γεράσουν, συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα να εξελίσσονται, τελικά, σε κακοήθεις όγκους (Γ) (εικόνα από: J. Campisi, 2005)(Campisi, 2005).

B.5.2 Ο ρόλος του «αντιγραφικού στρες»

Ωστόσο, αρκετά είναι τα ερωτήματα που παραμένουν αναπάντητα σχετικά με την επαγωγή της γήρανσης ως μηχανισμού άμυνας στην κακοήθη εξαλλαγή κυττάρων ύστερα από ογκογονιδιακό στρες. Ποιος είναι ο πιθανός εμπλεκόμενος μηχανισμός που σηματοδοτεί τη γήρανση στα κύτταρα αυτά, και πώς, τελικά, τα κύτταρα καταλήγουν να χάνουν τα μονοπάτια της γήρανσης με συνέπεια την κακοήθη εξαλλαγή τους;

Απαντήσεις στα ερωτήματα αυτά προσπάθησε να δώσει μια πρόσφατη σειρά εργασιών οι οποίες προτείνουν ότι η γήρανση επάγεται στις προκαρκινικές αλλοιώσεις των ιστών ως απόκριση στις βλάβες που προκαλούνται στο DNA λόγω *αντιγραφικού στρες* (Venkitaraman, 2005). Κατά συνέπεια, κακοήθης εξαλλαγή προάγεται όταν το αντιγραφικό στρες και η γενικότερη γενωμική αστάθεια που αυτό προκαλεί, δημιουργήσουν ένα περιβάλλον «επιλεκτικής πίεσης» που να ευνοούν μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά μονοπάτια με αποτέλεσμα την απώλειά τους (Burhans and Weinberger, 2007).

Αντιγραφικό στρες παράγεται στα κύτταρα όταν καθυστερούν ή σταματούν οι διχάλες αντιγραφής κατά τη διαδικασία σύνθεσης του DNA στην S φάση (Burhans and Weinberger, 2007). Αιτίες σαν αυτές που παρουσιάζονται στην εικόνα 1.23 μπορεί να αποτελούν αιτίες γένεσης αντιγραφικού στρες στα κύτταρα.

Εικόνα 1.23: Παράγοντες που συμβάλουν στο σταμάτημα των διχάλων αντιγραφής και στην πρόκληση αντιγραφικού στρες (τροποποιημένη εικόνα από: Burhans W. and Weinberger M. (Burhans and Weinberger, 2007)).

Το αντιγραφικό στρες θεωρείται η αιτία γένεσης βλαβών στο DNA, κυρίως διπλών θραύσεων της διπλής έλικας. Ένα αντιγραφόμενο τμήμα DNA είναι πολύ πιο επιρρεπές στη γένεση διπλών θραύσεων λόγω της ιδιαίτερης δομής του κατά την αντιγραφή (εικόνα 1.24). Η διπλή έλικα έχει ξετυλιχτεί, με αποτέλεσμα, και μια απλή κατάτμηση της μιας αλυσίδας να ισοδυναμεί με διπλή θραύση. Τα άκρα μιας κατατμημένης αλυσίδας είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε φαινόμενα ανασυνδυασμού, με αποτέλεσμα η συσσώρευση διπλών θραύσεων να αποτελεί μια πηγή χρωμοσωματικών ανακατατάξεων και γενικότερης γονιδιωματικής αστάθειας για το κύτταρο. Ένα τέτοιο υψηλά μεταλλαξιγόνο περιβάλλον, πιθανότατα ευνοεί, από επιλεκτικής άποψης, την απώλεια των μονοπατιών εκείνων που θα «παρακάμψουν» τα σημεία ελέγχου ώστε να συνεχιστεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ανεξάρτητα της συσσώρευσης βλαβών στο DNA, με συνέπεια την κακοήγη εξαλλαγή.

Εικόνα 1.24: Η ιδιαίτερη δομή του DNA κατά την αντιγραφή του στην S φάση είναι δυνατό να συμβάλλει στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος έντονης γονιδιωματικής αστάθειας στην περιοχή της διχάλας αντιγραφής. (Α) Οι απλές κατατμήσεις της διπλής έλικας σε ένα μη αντιγραφόμενο DNA, αντιμετωπίζονται εύκολα, αφού οι δεσμοί υδρογόνου συγκρατούν τις δύο αλυσίδες μέχρις ότου να γίνει η επιδιόρθωση (με τη δράση μιας λίσωσης), (Β) στην περίπτωση, όμως, ενός αντιγραφόμενου τμήματος DNA, λόγω του ξετυλίγματος της διπλής έλικας για να εκκινήσει η αντιγραφή, η παραμικρή βλάβη (Γ) που θα προκληθεί, παρουσία ίσως κι εξωγενών στρεσογόνων παραγόντων (πχ. ελεύθερες ρίζες), θα δημιουργήσει διπλές θραύσεις στο DNA, τα οποία, αφενός είναι πολύ πιο δύσκολα στην επιδιόρθωση, κι αφετέρου, περισσότερο επιρρεπή σε φαινόμενα ανασυνδυασμού (εικόνα από: Burhans W. and Weinberger M. (Burhans and Weinberger, 2007).

Πειραματικά ευρήματα που υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση δημοσιεύτηκαν πρόσφατα σε εργασίες στις οποίες αποδείκνυαν ότι η υπερέκφραση γνωστών ογκογονιδίων (όπως RasV12, Mos, Stat5, E2F και Cdc6) ενεργοποιεί μοριακά μονοπάτια απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR), τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του p53 και τη μετέπειτα είσοδο σε κυτταρική γήρανση (OIS). Αποδείκνυαν, μάλιστα, τη συμμετοχή συγκεκριμένων κινασών απόκρισης στις βλάβες (DDR-κινάσες), όπως ATR, ATM, Chk1, Chk2 στα μονοπάτια αυτά, ενώ η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης αυτών (με RNAi) οδηγούσε σε παράκαμψη της γήρανσης (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, δείγματα ανθρώπινων ιστών στο πρώιμο στάδιο των προ-καρκινικών αλλοιώσεων, βρέθηκαν θετικά για δείκτες ενεργοποιημένων DDR-μονοπατιών (πχ. ATM, Chk2, γ-H2AX και p53)(Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005), σε αντίθεση με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση της DDR-σηματοδότησης (πχ. p53 και 53BP1)(Gorgoulis et al., 2005).

1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με αυτό, στις προκαρκινικές αλλοιώσεις τα μηνύματα έντονου πολλαπλασιασμού («καρκινικοί κυτταρικοί κύκλοι»), που συνήθως προέρχονται από τη δράση ογκογονιδίων, οδηγούν σε αντιγραφικό στρες τα κύτταρα, με αποτέλεσμα το σταμάτημα ή/και την κατάρρευση των διχάλων αντιγραφής. Αυτό παράγει ιδιόμορφες ενδιάμεσες αντιγραφικές δομές και τελικά βλάβες στην έλικα του DNA, επάγοντας έτσι την ενεργοποίηση κυτταρικών αποκρίσεων σε βλάβες στο DNA (DDR σηματοδότηση). Αυτή, με τη σειρά της, οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση ή γήρανση, ενεργοποιώντας τα κατάλληλα μονοπάτια (εικόνα 1.25A). Η έντονη επιλεκτική πίεση αλλά και το περιβάλλον γενικότερης γονιδιακής αστάθειας στα προκαρκινικά αυτά κύτταρα, μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια (μετάλλαξη) στον γενετικό τόπο των γονιδίων από τα οποία εξαρτώνται τα μονοπάτια της απόπτωσης και της γήρανσης (συχνότερα του p53 και του p16^{Ink4a}), με αποτέλεσμα την καρκινογένεση (εικόνα 25B). Συνολικά, λοιπόν, φαίνεται ότι η κυτταρική απόκριση σε βλάβες διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών διεργασιών, όπως η γήρανση, η απόπτωση και η καρκινογένεση (Bartkova et al., 2005).

Το μοντέλο που συνοδεύει τη σύγχρονη θεώρηση της κυτταρικής γήρανσης συνοψίζεται στην εικόνα 1.25.

Εικόνα 1.25: Μοντέλο που συνοψίζει τη σύγχρονη θεωρία σχετικά με την επαγωγή της γήρανσης in vivo στον οργανισμό, στηριζόμενο στα ευρήματα μελέτης της γήρανσης προκαλούμενης από ογκογονιδιακή υπερδιέγερση (τροποποιημένη εικόνα από: Venkitaraman A., 2005)(Venkitaraman, 2005).

2. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της ρύθμισης ενός κεντρικού παράγοντα της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, του Cdt1, και του αρνητικού ρυθμιστή αυτού, Geminin, κατά τη διαδικασία της μη αναστρέψιμης απόσυρσης από τον κυτταρικό κύκλο, γνωστή ως κυτταρική γήρανση.

Πιο αναλυτικά, επιμέρους στόχοι ήταν:

- Η μελέτη του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης (ρύθμιση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ενδοκυτταρική εντόπιση) των παραγόντων Cdt1 και Geminin σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα και η αντιπαράβολή αυτού με το αντίστοιχο πρότυπο στα -περισσότερο μελετημένα έως σήμερα- ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκε ένα νέο ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη Geminin, που παρασκευάστηκε για τους σκοπούς της εργασίας αυτής.
- Η μελέτη της έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin κατά την είσοδο των κυττάρων σε γήρανση, τόσο αναπαραγωγική όσο και πρόωρα επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες (οξειδωτικό στρες).
- Η διερεύνηση της λειτουργικής συσχέτισης των μειωμένων επιπέδων έκφρασης του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου Geminin με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο γενετικής αποσιώπησης (RNAi) όσο και υπερέκφρασης (μέσω ρετροϊκών φορέων) της πρωτεΐνης Geminin, σε πρωτογενή κύτταρα ανθρώπου ή ποντικού αντίστοιχα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GEMININ

A.1 ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ GEMININ

Για τη δημιουργία νέου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Geminin πραγματοποιήθηκε βακτηριακή έκφραση και καθαρισμός της πλήρους πρωτεΐνης Geminin και μιας κεντρικής περιοχής αυτής (αμινοξέα 76-160), που αντιστοιχεί στο τμήμα του σπειροειδούς σπειράματος του μορίου (coiled-coil) (μαύρη γραμμή, εικόνα 3.1).

Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση (σε κλίμακα) των βασικών λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης Geminin. Με μαύρο βέλος επισημαίνεται το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης που εκφράστηκε για την παραγωγή του αντισώματος, το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή του σπειροειδούς σπειράματος (coiled-coil)(χαρτοράφηση περιοχών βάσει της εργασίας Okorokov A. et al. (Okorokov A., 2004).

Η έκφραση πραγματοποιήθηκε παρουσία των αντιβιοτικών καναμυκίνη (30 mg/ml) και χλωραμφενικόλη (34 mg/ml), χρησιμοποιώντας τα συστήματα ετερόλογης βακτηριακής έκφρασης BL21 (DE3) Codon Plus-RIL (Stratagene #230245) και Rosetta (DE3)pLysS (Novagen #70956), που φέρουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Εκφράζουν tRNAs για τα σπάνια (για την *E. coli*) κωδικόνια AGG/AGA (αργινίνη), CGG (αργινίνη), AUA (ισολευκίνη), CUA (λευκίνη) και CCC (προλίνη).
2. Η έκφραση του cDNA εξαρτάται από τη δράση της RNA πολυμεράσης T7 (του βακτηριοφάγου T7), η οποία μεταγράφει οποιαδήποτε κωδική cDNA αλληλουχία βρίσκεται κλωνοποιημένη καθοδικά του υποκινητή T7.

3. Το γονίδιο της πολυμεράσης T7 βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacUV5 στο βακτηριακό χρωμόσωμα (γενετικό στοιχείο DE3).
4. Το γονίδιο pLysS που περιέχεται στα βακτήρια Rosetta κωδικοποιεί την έκφραση της λυσοζύμης T7, η οποία λειτουργεί ως αναστολέας της RNA πολυμεράσης T7. Έτσι εξασφαλίζεται ότι, απουσία του ενεργοποιητή (IPTG) του συστήματος έκφρασης, δεν υπάρχει λανθάνουσα έκφραση της RNA πολυμεράσης T7 στα κύτταρα, γεγονός σημαντικό κυρίως για έκφραση πρωτεϊνών τοξικών για τα κύτταρα.

Τα πλασμίδια έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το pETM10 για το συντηρημένο κομμάτι της Geminin (Παπαπέτρου, Ε., 2005, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης) και το pET28 για την πλήρη πρωτεΐνη Geminin (από Δρ. Περράκη Α., NKI). Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε έκφραση μεγάλης κλίμακας (από 1 lt καλλιέργεια) ενώ ο καθαρισμός των πρωτεϊνικών τμημάτων (που έφεραν ουρά 6-ιστιδινών) από το βακτηριακό εκχύλισμα έγινε με τη χρήση χρωματογραφικής κολώνας νικελίου, Ni-NTA (Invitrogen) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση για την αφαίρεση του ιμιδαζολίου από το διάλυμα έκλουσης. Οι ακριβείς συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού των επιμέρους πρωτεϊνών συγκεντρώνονται στον πίνακα 3.1. Τα πρωτόκολλα και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στην εργασία (Ηλιού, 2004, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης).

Πρωτεϊνικό τμήμα	Όχημα έκφρασης	Βακτηριακό σύστημα	Συνθήκες επαγωγής	Συνθήκες καθαρισμού	Διαπίδυση
Συντηρημένη περιοχή hGeminin (αμινοξέα 76-160)	pETM10	BL21(DE3)	37° C/5h 0,1 mM IPTG	Πλύσεις: 5 mM ιμιδαζόλιο Έκλουση: 200 mM ιμιδαζόλιο	25 mM Tris-Cl pH=8 50 mM NaCl
Πλήρης hGeminin (αμινοξέα 1-209)	pET28	Rosetta (DE3)pLysS	*30° C/2h 0,1 mM IPTG	Πλύσεις: 25 mM ιμιδαζόλιο Έκλουση: 50-250 mM ιμιδαζόλιο (μέγιστη έκλουση στα 100 mM)	25 mM Tris-Cl pH=8 50 mM NaCl

Πίνακας 3.1: Συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού πρωτεϊνικών τμημάτων της hGeminin.

*Για την καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης, η επώαση στη θερμοκρασία των 30°C απαιτείται και κατά την ανάπτυξη (πριν την επαγωγή) των Rosetta βακτηρίων. Συγκεκριμένα, ύστερα από την αρχική αραίωση που δίνει OD=0,05, η

καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C μέχρι η OD να φτάσει την τιμή 0,4 ενώ στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται στους 30°C μέχρι την τιμή OD=0,7-0,8, οπότε και πραγματοποιείται η επαγωγή της έκφρασης για 2 h).

Με τον τρόπο αυτό παρήχθη αρκετή ποσότητα (8-12 ml) διαλυτής πρωτεΐνης περιεκτικότητας >1 μg/μl τόσο του συντηρημένου κομματιού όσο και της πλήρους Geminin, ικανή για να σταλεί για παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος (βλ.μετά), αλλά και για *in vitro* μελέτες φωσφορυλίωσης του μορίου της από την κινάση CKII (Roukos et al, 2007).

A.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ GEMININ

A.2.1 Γενικά

Τα μονοκλωνικά αντισώματα, σε αντίθεση με τα πολυκλωνικά, αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο επίτοπο του αντιγόνου, ενώ αποτελούν προϊόντα ενός μόνο κλώνου Β κυττάρων. Λόγω αυτού του χαρακτηριστικού τους, υπάρχουν πολλές τεχνικές, κυρίως ανοσοϊστοχημικές, στις οποίες δείχνουν να υπερτερούν λειτουργικά έναντι των πολυκλωνικών αντισωμάτων. Η τεχνολογία σήμερα επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων με τη δημιουργία αθανατοποιημένων κυτταρικών σειρών ικανών να εκκρίνουν συνεχώς και σε μεγάλες ποσότητες το αντίσωμα στο περιβάλλον. Αυτό προϋποθέτει τη δημιουργία υβριδίων-κυττάρων (υβριδωμάτων) με τη σύντηξη λεμφοκυττάρων ανοσοποιημένου με το αντιγόνο (π.χ τμήμα της πρωτεΐνης Geminin) ποντικού με καρκινικά-μυελωματικά κύτταρα ποντικού, μία τεχνική που εισήχθη από τους Köhler and Milstein το 1975 (Kohler and Milstein, 1975). Με τον τρόπο αυτό, τα παράγωγα υβριδικά-κύτταρα κληρονομούν από το μεν λεμφοκύτταρο την ικανότητα να εκκρίνουν αντισώματα έναντι του αντιγόνου με το οποίο ήρθε σε επαφή το ανοσοποιημένο ζώο, από το δε μυελωματικό κύτταρο την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται συνεχώς σε καλλιέργεια. Οι συνθήκες σύντηξης των λεμφοκυττάρων-μυελωμάτων είναι κατάλληλα επιλεγμένες (HAT θρεπτικό μέσο), ώστε να είναι τελικά εφικτή η επιβίωση στην καλλιέργεια μόνο των υβριδωμάτων (εικόνα 3.2).

Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση της κλασσικής διαδικασίας δημιουργίας υβριδωμάτων για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (τροποποιημένο σχήμα από (Keith Wilson and John Walker)).

A.2.2 Καλλιέργεια των υβριδωμάτων

Η πρωτεΐνη που εκφράστηκε και απομονώθηκε και αντιστοιχεί στο συντηρημένο τμήμα της ανθρώπινης Geminin χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για τη δημιουργία των υβριδωμάτων (EMBL Monoclonal Antibody Core Facility, Χαϊδελβέργη Γερμανίας). Οι κλώνοι των υβριδωμάτων που βρέθηκαν θετικοί για την παραγωγή αντισωμάτων καλλιεργήθηκαν υπό κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 5% CO₂) σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (πίνακας 3.2), με τρόπο που περιγράφεται στη συνέχεια ώστε να επιτευχθεί υψηλός τίτλος αντισώματος στο υπερκείμενο. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη διαχείριση των υβριδωμάτων είναι διαθέσιμες στην ιστοσελίδα του «EMBL Monoclonal Antibody Core Facility» (URL: www.macf.embl.de).

Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται με τη χρήση φίλτρου (Corning 430944) και μεταφέρεται σε νέο, καθαρό και αποστειρωμένο γυάλινο μπουκάλι. Φυλάσσεται στους 4°C, όχι μεγάλο χρονικό διάστημα, αφού η γλουταμίνη αποσταθεροποιείται γρήγορα.

Συστατικά	Θρεπτικό μέσο υβριδωμάτων HM20
FCS 20%	100 ml
L-glutamine 200 mM Gibco 25030-024	5 ml
Gentamicin 50 mg/ml Gibco- 15750-037	1 ml
HCF10% (Hybridoma Cloning Factor) Bioveris Corp. Cat. No 210001	50 ml*
DMEM (Gibco 41965-039)	μέχρι πλήρωσης όγκου 500 ml

Πίνακας 3.2: Σύσταση θρεπτικού μέσου για τα υβριδώματα.

*Ο παράγοντας HCF δεν μπαίνει στο σύνολο του θρεπτικού μέσου, αλλά λίγο πριν τη χρήση.

A.2.2.a Απόψυξη των υβριδωμάτων

Για την απόψυξη των κλώνων των υβριδωμάτων ακολουθήθηκε η εξής πορεία:

1. Ανακίνηση του κρυο-φυαλιδίου με τα παγωμένα κύτταρα σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C.
2. Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε σωλήνα που περιέχει ήδη προθερμασμένο θρεπτικό μέσο HM20-10% HCF. Ήπια φυγοκέντρηση (στα 800 rpm ή 100 g για 4 λεπτά) για την καθίζηση των κυττάρων. Αφαίρεση του υπερκειμένου.
3. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml θρεπτικού μέσου.
4. Μεταφορά των κυττάρων στο 1^ο πηγάδι του τρυβλίου 24 θέσεων (24-well-plate).
5. Μεταφορά 0,5 ml από το 1^ο πηγάδι, στο διπλανό το οποίο περιέχει ήδη 1ml θρεπτικού μέσου. Εν συνεχεία, μεταφέρεται 0,5 ml και πάλι από το 2^ο πηγάδι στο διπλανό 3^ο πηγάδι κοκ. Τέλος, από το 4^ο πηγάδι επιστρέφεται πίσω στο 1^ο ποσότητα 0,5 ml. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στους 37° C.

A.2.2.β Αραίωση των υβριδωμάτων (διαδικασία split)

Αρχικά τα υβριδώματα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% HCF σε 24άρια τρυβλία, ενώ σε κάθε αραίωση που γίνεται η συγκέντρωση του παράγοντα πρέπει να μειώνεται διαδοχικά στο μισό (10% → 5% → 2,5% → 0%). Τα υβριδώματα αραιώνονται ανά 3-5 ημέρες 1:5, ενώ σταδιακά μεταφέρονται σε τρυβλία μεγαλύτερου εμβαδού (12άρια, 6άρια, μικρές φλάσκες). Ο ρόλος του παράγοντα HCF εστιάζεται στην αρχή, καθώς βοηθά τα κύτταρα να αναρρώσουν από το σοκ της ψύξης. Μια καλλιέργεια υβριδωμάτων που μεγαλώνει ιδανικά δεν θα πρέπει να περιέχει καθόλου HCF. Για την αραίωση των κυττάρων δε χρησιμοποιείται διάλυμα τρυπίνης αφού τα κύτταρα είναι ημι-προσκολλόμενα με αποτέλεσμα να ανασηκώνονται με μια απλή ανακίνηση του τρυβλίου και ήπιο πιπετάρισμα. Συνοπτικά η πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Συλλογή των κυττάρων από ένα πηγάδι του τρυβλίου και τοποθέτησή τους σε 15άρι σωλήνα (falcon).
2. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου.
3. Πλύση με 1xPBS. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου.
4. Προσθήκη μικρής ποσότητας θρεπτικού μέσου, αναδιάλυση και μοίρασμα του εναιωρήματος των κυττάρων σε 5 νέα πηγάδια (αραίωση 1:5). Ελαφρή ανακίνηση και τοποθέτηση των κυττάρων για επώαση στους 37°C.

A.2.2.γ Ψύξη των υβριδωμάτων (πάγωμα)

Τα υβριδώματα διατηρούνται σε καλλιέργεια για λίγες σχετικά γενιές, καθώς υφίστανται γρήγορα φαινόμενα χρωμοσωματικής αστάθειας. Έτσι, θα πρέπει να παγώνονται για τη φύλαξή τους σχετικά γρήγορα, ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται η συνεχής ψύξη και απόψυξη των κυττάρων. Για την ψύξη των υβριδωμάτων ακολουθούνται τα βήματα 1-3 της διαδικασίας αραίωσης των κυττάρων (βλ. παραπάνω), αναδιαλύοντας τελικά τα κύτταρα (περίπου $0,5 \times 10^6$ - 10^7 κύτταρα) σε διάλυμα 90%FCS/10%DMSO. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε κρυο-φυαλίδια τα οποία ψύχονται σταδιακά στους -80°C και φυλάσσονται στο υγρό άζωτο.

A.2.3 Συλλογή αντισώματος από καλλιέργειες υβριδωμάτων

Στην περίπτωση που τα υβριδώματα μεγαλώνουν ιδανικά θα πρέπει, από τη στιγμή που αποψύχονται, με την ολοκλήρωση δύο αραιώσεων (splits) να έχουν μεταφερθεί σε τρυβλία 6-πηγαδίων (6-well plates) με συγκέντρωση 2,5% HCF. Το υπερκείμενο της καλλιέργειας μπορεί να συλλεχθεί και στη φάση αυτή, καθώς δε φάνηκε ο παράγοντας HCF να επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και τη λειτουργικότητα του αντισώματος, τουλάχιστον για τις τεχνικές του ανοσοφθορισμού και αμοσοαποτυπώματος Western blot στις οποίες δοκιμάστηκε. Τα υβριδώματα μπορούν να μεταφερθούν σε ακόμα μεγαλύτερα τρυβλία ή μικρές φλάσκες, αφαιρώντας εντελώς τον HCF (0%) για συλλογή του αντισώματος. Μία τυπική πορεία για τη συλλογή του μονοκλωνικού αντισώματος συνοψίζεται στην εικόνα 3.3.

Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση της τυπικής πορείας μιας καλλιέργειας υβριδωμάτων, με σκοπό τη συλλογή του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου και την απομόνωση του μονοκλωνικού αντισώματος (Tissue Culture SuperNatant ή TCSN).

Για τη συλλογή του αντισώματος ακολουθείται γενικότερα η εξής πορεία: στην τελευταία αραιώση των κυττάρων (γενιά P3 ή P4) προσθέτεται μια λογική ποσότητα θρεπτικού μέσου στα πηγάδια (π.χ 2 ml/πηγάδι σε 6-well plate) και ακολουθεί επώαση των υβριδωμάτων για αρκετές μέρες (τουλάχιστον 5), χωρίς την πραγματοποίηση ενδιάμεσως καμίας αλλαγής θρεπτικού μέσου. Όσο περισσότερο επωάζονται τα κύτταρα σε υψηλή πυκνότητα (και θεωρητικά υφίστανται έντονο καλλιεργητικό στρες), τόσο μεγαλύτερο τίτλο αντισώματος παράγεται στο υπερκείμενο στο τέλος. Ακολουθεί συλλογή του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου, φυγοκέντρηση και φύλαξη του υπερκείμενου. Το αντίσωμα είναι έτοιμο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει. Απαραίτητη είναι η προσθήκη 1/20 του όγκου του αντισώματος διαλύματος 1M Tris-Cl (pH=8)

για τη ρύθμιση του pH, καθώς επίσης και 0,02 % τελικής συγκέντρωσης του βακτηριοστατικού NaN₃. Το αντίσωμα μπορεί να φυλαχτεί στους -80°C, -20 °C ή στους 4°C για καθημερινή χρήση.

Στην περίπτωση που το μονοκλωνικό δεν αποδειχτεί λειτουργικό με απευθείας χρήση του από τα υπεκείμενα θρεπτικό διάλυμα των υβριδωμάτων (TCSN-Tissue Culture-Supernatant), υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω καθαρισμού του και ταυτόχρονα συγκέντρωσής του με πέρασμα από κολώνα σφαιριδίων πρωτεΐνης A, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει ανοσοσφαιρίνες IgG με υψηλή συγγένεια.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΤΗΣ GEMININ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ RNA (RNA interference ή RNAi)

B.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η διαδικασία της παρεμβολής RNA (RNAi) για την γενετική αποσιώπηση της έκφρασης της Geminin σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους: 1) με διαμόλυνση των κυττάρων με μικρά συνθετικά 19μερή δίκλωνων ολιγονουκλεοτίδια (siRNA), και 2) με διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς pSUPER (plasmid for SUPpression of Endogenous RNA) που στοχεύουν ειδικά το mRNA της Geminin.

B.2 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ GEMININ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ siRNA ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

B.2.1 Γενικά

Ένας κλασσικός τρόπος εξάλειψης της έκφρασης γονιδίων αποτελεί σήμερα η χορήγηση στα κύτταρα μικρών συνθετικών δίκλωνων RNA μορίων, μήκους 19-21 ριβονουκλεοτιδίων, γνωστά ως siRNA ολιγονουκλεοτίδια (Elbashir et al., 2001). Τα RNA μόρια αυτά είναι συμπληρωματικά προς το mRNA του γονιδίου-στόχου (στη συγκεκριμένη περίπτωση της Geminin), με αποτέλεσμα, να προσδένονται σε αυτό και, μέσω ενεργοποίησης του RISC συμπλόκου, να το οδηγούν σε καταστροφή.

Στα RNAi πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι siRNA ολιγονουκλεοτίδια:

siRNA	αλληλουχία
Geminin 1	5'-CUG GCA GAA GUA GCA GAA C- 3'
Geminin 2	5' -C UUC CAG CCC UGG GGU UAU- 3'
Cdt1	5' -CGU GGA UGA AGU ACC CGA C- 3'
Luciferase (GL2) (siRNA-μάρτυρας)	5' -CGU ACG CGG AAU ACU UCG A- 3'

Πίνακας 3.3: Τα siRNA που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή και οι αλληλουχίες τους.

B.2.2 Πρωτόκολλα διαμόλυνσης ανθρώπινων κυττάρων με siRNA ολιγονουκλεοτίδια με τη χρήση λιποσωμάτων (lipofection)

Η είσοδος των siRNA ολιγονουκλεοτιδίων στα καλλιεργούμενα κύτταρα έγινε με τη χρήση λιποσωμάτων. Ανάλογα με την κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί τύποι λιποσωμάτων της Invitrogen (LipofectamineTM 2000 με cat. no. 11668-027 και OligofectamineTM με cat. No. 12252-011) και πρωτόκολλα, ακολουθώντας σε γενικές γραμμές τις οδηγίες του κατασκευαστή (πίνακας 3.4).

Κυτταρική σειρά	Προτεινόμενο κιτ λιποσωμάτων (Invitrogen)	Πυκνότητα καλλιέργειας ημέρα διαμόλυνσης	Τελική την συγκέντρωση της διαλύματος siRNA	Θρεπτικό μέσο μία μέρα πριν την διαμόλυνση
U2OS	Λιποφεκταμίνη 2000	30-40%	100 mM	Χωρίς αντιβιοτικά
MCF7	Ολιγοφεκταμίνη	30-40%	100 mM	Πλήρες
HeLa	Ολιγοφεκταμίνη	30-40%	200 mM	Χωρίς αντιβιοτικά
Πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες ούλου	Λιποφεκταμίνη 2000	50-60%	100 mM	Πλήρες

Πίνακας 3.4: Συνθήκες διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων με siRNA ολιγονουκλεοτίδια. Το διάλυμα-αποθήκευσης (stock) των siRNA ολιγονουκλεοτιδίων είναι 100 mM, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε διπλή διαμόλυνση των κυττάρων εντός 24ώρου.

B.2.2.α Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση Ολιγοφεκταμίνης

Το βασικό* πρωτόκολλο διαμόλυνσης κυττάρων με ολιγοφεκταμίνη έχει ως εξής:

1. Την προηγούμενη μέρα πραγματοποιείται αραίωση των κυττάρων (split) έτσι ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να έχουν την επιθυμητή πυκνότητα, ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε σειράς. Για ορισμένες κυτταρικές σειρές συνίσταται η χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς αντιβιοτικά την ημέρα πριν την διαμόλυνση (βλ.πίνακα 3.4).
 2. Διάλυση 1 μl RNAi ολιγονουκλεοτιδίου σε 184 μl ειδικού θρεπτικού μέσου Opti-MEM (Gibco, cat. No. 31985-047), χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό.
 3. Διάλυση 3 μl ολιγοφεκταμίνης σε 12 μl Opti-MEM.
 4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
 5. Ανάμειξη των δύο παραπάνω διαλυμάτων (σύνολο μίγματος διαμόλυνσης = 200 μl). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min.
 6. Ξέπλυμα των κυττάρων εις διπλούν με 1xPBS και προσθήκη 800 μl DMEM (χωρίς ορό, χωρίς αντιβιοτικά).
 7. Προσθήκη του μίγματος διαμόλυνσης στα κύτταρα. Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 5 h.
 8. Προσθήκη 500 μl πλήρους θρεπτικού μέσου με τριπλάσια συγκέντρωση ορού (30%), έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να γίνει και πάλι 10%.
 9. Επώαση των κυττάρων στους 37°C μέχρις ότου να γίνει η συλλογή τους για πειραματική ανάλυση (συνήθως μεταξύ 24-72h).
- (*Το βασικό πρωτόκολλο προβλέπει τελική συγκέντρωση siRNA ολιγονουκλεοτιδίου 100 μM).

B.2.2.β Διαμόλυνση κυττάρων με τη χρήση Λιποφεκταμίνης 2000

Το πρωτόκολλο διαμόλυνσης κυττάρων με λιποφεκταμίνη έχει ως εξής:

1. Την προηγούμενη μέρα πραγματοποιείται αραίωση των κυττάρων (split) έτσι ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να έχουν την επιθυμητή πυκνότητα, ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε σειράς. Για ορισμένες κυτταρικές σειρές συνίσταται η χρήση θρεπτικού μέσου χωρίς αντιβιοτικά την ημέρα πριν την διαμόλυνση (βλ.πίνακα 3.4).

3. Υλικά και Μέθοδοι

2. Διάλυση 2 μ l RNAi ολιγονουκλεοτιδίου σε 250 μ l ειδικού θρεπτικού μέσου Opti-MEM (Gibco, cat. No. 31985), χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό.
3. Διάλυση 4-5 μ l ολιγοφεκταμίνης σε 12 μ l Opti-MEM.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
5. Ανάμειξη των δύο παραπάνω διαλυμάτων (σύνολο μίγματος διαμόλυνσης = 500 μ l). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
6. Ξέπλυμα των κυττάρων εις διπλούν με 1xPBS και προσθήκη 1,5 ml DMEM (χωρίς ορό, χωρίς αντιβιοτικά).
7. Προσθήκη του μίγματος διαμόλυνσης στα κύτταρα. Επώαση των κυττάρων στους 37°C για 5 h.
8. Ξέπλυμα των κυττάρων εις διπλούν με διάλυμα 1xPBS και προσθήκη επιθυμητού όγκου πλήρους θρεπτικού μέσου 10% σε ορό.
9. Επώαση των κυττάρων στους 37°C μέχρις ότου να γίνει η συλλογή τους για πειραματική ανάλυση (συνήθως 24-72 h).

Τα παραπάνω πρωτόκολλα αναφέρονται στη διαμόλυνση κυττάρων σε τρυβλία 6 πηγαδίων (6-well plates, Corning).

B.3 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ GEMININ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ PSUPER ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

B.3.1 Γενικά

Πρόκειται για μια τεχνολογία αποσιώπησης της έκφρασης γονιδίων που αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα (2002) από τους Brummelkamp και τους συνεργάτες του (Brummelkamp et al., 2002) και η οποία στηρίζεται στην κατασκευή πλασμιδιακών οχημάτων pSUPER και pR-SUPER (ρετροϊκών και μη), με την ικανότητα να παράγουν -κατά τη μεταγραφή τους στα κύτταρα- ένα πρώιμο 64μερές RNA με δομή φουρκέτας (shRNA). Αυτό με τη σειρά του, αφού υποστεί τις κατάλληλες τροποποιήσεις, δημιουργεί μικρά δίκλωνα μόρια RNA της μορφής των siRNA, ικανών να ενεργοποιήσουν κατά τον ίδιο τρόπο το RNAi-μονοπάτι (εικόνα 3.4). Η κατασκευή των ειδικών για την εξάλειψη της Geminin πλασμιδιακών φορέων pSUPER πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Δρ. Reuven Agami, στο τμήμα Βιολογίας του Καρκίνου του NKI (National Cancer Institute) στο Άμστερνταμ της Ολλανδίας.

Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του pSUPER συστήματος γενετικής αποσιώπησης γονιδίων. Φαίνεται η πορεία *in vivo* σύνθεσης του shRNA ενός υποτιθέμενου γονιδίου, το οποίο με την κατάλληλη τροποποίηση θα μετατραπεί σε 19μερή siRNA μόρια που θα ενεργοποιήσουν το RISC σύμπλοκο - και μέσω αυτού- το μονοπάτι RNAi.

B.3.2 Επιλογή των αλληλουχιών-στόχευσης του mRNA της Geminin

Η κατασκευή των pSUPER-οχημάτων για την Geminin προϋποθέτει την κλωνοποίηση ειδικών 64-μερών DNA oligονουκλεοτιδίων στο πλασμιδιακό όχημα pSUPER. Τα μεγάλα oligονουκλεοτίδια (Sigma) αποτελούνται από την 19-μερή αλληλουχία-στόχο καθώς και τη συμπληρωματική της, διαχωριζόμενες από μια θηλειά 9 νουκλεοτιδίων. Στα άκρα τους φέρνουν θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού (BglIII και HindIII) για την εύκολη ένθεσή τους στο πλασμιδιακό όχημα (πίνακας 3.5).

Η ακριβής αλληλουχία των 64-μερών oligονουκλεοτιδίων που παραγγέλθηκαν ήταν η εξής:

Ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία (5'-3')
oligo # 1 forward	GATC CCC AGA GAA TAT AAA GAA TAG T TTCAAGAGA A CTA TTC TTT ATA TTC TCT TTTTT
reverse	AGCT AAAAAA AGA GAA TAT AAA GAA TAG T TCTCTTGAA A CTA TTC TTT ATA TTC TCT GGG
oligo # 2 forward	GATC CCC CCC AGG AGT CAT TTG ATC T TTCAAGAGA A GAT CAA ATG ACT CCT GGG TTTTT
reverse	AGCT AAAAA CCC AGG AGT CAT TTG ATC T TCTCTTGAA A GAT CAA ATG ACT CCT GGG GGG
oligo # 3 forward	GATC CCC TCC ATC CTC TCA GTA TTG G TTCAAGAGA C CAA TAC TGA GAG GAT GGA TTTTT
reverse	AGCT AAAAA TCC ATC CTC TCA GTA TTG G TCTCTTGAA C CAA TAC TGA GAG GAT GGA GGG
oligo # 4 forward	GATC CCC CCA CTT AAC ATC TAC AAC T TTCAAGAGA A GTT GTA GAT GTT AAG TGG TTTTT
reverse	AGCT AAAAA CCA CTT AAC ATC TAC AAC T TCTCTTGAA A GTT GTA GAT GTT AAG TGG GGG
oligo # 5 forward	GATC CCC TGC AAA GCC ATG TAT ATG A TTCAAGAGA T CAT ATA CAT GGC TTT GCA TTTTT
reverse	AGCT AAAAA TGC AAA GCC ATG TAT ATG A TCTCTTGAA T CAT ATA CAT GGC TTT GCA GGG
oligo PG1 forward	GATC CCC CTG GCA GAA GTA GCA GAA C TTCAAGAGA G TTC TGC TAC TTC TGC CAG TTTTTGGAAA
reverse	AGCT TTTCCAAAAA CTG GCA GAA GTA GCA GAA C TCTCTTGAA G TTC TGC TAC TTC TGC CAG GGG
oligo PG2 forward	GATC CCC CTT CCA GCC CTG GGG TTA T TTCAAGAGA A TAA CCC CAG GGC TGG AAG TTTTTGGAAA
reverse	AGCT TTTCCAAAAA CTT CCA GCC CTG GGG TTA T TCTCTTGAA A TAA CCC CAG GGC TGG AAG GGG

Πίνακας 3.5: Οι αλληλουχίες των 64μερών ολιγονουκλεοτιδίων (forward και reverse από την Sigma) που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των (επτά) διαφορετικών pSUPER κασετών της Geminin στο pSUPER-πλασμιδιακό όχημα. Με έντονα γράμματα σημειώνονται τα τμήματα των αλληλουχιών που χρησιμεύουν για τον σχηματισμό των θέσεων περιορισμού στα άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων, καθώς και η κεντρική περιοχή που αντιστοιχεί στην 9μερή θηλεία του σχηματιζόμενου shRNA. Με κόκκινο σημειώνεται η

3. Υλικά και Μέθοδοι

ακριβής αλληλουχία που χρησιμεύει για τη σύνδεση των άκρων των δίκλωνων ολιγονουκελοτιδίων με τα αντίστοιχα κομμένα άκρα του pSUPER οχήματος (δηλ. τα “overhangs” των ενζύμων περιορισμού, που είναι: 5’ GATC=overhang του ενζύμου BglII και 5’ AGCT=overhang του ενζύμου HindIII).

Κατασκευάστηκαν συνολικά επτά (7) τέτοια οχήματα που στοχεύουν διαφορετικές περιοχές του mRNA της Geminin (σήμανση με κόκκινο στην εικόνα 3.5), δύο εκ των οποίων (τα oligos PG1 και PG2) ταυτίζονται με τις αλληλουχίες στόχευσης των siRNAs μορίων (Geminin1 και Geminin 2 αντίστοιχα) που είδαμε προηγουμένως. Οι ακριβείς αλληλουχίες-στόχοι στο mRNA της Geminin προσδιορίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος “iRNAi-tool”. Στο πρόγραμμα εισάγεται το cDNA του γονιδίου-στόχου (NM_015895) κι εκείνο, λαμβάνοντας υπόψιν πολλές παραμέτρους, όπως εύρεση μοτίβου της μορφής AA-[N]19-TT, 45-55% περιεκτικότητα σε GC, θερμοδυναμικά κριτήρια των άκρων των αλληλουχιών για τη σταθερότητα του shRNA, αποφυγή εύρεσης αλληλουχιών στην αρχή ή στα UTRs του μεταγράφου, προτείνει το λιγότερο 3 πιθανές αλληλουχίες-στόχους.

Εικόνα 3.5: Με κόκκινο σημειώνονται οι 7 διαφορετικές περιοχές στόχευσης του mRNA της Geminin όπως επιλέχθηκαν βάσει του προγράμματος iRNAi-tool (Macintosh).

B.3.3 Πορεία κλωνοποίησης των Geminin-pSUPER πλασμιδίων

Για την κατασκευή των pSUPER-οχημάτων της Geminin ακολουθήθηκε η εξής πορεία:

- **Αναδιάταξη των ολιγονουκλεοτιδίων (annealing)**

1. Αναδιάλυση των ολιγονουκλεοτιδίων (παραγγελία σε κλίμακα 0,05 μM από την εταιρία Sigma) σε 50 μl αποστειρωμένο milli-Q- H_2O (δίνει συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίων περίπου 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
2. Ανάμειξη 1 μl από το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο (forward και reverse).
3. Προσθήκη 48 μl διαλύματος αναδιάταξης (annealing buffer).
4. Επώαση στους 95°C για 4 min.
5. Επώαση στους 70°C για 10 min.
6. Επώαση σε σταδιακά μειούμενη θερμοκρασία για διάστημα περίπου 2 h (μέχρι η θερμοκρασία πέσει στους 4°-10°C).
7. Τα δίκλωνα ολιγονουκλεοτίδια μπορούν στο σημείο αυτό να φυλαχτούν στους -20°C.

Σύσταση διαλύματος επαναδιάταξης (annealing buffer): 100 μM CH_3COOK (οξικό κάλιο), 30 mM HEPES-KOH, pH=7,4, 2 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ (οξικό μαγνήσιο).

- **Φωσφορυλίωση των αναδιαταγμένων ολιγονουκλεοτιδίων**

1. Προσθήκη σε ένα δοκιμαστικό σωληνάκι τύπου erppendorf 2 μl από διάλυμα των αναδιαταγμένων ολιγονουκλεοτιδίων.
2. Προσθήκη 1 μl 10x διαλύματος T4 PNK (polynucleotide kinase).
3. Προσθήκη 1 μl ATP.
4. Προσθήκη 1 μl ενζύμου T4 PNK (10U/ μl).
5. Προσθήκη 5 μl αποστειρωμένου milli-Q- H_2O .
8. Επώαση στους 37°C για 30min.
9. Επώαση στους 70°C για 10min (βήμα απενεργοποίησης του ενζύμου T4 PNK).

- **Προετοιμασία του pSUPER οχήματος: Κατάτμηση με τα ένζυμα BglII και HindIII και αποφωσφορυλίωσή του**

Η αντίδραση κατάτμησης του οχήματος pSUPER έγινε ως εξής:

πλασμιδιακό DNA pSUPER	X μl (~3μg)
10x ρυθμιστικό διάλυμα (SuRE/Cut buffer B)	2,5 μl
BglII	1 μl (1U)
HindIII	1 μl (1U)
milli-Q H₂O	X μl
σύνολο	25 μl

Πίνακας 3.5: Αντίδραση κατάτμησης του οχήματος pSUPER, με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και BglII.

Ακολουθεί επώαση της αντίδρασης κατάτμησης στους 37°C για 1h. Εν συνεχεία, γίνεται η αποφωσφορυλίωση του κατατμημένου οχήματος για την αποφυγή επανακυκλοποίησής του. Αυτό γίνεται με την προσθήκη 1μl φωσφατάσης CIP (Calf Intestine Phosphatase, Roche) στον όγκο των 25μl όπου πραγματοποιήθηκε προηγουμένως η κατάτμηση, κι επώαση στους 37°C για 30min. Ακολουθεί ανάλυση των προϊόντων κατάτμησης και αποφωσφορυλίωσης σε πήκτωμα αгарόζης και απομόνωση του κατατμημένου οχήματος από το πήκτωμα με ειδικό κιτ της εταιρίας Qiagen (gel extraction kit, Cat. No. 28706), σύμφωνα με τις περιεχόμενες οδηγίες.

- **Σύνδεση των αναδιαταγμένων-φωσφορυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων με το κατατμημένο και αποφωσφορυλιωμένο όχημα pSUPER (ligation)**

Για τη σύνδεση του οχήματος pSUPER με τα ολιγονουκλεοτίδια πραγματοποιήθηκε αντίδραση συνδετάσης, ως εξής:

1. Προσθήκη σε ένα δοκιμαστικό σωληνάκι τύπου eppendorf 1μl από τα αναδιαταγμένα και φωσφορυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια.
2. Προσθήκη 1 μl διαλύματος T4 συνδετάσης (10x T4 ligation buffer, Roche).

3. Υλικά και Μέθοδοι

3. Προσθήκη 0,5 μ l οχήματος pSUPER, που προηγουμένως κατατημήθηκε, αποφωσφορυλιώθηκε και απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης.
4. Προσθήκη 6,5 μ l milli-Q-H₂O.
5. Προσθήκη 1 μ l ενζύμου T4 συνδετάσης (Roche).
6. Επώαση στους 16°C όλη τη νύχτα (o/n).

Ως μάρτυρα της αντίδρασης συνδετάσης χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση απουσία των αναδιαταγμένων φωσφορυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων. Όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Roche

- **Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με το προϊόν της αντίδρασης συνδετάσης**

Η διαδικασία με την οποία πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με το προϊόν της αντίδρασης συνδετάσης ήταν η εξής:

1. Χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά *E.coli* βακτήρια HB101 (Promega) με γονότυπο: F⁻, *thi*-1, *hsdS*20 (r_B⁻, m_B⁻), *supE*44, *recA*13, *ara*-14, *leuB*6, *proA*2, *lacY*1, *galK*2, *rpsL*20 (str^r), *xyl*-5, *mtl*-1 και υψηλή απόδοση μετασχηματισμού (10⁸ cfu/ μ g). Απόψυξη της επιθυμητής ποσότητας βακτηρίων (50 μ l κυττάρων ανά αντίδραση μετασχηματισμού).
2. Προσθήκη ολόκληρης της αντίδρασης συνδετάσης στα δεκτικά κύτταρα *E. coli* (τα κύτταρα που αντιπροσωπεύουν τον αρνητικό μάρτυρα του μετασχηματισμού δεν προσθέτεται καθόλου DNA).
3. Ελαφριά ανακίνηση.
4. Επώαση στον πάγο για 20-30 min.
5. Θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42°C για 90 sec.
6. Επώαση ξανά στον πάγο για 2 min.
7. Προσθήκη 900 μ l προ-θερμασμένου θρεπτικού μέσου LB χωρίς αντιβιοτικό και ανάκαμψη των βακτηρίων με επώαση για 1 h στους 37°C (υπό ανάδευση).
8. Φυγοκέντρηση των βακτηρίων και απόρριψη του υπερκείμενου. Αναδιάλυση των κυττάρων σε 200 μ l θρεπτικού μέσου LB κι επίστρωσή τους σε τρυβλία LB-άγαρ παρουσία του αντιβιοτικού αμικικιλίνη. Επώαση των τρυβλίων στους 37°C, για όλο το βράδυ.

9. Την επόμενη μέρα, γίνεται επιλογή κάποιων θετικών αποικιών κι έλεγχος του πλασμιδιακού τους DNA για την επιθυμητή ένθεση.

- **Απομόνωση βακτηριακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-preps)**

Η απομόνωση του DNA των βακτηρίων (αποικιών) που επέζησαν της δράσης του αντιβιοτικού μετά τον μετασχηματισμό σε μικρή κλίμακα (mini-preps) έγινε με kit της εταιρίας Qiagen (Cat. No. 27106) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκλουση του δεσμευμένου-στην στήλη ιοντο-ανταλλαγής-DNA συνίσταται να γίνεται με αποστειρωμένο προθερμασμένο milli-Q H₂O, για την επίτευξη μεγαλύτερης τελικής συγκέντρωσης απομονωθέντος DNA.

- **Απομόνωση βακτηριακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (midi-preps)**

Η απομόνωση DNA βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα έγινε με το αντίστοιχο kit της εταιρίας Qiagen (Cat. No. 12145) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ομοίως, για την επίτευξη μεγαλύτερης τελικής συγκέντρωσης απομονωθέντος DNA, η έκλουση του δεσμευμένου-στην στήλη ιοντο-ανταλλαγής-DNA συνίσταται να γίνεται με αποστειρωμένο milli-Q H₂O που έχει προηγουμένως θερμανθεί.

- **Έλεγχος της ύπαρξης σωστού ένθετου στις αποικίες των βακτηρίων**

Ο έλεγχος της επιτυχούς έκβασης της κλωνοποίησης έγινε με δύο τρόπους:

- A) Με δοκιμαστική κατάτμηση των απομονωμένων πλασμιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα EcoRI και XhoI, που αναγνωρίζουν εξώτερες θέσεις περιορισμού από εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ένθεση (εικόνα 3.6).

Εικόνα 3.6: Σχηματικά η θέση όπου έγινε η κλωνοποίηση της shRNA της Geminin και οι περιοριστικές θέσεις στην περιοχή του πολυσυνδέτη που αξιοποιήθηκαν. Με μαύρο χρώμα αναγράφονται τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την ένθεση της shRNA-κασέτας στο όχημα και με κόκκινο αυτά με τα οποία έγινε η δοκιμαστική κατάτμηση για τον έλεγχο της ύπαρξης του σωστού ενθέτου.

Η ακριβής αντίδραση δοκιμαστικής κατάτμησης που πραγματοποιήθηκε είναι:

βακτηριακό DNA (mini-prep)	10-15 μ l
10x ρυθμιστικό διάλυμα (SuRE/Cut buffer H)	2 μ l
EcoRI	0,75 μ l
XhoI	0,75 μ l
milli-Q H₂O	1,5-6,5 μ l
σύνολο	20 μ l

Πίνακας 3.6: Αντίδραση κατάτμησης του οχήματος pSUPER, με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και BglII

Ακολουθεί επώαση της δοκιμαστικής κατάτμησης στους 37°C για 1 h. Οι θετικές αποικίες (που περιέχουν, δηλαδή την shRNA κασέτα του γονιδίου-στόχου) δίνουν προϊόν μεγέθους 308 kb, σε αντίθεση με τα κύτταρα που έχουν προσλάβει άδειο όχημα (από επανακυκλοποίησή του), τα οποία δίνουν προϊόν μεγέθους 248 kb (εικόνα 3.7). Για τον έλεγχο αυτό, απαιτείται η χρησιμοποίηση πηκτώματος αгарόζης υψηλής αναλυτικής ικανότητας (τουλάχιστον 2-2,5% αгарόζη).

Εικόνα 3.7: Παράδειγμα θετικού (+) και αρνητικού (-), ως προς το ένθεμα της pSUPER-κασέτας, δείγματος πλασμιδιακού DNA, μετά την ανάλυση σε πήκτωμα 2.5% σε αγαρόζη και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (EthBr). Αριστερά των δειγμάτων, το DNA-μάρτυρας μοριακών μεγεθών (nt).

B) Με αλληλούχιση του πλασμιδιακού DNA των βακτηρίων χρησιμοποιώντας εκκινητή T7 που προσδένεται ανοδικά της EcoRI θέσης.

B.3.4 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με ηλεκτρο-διάτρηση

Για την παροδική διαμόλυνση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (U2OS και MCF7 στο κεφάλαιο Γ των αποτελεσμάτων) με τα pSuper-πλασμίδια της Geminin πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση με το μηχάνημα της Biorad, 'Gene-Pulser II X cell', που επεικονίζεται στην εικόνα 3.8.

Εικόνα 3.8 : Ο ηλεκτροδιατρητής ευκαρυωτικών κυττάρων της Biorad, Gene-Pulser II X cell.

Οι ρυθμίσεις του μηχανήματος ηλεκτροδιάττησης Gene-Pulser X cell II είχαν ως εξής:

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ «ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΩΝ ΚΥΜΑΤΩΝ» («square-wave protocol»)	
Συνολικά Volts	140
% mod	100
DC Ampl (V)	070
RF freq. (kHz)	040
Burst dur. (msec)	01,5
No. burst	015
Burst interv. (sec)	01,5
timer	000

Πίνακας 3.7: Βασικές ρυθμίσεις του οργάνου της Biorad “Gene-Pulser X cell” για την επίτευξη της ηλεκτροδιάτρησης των κυτταρικών σειρών με τη χρήση “square-wave” πρωτοκόλλου.

Η επιλογή του συγκεκριμένης μορφής ηλεκτρικού παλμού («square-wave pulses») έναντι της «exponential decay» μορφής κυμάτων έγινε εμπειρικά (για τις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές το «square wave pulses» πρωτόκολλο έδινε μεγαλύτερο ποσοστό διαμολυσμένων κυττάρων). Οι κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν επιτυχώς (σε ποσοστό > 60-70%) με αυτό το πρωτόκολλο ήταν οι HeLa, MCF7 και U2OS. Η κυβέτα που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαμετρήματος 1 μ M (Biorad).

Αναλυτικά η πορεία διαμόλυνσης ανθρώπινων κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση είχε ως εξής:

1. Μία-δύο μέρα-ες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται κατάλληλη αραίωση των κυττάρων (split), έτσι ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης τα κύτταρα να εμφανίζουν 70-80% πυκνότητα.
2. Ακολουθούνται τα βήματα 1 και 2 του πρωτοκόλλου για την αραίωση κυττάρων (split).
3. Προσθήκη 500-600 μ l διαλύματος ηλεκτροδιάτρησης (2 mM HEPES (pH=7,2), 15 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 250 mM μανιτόλη, 1 mM $MgCl_2$, τελικό pH=7,2) και σύντομη, ήπια αναδιάλυση των κυττάρων, για κάθε 10cm τρυβλίο.
4. Σε σωληνάκια τύπου erppendorf έχουν ήδη τοποθετηθεί τα DNA με τα οποία θα γίνει η διαμόλυνση των κυττάρων (1-2 μ g DNA ανά ηλεκτροδιάτρηση). Εκτός από τα πειραματικά μας DNA, χρησιμοποιείται ένα επιπλέον δείγμα DNA ως μάρτυρας του ποσοστού διαμόλυνσης των κυττάρων (π.χ άδειο όχημα GFP).
5. Προσθήκη 100 μ l κυττάρων ανά ηλεκτροδιάτρηση (σε σωλήνα τύπου erppendorf) κι ακολουθεί ήπια και σύντομη ανάδευση με μικροπιπέτα.

6. Το μίγμα των κυττάρων με το DNA μεταφέρεται γρήγορα στην ειδική κυβέτα ηλεκτροδιάτρησης. Ακολουθεί ηλεκτροδιάτρηση σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Biorad).
7. Τέλος, γίνεται η προσθήκη 0,5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στην κυβέτα και προσπάθεια συλλογής όλου του όγκου των κυττάρων που είχαν τοποθετηθεί αρχικά στην κυβέτα. Υπολογίζεται, τέλος, ο επιθυμητός όγκος κυττάρων προς επίστρωση και το μέγεθος του τρυβλίου, προκειμένου τα επιστρωθέντα κύτταρα να έχουν τον απαραίτητο χώρο για την ανάπτυξή τους τις επόμενες 48-72 h, οπότε και συλλέγονται για ανάλυση.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (MEF)

Γ.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ GEMININ ΚΙ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (MEF)

Στα πλαίσια της διερεύνησης του *in vivo* ρόλου της Geminin στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των συστημάτων του ποντικού, δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών μεταλλαγμένα ποντίκια που έφεραν αδρανοποίηση του ενός αλληλομόρφου της Geminin ύστερα από αφαίρεση του 3^{ου} και 4^{ου} εξωνίου της (με τη μέθοδο του στοχευμένου ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα-ES cells) (Κοταντάκη, Π., Διδακτορική Διατριβή). Τα ζώα αυτά αξιοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, για την απομόνωση εμβρυονικών ινοβλαστών (MEF) με στόχο την χρησιμοποίησή τους σε λειτουργικά πειράματα κυτταρικής γήρανσης. Οι MEF θεωρούνται ένα έξοχο σύστημα φυσιολογικών (μη αθανатоποιημένων) κυττάρων για τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων. Επιπλέον, απομονώνονται πολύ εύκολα από knock-out ή ετερόζυγα για κάποιο γονίδιο ζώα, κι έτσι, θεωρούνται ιδανικό κυτταρικό σύστημα για μελέτες απώλειας γονιδίων (“loss of function”).

Για την παραγωγή των ετερόζυγων για Geminin και των αγρίου τύπου MEF, θηλυκά ετερόζυγα ποντίκια διασταυρώθηκαν με αρσενικά αγρίου τύπου και οι ινοβλάστες απομονώθηκαν από τα έμβρυα την 13^η προς 14^η ημέρα της κύησης με μια διαδικασία που, συνοπτικά, περιλαμβάνει την αφαίρεση των μαλακών οργάνων και των σπλάχνων του εμβρύου (ήπαρ, έντερο, εγκέφαλος), τον τεμαχισμό του υπόλοιπου εμβρύου, την επίδραση διαλύματος τρυψίνης και την καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα που κατά κύριο λόγο ξεφεύγουν στο θρεπτικό μέσο από τα κομμάτια του εμβρυικού ιστού και μεγαλώνουν στο τρυβλίο είναι οι MEF (οι ινοβλάστες αυτοί θεωρούνται

γενιάς P0). Εν συνεχεία, ακολουθεί γονοτύπηση των MEF με PCR για το διαχωρισμό των ετερόζυγων από τα κύτταρα αγρίου τύπου (Κοταντάκη, Π., Διδακτορική Διατριβή).

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν οι MEF κρατήθηκαν σε καλλιέργεια το πολύ μέχρι τη 6^η-7^η γενιά, αφού στη συνέχεια μεταπίπτουν συνήθως σε μια κατάσταση γνωστή ως «κρίση», οπότε και σταματούν να πολλαπλασιάζονται (Todaro and Green, 1963), ενώ λιγότερο συχνή είναι και η πιθανότητα να υποστούν «αθανатоποίηση» με την απώλεια κάποιων βασικών μονοπατιών ρύθμισης του πολλαπλασιασμού, όπως του p53 ή του p19 (Harvey et al., 1996; Kamijo et al., 1997).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν για την απομόνωση και την γονοτύπηση των MEF περιγράφονται στη διδακτορική διατριβή της Πανωραίας Κοταντάκη (Κοταντάκη, Π., Διδακτορική Διατριβή).

Γ.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (MEF)

Γ.2.1 Υλικά

Τα απαραίτητα διαλύματα για τη διατήρηση των MEF σε καλλιέργεια είναι τα εξής:

- Θρεπτικό υλικό για MEF:

Συστατικά	Στα 500ml
DMEM (Gibco, 41966-029)	450 ml
10% ορός FBS	50 ml
Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη/γλουταμίνη*	7,5 ml

* Παρασκευάζεται μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης/γλουταμίνης ως εξής:

Αναμειγνύονται 5 ml γλουταμίνης (100x από την Gibco, Cat. No. 25030—024) με 2,5 ml πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Sigma, Cat. No. P-7539).

3. Υλικά και Μέθοδοι

- Τρυψίνη για MEF:

Για 1lt stock διάλυμα τρυψίνης αναμειγνύονται τα εξής:

Συστατικά	Ποσότητες
Σκόνη τρυψίνης (trypsin powder, Gibco, porcine, 27250-018)	2,5 gr
EDTA	0,4 gr
NaCl	7 gr
Na ₂ HPO ₄ / Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0,119 gr/0,22 gr
K ₂ HPO ₄	0,24 gr
KCl	0,37 gr
D-γλυκόζη	1 gr
Phenol Red (Sigma, Cat. No. P-0290)	1 M (τελική συγκέντρωση)
Trizma base	3 gr

Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7,6. Το διάλυμα αποστειώνεται με διήθηση και αποθηκεύεται στους -20°C.

Για τη διάσπαση των εμβρύων χρησιμοποιείται η τρυψίνη αυτή ως έχειν, ενώ για την αποκόλληση των εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού από τα τρυβλία (split) χρησιμοποιείται αραιωμένη τρυψίνη 1:3 σε διάλυμα 1xPBS.

- Διάλυμα ψύξης των MEF:

Για το πάγωμα των εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού φτάχνουμε το εξής διάλυμα: 15% FBS, 10%DMSO σε DMEM (θρεπτικό μέσο). Για 10 ml διαλύματος παγώματος αναμειγνύουμε τα εξής:

Συστατικά	Στα 500ml
Πλήρες θρεπτικό μέσο των MEFs	8,5 ml
10% ορός FBS	0,5 ml
DMSO (Sigma, Cat.No. D-2650)	1 ml

Γ.2.2 Μέθοδοι διαχείρισης καλλιιεργειών των εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού (MEF)

• Απόψυξη των MEF

Η απόψυξη των κυττάρων MEF από τους -80°C ή το υγρό άζωτο γίνεται ως εξής:

- 1 Κυκλική ανακίνηση και ανάδευση του ειδικού σωληναρίου (cryovial) που περιέχει τα κύτταρα σε υδατόλουτρο στους 37°C , μέχρι τήξεως του πάγου.
- 2 Πριν την πλήρη απόψυξη, τα κύτταρα μεταφέρονται σε 15άρι falcon, γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητας θρεπτικού μέσου και φυγοκεντρούνται στα 800rpm για 4 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- 3 Αναδιάλυση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, και μεταφορά σε τρυβλίο ή φλάσκα. Ήπια κυκλική ανάδευση της καλλιέργειας και επώαση τους 37°C .

• Αραίωση των MEF

Η αραίωση των MEF (split) γίνεται κατά προσέγγιση κάθε 3 ημέρες σε αναλογία 1:5, στην περίπτωση που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε τα κύτταρα μεταξύ των γενεών P0-P2. Σε πιο ειδικές περιπτώσεις, όπως αποτελούν τα πειράματα γήρανσης, οι πρώτες αυτές αραιώσεις μπορεί να γίνουν σε αναλογία 1:3, ώστε τα κύτταρα να προλάβουν να πραγματοποιήσουν πολλές κυτταρικές διαιρέσεις πριν την έναρξη της μελέτης τους. Η πορεία που γενικά ακολουθείται είναι:

- 1.Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και πλύσιμο των κυττάρων δύο φορές με 1xPBS.
- 2.Προσθήκη 1 ml αραιωμένης τρυψίνης (ποσότητα για 10άρι τρυβλίο).
- 3.Επώαση για 10-20 sec στους 37°C . Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων. Όταν τα κύτταρα έχουν χάσει το αρχικό τους σχήμα, έχοντας γίνει λίγο πιο στρογγυλά, αφαιρείται η τρυψίνη, αφήνοντας μόνο ελάχιστη.
- 4.Επώαση ξανά στους 37°C όχι πάνω από 1min.
- 5.Μικροσκοπική παρατήρηση κι ελαφρό χτύπημα του τρυβλίου για την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων.
- 6.Προσθήκη κάποιας ποσότητας πλήρους θρεπτικού μέσου, για την απενεργοποίηση της τρυψίνης.

7. Πιπετάρισμα για την διάσπαση των συσσωματωμάτων των κυττάρων. Τοποθέτηση των κυττάρων σε 15άρι σωλήνα falcon.
8. Φυγοκέντρηση στα 800 rpm για 4 min. Απόρριψη του υπερκειμένου.
9. Προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου, καλή αναδιάλυση των κυττάρων και μεταφορά σε νέα τρυβλία ή φλάσκες (ανάλογα με το βαθμό αραίωσης που επιθυμείται).

• Ψύξη των MEF

1. Ακολουθώ τα βήματα 1-8 της διαδικασίας αραίωσης των MEF.
2. Πλύση του ιζήματος των κυττάρων με κρύο 1xPBS. Φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου.
3. Προσθήκη 1 ml παγωμένου και φιλτραρισμένου διαλύματος ψύξης των MEF. Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε κατάλληλα σωληνάρια (cryovials). Όλα τα υλικά και τα ειδικά σωληνάρια για το πάγωμα (cryovials) είναι παγωμένα.
4. Τα cryovials τοποθετούνται σε ειδικά κουτιά θερμοκρασίας δωματίου που περιέχουν ισοπροπανόλη και τοποθετούνται στους -80°C , ώστε η ψύξη των κυττάρων να είναι σταδιακή (η ισοπροπανόλη λόγω μεγάλης θερμοχωρητικότητας έχει την ιδιότητα να μειώνει αργά και σταδιακά τη θερμοκρασία). Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

Γ.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ HGEMININ ΣΕ MEF ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΡΕΤΡΟΪΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Γ.3.1 Γενικά περί ρετροϊκών φορέων

Για τη μελέτη του *in vivo* ρόλου της Geminin στη γήρανση, πραγματοποιήθηκε η υπερέκφρασή της σε φυσιολογικούς εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEF) με τη χρήση ρετροϊκού φορέα. Τα ανασυνδυασμένα ρετροϊκά οχήματα έχουν την ιδιότητα να μεταφέρουν γονίδια στα κύτταρα-ξενιστές χρησιμοποιώντας τα ίδια μοριακά μονοπάτια με τους φυσιολογικούς ρετροϊούς (εικόνα 3.9).

Εικόνα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των φυσιολογικών ρετροϊών (τροποποιημένη από ιστοσελίδα Stephen Hughes, National Cancer Institute). **1:** ο ιός είναι έτοιμος να διαμολύνει το κύτταρο-στόχο, **2:** οι γλυκοπρωτεΐνες της επιφανείας του ιϊκού φακέλου αναγνωρίζονται από συγκεκριμένους υποδοχείς επί της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων-στόχων, το οποίο αποτελεί το σήμα για τη σύντηξη της ιϊκής με την κυτταρική μεμβράνη, **3:** αντίστροφη μεταγραφή του ιϊκού RNA γονιδιώματος σε δίκλωνο ευθύγραμμο DNA, **4:** είσοδος του ιϊκού DNA στον πυρήνα. Μερικοί ιοί, όπως ο HIV μπορούν από μόνοι τους να διαπεράσουν την πυρηνική μεμβράνη κι έτσι μπορούν να διαμολύνουν και μη διαιρούμενα κύτταρα, άλλοι όμως, όπως ο MLV δεν μπορούν, κι έτσι για να εισέλθουν στον πυρήνα χρειάζονται το κύτταρο στο οποίο βρίσκονται να περάσει από μίτωση, **5:** ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή (πρόϊος), και **6:** ακολούθως, μεταγραφή του από την ενδογενή RNA πολυμεράση του κυττάρου, **7:** Τα RNA μόρια αυτά θα βγούν στο κυτταρόπλασμα όπου θα αποτελέσουν το νέο γονιδίωμα του μελλοντικού ιού καθώς και τα mRNA από τα οποία θα προκύψουν οι gag και gag-pol δομικές και αντιγραφικές πρωτεΐνες του ιού, **8:** οι ιϊκές αυτές πρωτεΐνες θα σχηματίσουν νέα βιρίονια ακριβώς κάτω από την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, όπου μαζί με δύο ιϊκά μόρια RNA θα σχηματίσουν τον νέο ιό. Ο ιός εξέρχεται από το κύτταρο παίρνοντας μαζί του τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και τις γλυκοπρωτεΐνες της επιφανείας, **9:** τελικά, πρωτεάσες του ιού κατατμούν τις gag και gag-pol πολυπρωτεΐνες δίνοντας γένεση στο ώριμο ιό ικανό να διαμολύνει νέα κύτταρα.

Η διαφορά των φυσιολογικών ρετροϊών από τα ρετροϊικά οχήματα που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ότι τα δεύτερα έχουν υποστεί τέτοια τροποποίηση, ώστε να μην μπορούν να αναπαράγονται από μόνοι τους (replication-defective retrovirus). Περιέχουν αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα LTRs που σηματοδοτούν τα άκρα του ιϊκού γονιδιώματος, την ψ αλληλουχία για το πακετάρισμα και την ένθεση (integrase), ενώ στερούνται βασικών δομικών γονιδίων όπως τα gag, pol και env. Προκειμένου, λοιπόν, να πακεταριστούν σε ώριμα ιϊκά σωματίδια (viral particles), χρειάζεται να εισέλθουν πρώτα (με απλή διαμόλυνση) σε ειδικά κυτταρικά συστήματα (retropackaging cell lines), τα οποία θα τους παράσχουν όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες προκειμένου να σχηματίσουν τα ώριμα βιρίονια. Η

επιλογή της κυτταρικής σειράς στην οποία θα γίνει το πακετάρισμα του ρετροϊού, καθορίζει και τον τροπισμό του, μιας και τα κύτταρα αυτά παρέχουν στον ιό τον απαραίτητο υποδοχέα αναγνώρισης του κυττάρου-ξενιστή (εκотροπικό ή αμφο/ πολυ-τροπικό).

Όταν οι κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος ιών καλλιεργούνται *in vitro* για πολύ καιρό υπάρχει ο κίνδυνος να πάψουν να παρέχουν τα στοιχεία εκείνα που είναι απαραίτητα στον ιό (να επιλεχθούν, δηλαδή, κλώνοι που για κάποιο λόγο, έχουν χάσει τα πλασμίδια εκείνα που μεταφέρουν όλα τα απαραίτητα για τον ιό γονίδια). Προκειμένου να αποφευχθεί αυτό, προτιμάται η συνδιαμόλυνση των κυττάρων με τα λεγόμενα «βοηθητικά πλασμίδια» (helper-plasmids), που θα παράσχουν στον ιό όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες, όπως τις gag, pol, env και VSV-G. Η τελευταία πρόκειται για μια G-γλυκοπρωτεΐνη του στοματικού-κυστικού ιού (vesicular stomatitis virus-G) η οποία αντικαθιστά τις πρωτεΐνες του ιϊκού φακέλου, με αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να διεισδύει εύκολα στα κύτταρα χωρίς τη διαμεσολάβηση κάποιου συγκεκριμένου υποδοχέα, αλλά με μία απλή αλληλεπίδραση με φωσφολιπίδια της επιφανείας του κυττάρου-ξενιστή (πλειοτροπικός ιός). Ο συγκεκριμένος ιός μάλιστα είναι πολύ σταθερός, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η συγκέντρωση του με υπερφυγοκέντρησή, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος να χαθεί η μολυσματικότητά του.

Στη συγκεκριμένη εργασία, προκειμένου να υπερέκφρασουμε την WT-hGeminin σε κύτταρα MEF χρησιμοποιήθηκε το όχημα pmx-IRES-GFP (Όλγα Γιαννοπούλου, 2005, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης), του οποίου η οργάνωση παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 3.10.

Εικόνα 3.10: Σχηματική επεικόνιση του pmx ρετροϊκού φορέα που χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της hGeminin σε κύτταρα MEF. Η hGeminin είναι κλωνοποιημένη στον πολυσυνδότη του οχήματος, που βρίσκεται μεταξύ των διακεκομένων γραμμών, ενώ αμινοτελικά αυτής βρίσκεται η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Ανάμεσα στο cDNA της Geminin και του GFP, βρίσκεται κλωνοποιημένη η αλληλουχία IRES (Internal Ribosome Entry Site), που οδηγεί σε μεταγραφή της Geminin και του GFP σε δικιστρονικό μήνυμα (bicistronic mRNA). Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται η μετάφραση της Geminin ανεξάρτητα από

3. Υλικά και Μέθοδοι

αυτή του GFP κι επομένως η καλύτερη διαμόρφωσή της στο χώρο. Επιπλέον, το όχημα περιλαμβάνει και γονίδιο ανθετικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^r).

Γ.3.2 Διαμόλυνση 293T κυττάρων με χρήση λιποσωμάτων για την παραγωγή πακεταρισμένων ιϊκών σωματίων (retroviral packaging)

Τα 293T κύτταρα προέρχονται από σειρά ανθρώπινων εμβρυικών σπλήνοκυττάρων που αθανатоποιήθηκαν ύστερα από διαμόλυνσή τους με τον αδενοϊό SV40 (εκφράζοντας ένα tsSV40 largeT) (DuBridge et al., 1987). Είναι μια κυτταρική σειρά που διαμολύνεται πολύ εύκολα με DNA-πλασμίδια, είτε με τη μέθοδο της καθίζησης ύστερα από την προσθήκη φωσφορικού ασβεστίου, είτε με τη χρήση λιποσωμάτων, ενώ επιπλέον, δίνει υψηλούς τίτλους πακεταρισμένων ιϊκών σωματίων (κατάλληλη για παραγωγή και εκοτροπικού και αμοτροπικού ιού). Τα δομικά γονίδια παρέχονται στον ιό με την ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων με άλλα δυο πλασμίδια: τα gag-pol και pMDG (κωδικοποιεί την VSV-G πρωτεΐνη). Η πορεία παραγωγής ιού έχει ως εξής:

1. Μία μέρα πριν τη διαμόλυνση των 293T κυττάρων τα αραιώνουμε τα κύτταρα (1:3-1:5 αναλόγως της πυκνότητας των κυττάρων στο αρχικό τρυβλίο), έτσι ώστε την επόμενη μέρα η πυκνότητα των κυττάρων να είναι περίπου στο 50%. Επειδή τα κύτταρα αυτά μεγαλώνουν ταχέως, συνίσταται κατά τη διατήρησή τους σε καλλιέργεια, να γίνεται αραίωση 1:5 δύο φορές την εβδομάδα.
2. Τοποθετούμε τα DNA σε δύο σωληνάρια τύπου eppendorf (για τον ιό της Geminin και για τον ιό-μάρτυρα). Φωτομετρούμε πρώτα όλα τα πλασμίδια και υπολογίζουμε τον όγκο που χρειαζόμαστε από το καθένα ώστε να έχουμε τις παρακάτω ποσότητες:

πλασμίδια	Ιός-GFP	Ιός-Geminin-GFP
gag-pol	X μl (2,5 μg)	X μl (2,5 μg)
pMDG	X μl (2,5 μg)	X μl (2,5 μg)
pmx-IRES-GFP	X μl (3 μg)	-
Geminin-pmx-IRES-GFP	-	X μl (3 μg)
*TE (ρυθμιστικό διάλυμα)	X μl	X μl
σύνολο	45 μl	45 μl

Πίνακας 3.8: Διαμόλυνση 293T κυττάρων με λιποσώματα για παραγωγή πακεταρισμένου ιού.

*Σύσταση διαλύματος TE: 10 mM Tris-Cl, pH=8 / 1 mM EDTA

3. Προσθήκη σε δύο άλλα σωληνάκια τύπου erppendorf 600 µl θρεπτικού μέσου opti-MEM χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό και 36 µl λιποσωμάτων αντιδραστηρίου Fugene (Roche) ή λιποφεκταμίνης 2000 (Invitrogen). Προσοχή: τα λιποσώματα να μην ακουμπήσουν τα τοιχώματα του erppendorf. Ελαφριά ανάδευση.
 4. Προσθήκη του μίγματος των DNA. Ελαφριά ανάδευση. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min.
 5. Ξέπλυμα των 293T κυττάρων πολύ προσεκτικά (τα κύτταρα αυτά αποκολλώνται πολύ εύκολα από το τρυβλίο), μία φορά μόνο με διάλυμα 1xPBS.
 6. Προσθήκη 9 ml πλήρους θρεπτικού μέσου (για 10άρι τρυβλίο 293T κυττάρων).
 7. Προσθήκη σταγόνα-σταγόνα του μίγματος λιποσωμάτων-DNA. Ελαφριά ανακίνηση του τρυβλίου.
 8. Την επόμενη μέρα το πρωί αλλαγή θρεπτικού μέσου χωρίς πλύση. Προσθήκη 8 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου / 10άρι τρυβλίο. Επωάζω στους 37°C.
 9. 48 h μετά γίνεται η συλλογή του υπερκειμένου.
 10. Ακολουθεί διήθηση με πέρασμα από ειδικό φίλτρο (Corning, 0,45 mM), ώστε να συγκρατηθούν μάζες 293T κυττάρων που κατά λάθος πάρθηκαν μαζί με το υπερκείμενο ή άλλα ανεπιθύμητα συσσωματώματα που τυχόν περιέχοντο το θρεπτικό μέσο. Ο ιός είναι έτοιμος για διαμόλυνση (μη συγκεντρωμένος ιός).
 11. Αν κριθεί απαραίτητο ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση, προκειμένου να αυξηθεί ο τίτλος των ιικών σωμάτων. Η υπερφυγοκέντρωση γίνεται σε ειδικά σωληνάρια υπερφυγοκέντρωσης (8 ml/σωληνάρι), στα 20.000 rpm για 2,5 h (4°C). Στο τέλος αφαιρείται το υπερεκείμενο αφήνοντας μια μικρή ποσότητα για αναδιάλυση (100-200 µl συγκεντρωμένου ιού). Από αυτό και αναλόγως της ποιότητας του παραχθέντος ιού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαμόλυνση ποσότητα 10-30 µl συγκεντρωμένου ιού / 3άρι τρυβλίο MEFs.
- Σε κάθε περίπτωση, ο ιός μοιράζεται σε μικρότερες ποσότητες (όση ακριβώς είναι απαραίτητη ανά διαμόλυνση) και αποθηκεύεται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Γ.3.3 Διαμόλυνση των MEF με τους πακεταρισμένους ρετρο-ϊούς (transduction)

Για την διαμόλυνση MEF κυττάρων η γενική πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Μια ημέρα πριν την διαμόλυνση με τον ιό, αραιώνουμε την καλλιέργεια των MEF έτσι ώστε η πυκνότητα των κυττάρων την ημέρα της διαμόλυνσης να μην ξεπερνά την 30-40% (7×10^5 κύτταρα/10άρι τρυβλίο ή $2,5 \times 10^5$ κύτταρα/3άρι τρυβλίο ή 6-well πιάτο). Τα κύτταρα, γενικά, πρέπει να είναι απόλυτα υγιή και να διαιρούνται

με φυσιολογικό ρυθμό (τονίζεται ότι η διαμόλυνση με εκοτροπικούς ή αμφοτροπικούς ρετροϊούς απαιτεί πέρασμα των κυττάρων από μίτωση).

2. Προσθέτουμε τον ιό στο υπερκείμενο των κυττάρων προς διαμόλυνση ως εξής:
 - Στην περίπτωση του **μη συγκεντρωμένου ιού**, αναμειγνύουμε τον ιό με πλήρες και φρέσκο θρεπτικό μέσο, σε 2-3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (v/v), για παράδειγμα 25%, 50% και 75% παρουσία πολυμπρένιου (polybrene, Sigma, 3,3 μg/ml για τα πρωτογενή και 5μg/ml για τα καρκινικά), προκειμένου να αποφασίσουμε ποια είναι η συγκέντρωση με τα βέλτιστα αποτελέσματα. Το πολυμπρένιο γενικά δευξάνει την πιθανότητα εισόδου του ιού στα κύτταρα, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση του ιού με τον μεμβρανικό υποδοχέα που αναγνωρίζει, είναι όμως τοξικό για τα κύτταρα σε μεγάλες συγκεντρώσεις (επιτρεπόμενα όρια: 2-10 μg/ml).
 - Στην περίπτωση του **συγκεντρωμένου ιού** (με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω), μία ποσότητα της τάξης 10-30 μl/3άρι τρυβλίο είναι αρκετή για να δώσει ένα ικανοποιητικό ποσοστό διαμόλυνσης της καλλιέργειας (τουλάχιστον 30-50%). Πρώτα προσθέτουμε τον απαραίτητο όγκο πολυμπρένιου σε φρέσκο θρεπτικό μέσο (2 ml/3άρι) κι εν συνεχεία διαλύουμε σε αυτό τον ιό. Εφαρμόζουμε το μείγμα στα κύτταρα και επωάζουμε για 48h*.
3. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου.

*Οι ιοί, γενικά, έχουν ένα μέσο όρο ζωής στους 37°C περίπου 5-8 h, κι εν συνεχεία απενεργοποιούνται. Για την διαμόλυνση αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών που πολλαπλασιάζονται ταχέως αφήνουμε τον ιό στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων για το πολύ 5 ώρες κι εν συνεχεία ξεπλένουμε το υπερκείμενο με 1xPBS και προσθέτουμε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Στην περίπτωση των MEF, που είναι πρωτογενή κύτταρα, μπορούμε να τον αφήσουμε παραπάνω χρόνο (12-24 h). Στα πειράματα που παρουσιάστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ο ιός παρέμεινε στο θρεπτικό μέσο των MEF λίγο παραπάνω (για διάστημα 24 h και 48 h στο πρώτο και στο δεύτερο πείραμα αντίστοιχα).

Για να επιτύχουμε αύξηση του ποσοστού διαμόλυνσης των κυττάρων κι εφόσον υπάρχει διαθέσιμος ιός, συνίσταται η διπλή ή ακόμα και τριπλή διαμόλυνση (κάθε 8-12 h) των κυττάρων με ιό, προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό των κυττάρων που έρχονται σε επαφή με τον ιό πριν αυτός

απενεργοποιηθεί και συγχρόνως περνούν από μίτωση. Ξεπαγώνουμε μόνο όσο ιό υπολογίζεται ότι είναι απαραίτητος, ενώ όση ποσότητα ιού περισεύει απορρίπτεται.

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Δ.1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Για την μελέτη των παραγόντων αδειοδότησης της αντιγραφής Cdt1 και Geminin σε κύτταρα που γερνούν, εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι επαγωγής *in vitro* κυτταρικής γήρανσης: 1) Επαγωγή **αναπαραγωγικής γήρανσης** που οφείλεται σε φθορά των τελομερών κυττάρων που καλλιεργούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε καλλιέργεια και 2) Επαγωγή **πρόωρης γήρανσης** σε νεαρά κύτταρα ύστερα από την **επίδραση οξειδωτικού στρες** (SIPS), που οφείλεται σε πρόκληση κυτταρικών βλαβών. Τα πρωτόκολλα διαχείρισης κυτταροκαλλιιεργειών παρουσιάζονται στη διπλωματική εργασία (Ηλιού, 2004, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης). Για λόγους οικονομίας χώρου, εδώ θα παρατίθενται μονάχα οι όποιες τροποποιήσεις από αυτά.

Δ.1.1 Επαγωγή αναπαραγωγικής γήρανσης

Νεαρά κύτταρα της σειράς WI-38 (εμβρυικοί ινοβλάστες πνεύμονα), πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες ούλου και MEF αφέθηκαν σε καλλιέργεια για πολλές κυτταρικές διαιρέσεις έως ότου να παρουσιάσουν σημάδια κυτταρικής γήρανσης. Καθόλη την πορεία αυτή, συλλέγονταν δείγματα κυττάρων προς ανάλυση με στόχο τη διαπίστωση εισόδου των κυττάρων σε γήρανση (βλ. παρακάτω). Λόγω της ιδιαιτερότητας της κάθε κυτταρικής σειράς που μελετήθηκε, θα γίνει ξεχωριστή αναφορά για την καθεμιά:

- **Ανθρώπινοι WI-38 ινοβλάστες εμβρυικού πνεύμονα:** Αγοράστηκαν από την ATCC (CCL-75) σε γενιά P10 (για πρακτικούς λόγους η μέτρηση των κυτταρικών διπλασιασμών της καλλιέργειας ξεκίνησε από εκείνη τη στιγμή, αγνοώντας τους διπλασιασμούς που είχαν υποστεί έως τότε). Τα κύτταρα καλλιεργούνταν μέχρι πληρώσεως του τρυβλίου κατά 80-90% και αραιώνονταν (split) πάντα σε αναλογία 1:2 προς δύο νέα τρυβλία. Με το ένα τρυβλίο συνεχιζόταν η καλλιέργεια, ενώ το άλλο χρησίμευε είτε για ανάλυση, είτε για πάγωμα και αποθήκευση των κυττάρων της

συγκεκριμένης ηλικίας για μετέπειτα χρήση. Γενικά, τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονταν σχετικά αργά. Στην αρχή (από γενιά P10 έως P25 σε περίπου $2^{1/2}$ -3 μήνες) η αραίωση γινόταν κατά μέσο όρο κάθε 5-6 ημέρες, ενώ αργότερα, και όσο τα κύτταρα γερνούσαν (γενιές 25-P30, χρονικό διάστημα 2 μηνών), λόγω της μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας που επιδείκνυαν, η αραίωση γινόταν ακόμα πιο αραιά (περίπου κάθε 10-15 ημέρες). Η συνολική διάρκεια για τη γήρανση των WI-38 κυττάρων ήταν κατά προσέγγιση $4^{1/2}$ με 5 μήνες. Να τονιστεί ότι σε όλα τα πειράματα γήρανσης η ηλικία των κυττάρων είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που πρέπει πάντα να προσμετράται. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη όχι μόνο η παρακολούθηση και η αναγραφή της γενιάς των κυττάρων, αλλά και η ακριβής μέτρηση του αριθμού των διπλασιασμών που έχουν αυτά επιτελέσει. Στην περίπτωση των WI-38 κυττάρων, επειδή η αραίωση γινόταν πάντα 1:2, κάθε γενιά που περνούσε αντιστοιχούσε με έναν διπλασιασμό (κατά προσέγγιση). Σε περίπτωση που τα κύτταρα αραιώνονται περισσότερο (π.χ 1:3), θα πρέπει σε κάθε αραίωση να μετράται ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώνουμε στο τρυβλίο και αυτός που κατά την επόμενη αραίωση συλλέγουμε από αυτό, και με την εφαρμογή ενός συγκεκριμένου μαθηματικού τύπου, να υπολίζουμε τον ακριβή αριθμό διπλασιασμών που τα κύτταρα επιτέλεσαν στο διάστημα αυτό (μέτρηση κυτταρικών διπλασιασμών ή PDLs- βλ. παρακάτω, κεφάλαιο Δ.2).

- **Πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες από βιοψίες ούλου:** Απομονώθηκαν από βιοψίες ούλου νεαρών φυσιολογικών ατόμων (γενιά P0) (Καραγεώργου, I , Διδακτορική Διατριβή). Γενικά, τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονταν σχετικά γρήγορα, με αποτέλεσμα να απαιτείται αραίωση κάθε 2-3 ημέρες (για την τροποποίηση του πρωτοκόλλου αραίωσης των συγκεκριμένων κυττάρων βλ.παρακάτω). Η αραίωση για την συντήρηση της καλλιέργειας γινόταν σε αναλογίες 1:3-1:2. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν για περίπου 30 γενιές (σε χρονικό διάστημα ~2 μηνών), πραγματοποιώντας κατά προσέγγιση τον ίδιο αριθμό διπλασιασμών (~30), χωρίς να φτάσει ποτέ η καλλιέργεια σε μεγάλο βαθμό γήρανσης (πρόκειται για τα κύτταρα προχωρημένης ηλικίας (μέχρι γενιά P29), στα πειράματα του πρώτου κεφαλαίου των αποτελεσμάτων).
- **Εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (MEF):** Αν και στα περισσότερα πειράματα γινόταν καταμέτρηση του ακριβούς αριθμού διπλασιασμών που τα κύτταρα είχαν επιτελέσει,

εντούτοις, λόγω της εξαιρετικά γρήγορης *in vitro* γήρανσης των MEF, λήφθηκε υπόψη κατά κύριο λόγο ο αριθμός της κάθε γενιάς. Έτσι, τόσο οι ετερόζυγοι όσο και οι αγρίου τύπου MEF, απομονώνονταν ταυτόχρονα από έμβρυα ποντικών (P0) και μεγάλωναν ανά ζεύγη κατά τον ίδιο τρόπο (π.χ στις πρώτες γενιές $P0 \Rightarrow P1 \Rightarrow P2$ οι αραιώσεις ήταν για όλα τα κύτταρα μεταξύ 1:3-1:5), έτσι ώστε να έχουν υποστεί περίπου την ίδια μεταχείριση μέχρι ενάρξεως του πειράματος (το οποίο ξεκινούσε συνήθως μετά τις γενιές P2-P3). Ένα τυπικό πείραμα συνεχούς καλλιέργειας των MEF για την επαγωγή αναπαραγωγικής γήρανσης έχει ως εξής:

Εικόνα 3.11: Ένα τυπικό πείραμα επαγωγής αναπαραγωγικής γήρανσης σε κύτταρα MEF γενιάς P2.

Για τους πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες ούλου η διαδικασία αραιώσης τροποποιείται ως εξής:

- Ξέπλυμα 2 φορές με διάλυμα 1XPBS
- Προσθήκη 1 ml (για 10άρι τρυβλίο) διαλύματος τρυψίνης, ήπια ανακίνηση να καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, και άμεση αφαίρεσή της.
- Προσθήκη 1 ml τρυψίνης. Μικροσκοπική παρατήρηση και αφαίρεση της τρυψίνης (αφήνοντας μόνο ελάχιστη ποσότητα στο τρυβλίο) όταν τα κύτταρα συρρικνωθούν και πριν αρχίσουν την αποκόλλησή τους.
- Επώαση στους 37°C για 1 min.
- Μικροσκοπική παρατήρηση και ελαφριά ανακίνηση για πλήρη αποκόλλησή τους.
- Προσθήκη θρεπτικού μέσου και μεταφορά μέρους του εναιωρήματος των κυττάρων σε νέα τρυβλία. Με τον τρόπο αυτόν περιορίζουμε την δράση της τρυψίνης, επιτυγχάνοντας μικρότερο βαθμό στρες των κυττάρων.

Δ.1.2 Επαγωγή οξειδωτικά-επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης

Για την επαγωγή πρόωρης γήρανσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υπεροξειδίου του H_2O_2 (MERCK #107210 ή Riedel-de-Haen #31642), σε συγκεντρώσεις 50-1000 μM αναλόγως του πειράματος και του κυτταρικού τύπου. Μία ημέρα πριν την επιβολή τους οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα αραιώνονται κατάλληλα ούτως ώστε την επόμενη ημέρα αυτά να έχουν πυκνότητα ~30% (όχι μικρότερη αραιώση από 1:3). Η διάλυση του πυκνού H_2O_2 γίνεται σε αποστειρωμένο milli-Q- H_2O . Το H_2O_2 παραμένει στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων για 2 h και στη συνέχεια ξεπλένεται δύο-τρεις φορές με διάλυμα 1x PBS. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε βασίστηκε στη δημοσίευση των Jian-Hua Chen et. al. του 2004 (Chen et al., 2004), ενώ τροποποιήθηκε ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε κυτταρικής σειράς (εικόνα 3.12). Η τυπική πορεία επαγωγής γήρανσης στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η κάτωθι:

Εικόνα 3.12: Τυπική πορεία πρόκλησης οξειδωτικού στρες για την επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης σε νεαρούς πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες ούλου (πάνω) και MEF (κάτω). Όπου ⚡ = δόση H_2O_2 , ενώ όπου S = αραιώση των κυττάρων (ουσιαστικά πάντα μία ημέρα πριν την επίδραση με το H_2O_2). Στους MEF ήταν απαραίτητη η χορήγηση και τρίτης δόσης H_2O_2 . Στην περίπτωση αυτή η 2^η και 3^η δόση αυξήθηκε σε 1000 μM H_2O_2 .

Δ.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ ΜΙΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ (PDL)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως κατά την καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων απαραίτητη είναι η καταμέτρηση των κυτταρικών διπλασιασμών που αυτά επιτελούν από γενιά σε γενιά. Προϋπόθεση για αυτό είναι η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που επιστρώνουμε σε ένα νέο τρυβλίο κατά τη διαδικασία της αραίωσης και του αριθμού κυττάρων που συλλέγουμε από αυτό κατά την επόμενη αραίωση.

Δ.2.1 Μέτρηση αριθμού κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Αυτό γινόταν με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer (OptikLabor, διπλή, βάθους 0,1 mm και εμβαδόν του μικρότερου τετραγώνου στο κέντρο 0,0025 mm²). Τα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά του κάθε αιμοκυτταρομέτρου (εικόνα 3.13) καθορίζουν και τον ακριβή μαθηματικό τύπο για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων, που είναι ο εξής :

$$\text{Κύτταρα/}\mu\text{l} = \text{αριθμός κυττάρων } X / (\text{περιοχή σε mm}^2 \text{ που μετρήθηκε}) \cdot (\text{βάθος αιμοκυτταρομέτρου}) \cdot (\text{βαθμός αραίωσης})$$

Έτσι, πρακτικά, μετρώντας ένα εκ των 5 τετραγώνων του αιμοκυτταρομέτρου που έχει εμβαδόν 1mm² (κόκκινο τετράγωνο, βλ. εικόνα 3.13), καταλήγουμε στον απλούστερο τύπο (υποθέτουμε ότι βαθμός αραίωσης δεν υπάρχει) :

$$\text{Κύτταρα/}\mu\text{l} = X / 1 \cdot 0,1$$

Κι επειδή τα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά του αιμοκυτταρομέτρου είναι δεδομένα, ο τύπος καταλήγει ως εξής (κύτταρα ανά ml) :

$$\text{Κύτταρα / ml} = 10^3 \cdot X / 0,1$$

ή

$$\text{Κύτταρα / ml} = X \cdot 10^4$$

Εικόνα 3.13: Μέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer. Με κόκκινο σημαίνεται ένα εκ των τετραγώνων που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για τη μέτρησή μας. Για να είμαστε τυπικά πιο ακριβείς, σωστό είναι στην περίπτωση που τα κύτταρα δεν είναι πολλά ή δεν κατανέμονται ομοιομόρφως σε όλη επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer, να μετράμε το σύνολο των κυττάρων και στα 5 τετράγωνα (4 περιφερειακά + το κεντρικό) και να διαιρούμε με τον αριθμό με 5.

Δ.2.3 Υπολογισμός των κυτταρικών διπλασιασμών μιας καλλιέργειας (PDLs)

Για να γίνει ο υπολογισμός των κυτταρικών διπλασιασμών (population doublings ή PDL) που επιτέλεσε μία καλλιέργεια μεταξύ δύο διαδοχικών αραιώσεων χρειάζεται να είναι γνωστός ο αριθμός κυττάρων που επιστρώθηκαν αρχικά στο τρυβλίο καθώς και ο αριθμός κυττάρων που περιείχε το τρυβλίο κατά την επόμενη αραιώση. Εν συνεχεία, γίνεται η εφαρμογή του παρακάτω μαθηματικού τύπου:

$$\text{PDLs} = \ln (\text{AK τέλος} / \text{AK αρχή}) / \ln 2$$

όπου: AK τέλος= αριθμός κυττάρων που συλλέχθηκαν στο τέλος,

AK αρχή= αριθμός κυττάρων που επιστρώθηκαν στην αρχή.

Ο μαθηματικός τύπος αυτός προκύπτει από την εξίσωση :

$$AK \text{ αρχή} \times 2^v = AK \text{ τέλος}$$

όπου v = κυταρικοί διπλασιασμοί .

Λύνοντας ως προς v :

$$\ln 2^v = \ln (AK \text{ τέλος} / AK \text{ αρχή}) \Rightarrow \ln 2 \cdot v = \ln (AK \text{ τέλος} / AK \text{ αρχή})$$

$$\Rightarrow v = \ln (AK \text{ τέλος} / AK \text{ αρχή}) / \ln 2$$

Α.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Α.3.1 Ιστοχημική χρώση β-γαλακτοσιδάσης ειδική για τη γήρανση (Senescence-Associated β-Galactosidase assay ή S.A β-Gal assay)

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού της καλλιέργειας που έχει εισέλθει σε κυταρική γήρανση, πραγματοποιήθηκε η ιστοχημική χρώση της β-γαλακτοσιδάσης (Dimri et al., 1995)(τροποποιημένο πρωτόκολλο, από J.Campisi, Cancer Research U.K και «Current Protocols» Γ.Μανιάτης) Με τη μέθοδο αυτή (και συγκεκριμένα στη χρώση με pH=6) αναγνωρίζονται ειδικά τα γηρασμένα κύτταρα, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα ή τα κύτταρα εισέρχονται σε διαφοροποίηση ή που βρίσκονται εκτός κυταρικού κύκλου (σε G0), τα οποία παραμένουν αρνητικά στη χρώση. Η διαδικασία χρώσης β-γαλακτοσιδάσης είναι η εξής:

1. Τοποθέτηση των κυττάρων σε πάγο. Συνίσταται η επίστρωση των υπό εξέταση κυττάρων σε καλυπτρίδες εντός τρυβλίου 12-θέσεων (12-well plate), πάνω στις οποίες γίνεται απευθείας η εφαρμογή της χρώσης.
2. Ξέπλυμα των κυττάρων δύο φορές με κρύο διάλυμα 1xPBS.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3. Μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% παραφολμαδεϋδης (διαλυμένη σε 1xPBS), σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
4. Ακολουθούν 2x5 min ξεπλύματα με διάλυμα 1xPBS.
5. Προσθήκη φρέσκου διαλύματος β-γαλακτοσιδάσης (0,5 ml ανά πηγάδι σε ένα τρυβλίο 12-θέσεων). Επώαση σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, απουσία CO₂ (για να μην επηρεαστεί το pH του διαλύματος).
6. Επωάζουμε στο σκοτάδι για διάστημα 18-25 h. Ο χρόνος επώασης διαφέρει ανά κυτταρικό τύπο.

Το φρέσκο διάλυμα β-γαλακτοσιδάσης φτιάχνεται ως εξής:

Συστατικά	Συγκέντρωση stock διαλύματος	Συγκέντρωση 1x	Όγκος (μl)
X gal (Promega, V3941, 50 mg/ml)	20 mg/ml (400 μl Xgal διαλύονται σε 600 μl φιλτραρισμένου DMSO, αποθήκευση -20°C, σκοτάδι)	1 mg/ml	50 μl
*Διάλυμα κιτρικού οξέος/φωσφορικών (pH=4 ή pH=6)	40 mM	8 mM	200 μl
K₃Fe(CN)₆ (potassium ferricyanide)	200 mM (αποθήκευση 4°C, σκοτάδι)	5 mM	25 μl
K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O (potassium ferrocyanide)	200 mM (αποθήκευση 4°C, σκοτάδι)	5 mM	25 μl
NaCl	5 M	150 mM	30 μl
MgCl₂	1 M	2 mM	2 μl
milli-Q-H₂O			668 μl
Σύνολο			1000 μl (=1 ml)

Πίνακας 3.9: Σύσταση διαλύματος β-γαλακτοσιδάσης.

* Το διάλυμα κιτρικών/φωσφορικών παρασκευάζεται ως εξής:

- **Διάλυμα Α:** 0,1 M διάλυμα κιτρικού οξέος.
- **Διάλυμα Β:** 0,2 M διάλυμα Na_2HPO_4 .

Για παράδειγμα, 100 ml διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών παρασκευάζονται ως εξής:

- Για διάλυμα χρώσης β-γαλακτοσιδάσης με **pH=6**, αναμειγνύονται ~37 ml διαλύματος Α (αρχικής τιμής pH=2-3) με την απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος Β (χρειάζεται σχεδόν όλος ο όγκος μέχρι τα 100ml) ώστε το pH να ρυθμιστεί στην τιμή 6. Χρειάζεται να γίνεται αργά η προσθήκη του διαλύματος Β ενόσω το διάλυμα πεχαμετρείται. Αν δεν επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή pH, γίνεται διόρθωση του pH με προσθήκη Na_2HPO_4 ή κιτρικού οξέος.
- Για διάλυμα χρώσης β-γαλακτοσιδάσης με **pH=4** αναμειγνύονται ~37 ml διαλύματος Α (αρχικής τιμής pH=2-3) με μια μικρή ποσότητα διαλύματος Β (~30 ml) και ακολουθεί προσθήκη H_2O μέχρι πληρώσεως του όγκου (100ml).
- Για διάλυμα χρώσης β-γαλακτοσιδάσης με **pH=5,5** (χρησιμοποιείται προαιρετικά για τη χρώση κυττάρων MEF, σε περίπτωση που δεν βάφουν ικανοποιητικά στο pH=6) αναμειγνύονται ~37ml διαλύματος Α (αρχικής τιμής pH=2-3) με την απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος Β (όγκος ενδιάμεσος των δύο προηγούμενων) και προσθήκη H_2O μέχρι πληρώσεως του όγκου (100 ml).

Χρειάζεται προσοχή κατά την τελική ογκομέτρηση των διαλυμάτων, καθώς συχνά με την προσθήκη του νερού αλλάζει το pH του διαλύματος. Να τονιστεί ότι για τη σωστή εξαγωγή συμπερασμάτων θα πρέπει η πυκνότητα της υπό ανάλυση καλλιέργειας να μην ξεπερνά το 60-70% ώστε να αποφεύγονται περιπτώσεις μη ειδικής χρώσης, ενώ σκόπιμο είναι να υπάρχουν δείγματα-μάρτυρες (αρνητικοί και θετικοί) της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης.

Στο τέλος τα διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Δ.3.2 Ανάλυση ποσοστού κυττάρων που παραμένουν σε κυτταρικό κύκλο με πείραμα ενσωμάτωσης BrdU

Σε όλα τα πειράματα γήρανσης απαραίτητο είναι απαραίτητη η παρακολούθηση της δυναμικής πολλαπλασιασμού των υπό ανάλυση κυττάρων. Η μέθοδος ενσωμάτωσης BrdU επιτρέπει τον προσδιορισμό του ποσοστού της καλλιέργειας που εξακολουθεί να βρίσκεται σε κυτταρικό κύκλο μία δεδομένη χρονική στιγμή («in cycle pool» της καλλιέργειας). Όπως περιγράφηκε και νωρίτερα στο κεφάλαιο αυτό, η BrdU είναι ένα χημικό ανάλογο της θυμιδίνης, το οποίο, όταν βρεθεί εντός αντιγραφόμενου πυρήνα, ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA. Εάν επωαστούν τα κύτταρα με BrdU για μικρούς χρόνους (της τάξεως των 10 min έως 2 h) και στη συνέχεια πραγματοποιηθεί ανοσοφθορισμός των κυττάρων με αντίσωμα έναντι της BrdU, τότε το σήμα που προκύπτει προέρχεται από όλα τα κύτταρα που βρίσκονταν ή πέρασαν στο μικρό αυτό χρονικό διάστημα από φάση S. Αν, όμως, η επώαση των κυττάρων με BrdU γίνει για πολύ περισσότερο χρόνο (24 h-72 h), τότε το ποσοστό θετικών κυττάρων για BrdU αντιστοιχεί στα κύτταρα που πέρασαν κατά το διάστημα αυτό έστω και μία φορά από φάση S, αντανακλώντας, πρακτικά, το ποσοστό της καλλιέργειας που βρίσκεται ακόμα σε κυτταρικό κύκλο.

Η μέθοδος ενσωμάτωσης BrdU πραγματοποιείται σε κύτταρα που έχουν εποστρωθεί σε καλυπτρίδες και ακολουθεί ανάλυση με ανοσοφθορισμό. Για τα κύτταρα-μάρτυρες που πολλαπλασιάζονται πολύ πιο γρήγορα από τα γηρασμένα κύτταρα, πραγματοποιούμε αραίωση των κυττάρων μία ημέρα πριν την ανάλυση για BrdU. Η αραίωση γίνεται σε κατάλληλη αναλογία, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα κύτταρα θα χρειαστεί να παραμείνουν σε καλλιέργεια για το λιγότερο 3x 24 ωρα ακόμα. Την επόμενη ημέρα της αραίωσης γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου που περιέχει διάλυμα BrdU (τελική συγκέντρωση 20 µg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 48-72 h αναλόγως της κυτταρικής σειράς. Εν συνεχεία, ακολουθεί ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος έναντι της BrdU. Το ποσοστό BrdU(+) κυττάρων που προκύπτει αντανακλά το μέρος της καλλιέργειας που διαιρείται την ημέρα που προστέθηκε το BrdU στο θρεπτικό μέσο.

Δ.3.3 Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων (growth assays)

Ένας εναλλακτικός τρόπος με τον οποίο παρακολουθείται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μιας καλλιέργειας είναι η κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης των κυττάρων («growth curves»). Με τις καμπύλες ανάπτυξης προσδιορίζεται ο αριθμός κυττάρων ενός τρυβλίου σε τακτά χρονικά διαστήματα. Τα νούμερα αυτά τελικά χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης «αριθμός

κυττάρων / χρόνο». Βεβαίως, ο αριθμός κυττάρων ενός τρυβλίου μία δεδομένη χρονική στιγμή είναι αποτέλεσμα δυο συνιστωσών: του ρυθμού πολλαπλασιασμού και του ρυθμού απόπτωσης της καλλιέργειας. Μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν διακρίνει την αργή ανάπτυξη των κυττάρων από το υψηλό ποσοστό κυτταρικού θανάτου.

Μία γενική πορεία για την κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης μιας καλλιέργειας είναι:

- 1) Αρχική επίστρωση ενός δεδομένου αριθμού κυττάρων (π.χ για κύτταρα MEF $2,5 \cdot 10^4$ κύτταρα σε τρυβλία 12 θέσεων). Απαραίτητη είναι η ύπαρξη τριπλών δειγμάτων για την κάθε χρονική στιγμή που χρειάζεται να μετρηθεί ο αριθμός κυττάρων της καλλιέργειας.
- 2) Μέτρηση ανά 2-3 ημέρες του αριθμού κυττάρων στο τρυβλίο με τη χρήση αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.
- 3) Στο τέλος γίνεται η κατασκευή της καμπύλης κυτταρικής ανάπτυξης εισάγοντας όλες τις τιμές στο Excel (Microsoft). Προαιρετικά, μπορεί να γίνει η αναγωγή των απόλυτων αριθμών κυττάρων από τις μετρήσεις καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (με την εφαρμογή των μαθηματικών τύπων που περιγράφηκαν προηγουμένως) σε αριθμό διπλασιασμών (στην περίπτωση αυτή, η πρότυπη καμπύλη θα είναι της μορφής PDL/χρόνο).

Ε. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ή mRNA)

Ε.1 ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ε.1.1 Παρασκευή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων για ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western

Για την παρασκευή των κυτταρικών εκχυλισμάτων ακολουθείται η εξής πορεία:

1. Τα προς ανάλυση κύτταρα τοποθετούνται σε πάγο.
2. Ακολουθούν δύο πλύσεις με κρύο διάλυμα 1xPBS. Προσθήκη 1 ml διαλύματος 1xPBS.

3. Συλλογή των κυττάρων με μηχανικό τρόπο (χρήση scraper). Φυγοκέντρωση στα 10.000 rpm για 5 min.
4. Αφαίρεση του υπερκειμένου. Προσθήκη 50-150 μ l διαλύματος 1xFSB+DTT στο κυτταρικό ίζημα. Η ποσότητα διαφέρει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων (ενδεικτικά, ίζημα που προέρχεται από ένα σχεδόν γεμάτο τρυβλίο με ανθρώπινους ινοβλάστες αναδιαλύεται σε περίπου 60-80 μ l, ενώ ίζημα από αντίστοιχο τρυβλίο καρκινικών κυττάρων αναδιαλύεται σε 120-150 μ l).
5. Επώαση στους 95°C για 5 min. Το δείγμα φορτώνεται απευθείας σε πήκτωμα αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση ή αποθηκεύεται στους -20°C.

E.1.2 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυαμιδίου (SDS-PAGE)

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τρόπο που αναλύεται λεπτομερώς στη διπλωματική εργασία (Ηλιού, 2004, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης).

E.1.3 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Western Blot)

Μετά τη ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων γίνεται μεταφορά των πρωτεϊνών σε ειδικές μεμβράνες (PVDF, Milipore) και ακολουθεί η επώαση των αντισωμάτων έναντι της υπό ανάλυση πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horse Raddish Peroxidase-HRP), ενώ για την ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χημειοφωταύγειας με τη χρήση της ECL (Amersham). Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη διπλωματική εργασία (Ηλιού, 2004, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης). Ο πίνακας 3.10 παρουσιάζει τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και τις αραιώσεις τους:

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ / ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ	
		πρωτογενή	καρκινικά
Πρωτογενη αντισώματα			
Geminin (r)	Xouri <i>et. al</i> , FEBs J 2004	1:200-1:500	1:1000
Geminin (m)	Συγκεκριμένη εργασία	1:50	1:50
Cdt1 (r)	Hideo <i>et.al.</i> , JBC 2001	1:250	1:250
p21 (g)	Santa Cruz, sc-397	1:500	1:500
γ-H2AX (m)	Upstate-5636	1:250-1:500	1:500
τουμπουλίνη (m)	Sigma-T5168	1:10.000	1:10.000
MCM7 (m)	Santa Cruz, sc-9966	1:500	1:500
κυκλίνη A (m)	Sigma-C4710	1:500	1:500
ολικό Rb (m)	Oncogene-OP66-100UG	1:250	1:250
BrdU (m)	Sigma-BU33	1:500	1:500
CDK4 (r)	Santa Cruz, sc-260	1:1000	1:1000
p53(DO-1) (m)	Santa Cruz, sc-126	1:200	1:200
Δευτερογενή αντισώματα			
am-HRP	Sigma	1:3.000	1:3.000
ar-HRP	Sigma	1:3.000	1:3.000

Πίνακας 3.10: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία μαζί με τις αραιώσεις τους, ξεχωριστά στα πρωτογενή και στα καρκινικά κύτταρα. Πλάι στο όνομα του κάθε αντισώματος αναγράφεται το ζώο στο οποίο φτιάχτηκε το αντίσωμα (r=κουνέλι, m=ποντίκι-μονοκλωνικό αντίσωμα, και g=κατσίκια).

Ε.1.4 Πρωτόκολλο κλασσικού ανοσοφθορισμού και διπλού ανοσοφθορισμού με χρώση BrdU

Τα προς ανάλυση κύτταρα επιστρώνονται σε καλυπτρίδες, πάνω στις οποίες πραγματοποιείται η διαδικασία του ανοσοφθορισμού. Η ακριβής πορεία που ακολουθείται περιγράφεται στη διπλωματική εργασία (Ηλιού, 2004, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης). Στον κάτωθι πίνακα

3. Υλικά και Μέθοδοι

παρουσιάζονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού της συγκεκριμένης εργασίας:

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ / ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΑΙΩΣΗ	
		πρωτογενή	καρκινικά
Πρωτογενη αντισώματα			
Geminin (r)	Xouri <i>et. al</i> , FEBs J 2004	1:500	1:1000
Geminin (m)	Συγκεκριμένη εργασία	απευθείας χρήση (TCSN) έως 1:50	1:50-1:100
Cdt1 (r)	Hideo <i>et.al.</i> , JBC 2001	1:150	1:150
κυκλίνη A (m)	Neomarkers-CY06	1:40	1:40
γ-H2AX (m)	Upstate-5636	1:500	1:1000
BrdU (m)	Sigma-BU33	1:500	1:500
GFP (r)	Molecular Probes, A11122	1:500	1:1000-1:2000
GFP (m)	Molecular Probes	1:500	1:500
Δευτερογενή αντισώματα			
ar και am-568 (g)	Alexa, Molecular Probes	1:500	1:500
ar και am-488 (g)	Alexa, Molecular Probes	1:500	1:500

Πίνακας 3.11: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού στη συγκεκριμένη εργασία και οι αραιώσεις τους.

E.1.5 Ποσοτικοποίηση των σημάτων στα πειράματα ανοσοφθορισμού

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin στα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J. Οι φωτογραφίες των δειγμάτων προς σύγκριση, τραβήχτηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες. Το πρόγραμμα αξιολογεί τον μέσο όρο της έντασης του σήματος φθορισμού σε μία μικρή επιφάνεια (συγκεκριμένου σχήματος κι εμβαδόν). Χρησιμοποιώντας ως δείκτη ύπαρξης πυρήνα την DAPI, μετράται το σήμα φθορισμού όλων των πυρήνων του κάθε πεδίου. Εν συνεχεία, για το κάθε πεδίο μετράται με τον ίδιο τρόπο το μη ειδικό σήμα που πηγάζει από μέρη όπου δεν υπάρχουν κύτταρα (background) και το οποίο αφαιρείται από τα ειδικά σήματα στους πυρήνες των κυττάρων. Οι τελικές τιμές έντασης φθορισμού των πυρήνων

αποδίδονται από το πρόγραμμα σε «τυχαίες μονάδες» (arbitrary units). Τέλος, απεικονίζονται οι εντάσεις φθορισμού σε άξονες, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φαίνεται η διασπορά των τιμών μεταξύ των δειγμάτων

E.2 ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ mRNA - ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ MRNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ REAL-TIME PCR

E.2.1 Γενικά

Αφού εφαρμόστηκαν οι δύο μέθοδοι που προαναφέρθηκαν για την αποσιώπηση της έκφρασης της Geminin στα κύτταρα (χρήση pSUPER πλασμιδίων και siRNA ολιγονουκλεοτιδίων), κρίθηκε σκόπιμο να γίνει ο έλεγχος της αποτελεσματικότητάς τους, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης (με ανοσοαποτύπωμα Western Blot) όσο και mRNA. Για τον έλεγχο σε επίπεδο mRNA πραγματοποιήθηκε πείραμα Real Time-PCR σε U2OS καρκινικά κύτταρα, τα οποία είχαν υποστεί είτε siRNA για την Geminin είτε διαμόλυνση με τα πλασμίδια pSUPER. Σε αντίθεση με μία απλή PCR, η τεχνική αυτή είναι **ποσοτική**. Αυτό επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη σήμανση του νεοσυντιθέμενου-κατά την αντίδραση PCR-προϊόντος με μία χρωστική (όπως π.χ η sybr green, που φθορίζει όταν προσδένεται σε δίκλωνο DNA) και τη μέτρηση του φθορισμού στο σωλήνα όπου πραγματοποιείται η αντίδραση μετά το τέλος κάθε κύκλου. Έτσι είναι δυνατή η παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού/συγκέντρωσης του προϊόντος στον σωλήνα σε «αληθινό χρόνο» («real time»). Ακολουθήθηκε πρωτόκολλο qPCR «δύο βημάτων» («two step qPCR-protocol»). Ακολουθεί η περιγραφή όλων των απαραίτητων βημάτων που πραγματοποιήθηκαν για την εκτέλεση των qPCR πειραμάτων.

E.2.2 Εκτέλεση πειράματος ποσοτικής Real-Time PCR

Για την πραγματοποίηση πειράματος qPCR ακολουθήθηκε η εξής πορεία:

- **Επιλογή των DNA-εκκινητών (primers)**

Η επιλογή των DNA εκκινητών για την πραγματοποίηση της PCR έγινε με το πρόγραμμα «primer 3» του Whitehead Institute στο MIT (Ινστιτούτου Τεχνολογίας της

Μασαχουσέτης) (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Στο πρόγραμμα τοποθετήθηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία (cDNA) του γονιδίου της Geminin από την NCBI τράπεζα δεδομένων (NM_015895) και τέθηκαν ορισμένοι περιορισμοί, όπως: μήκος εκκινητή από 18-30 nt με ιδανικό το μήκος των 20 nt, περιεχόμενο GC από 30-80%, με ιδανική σύσταση στο 50%, Tm εκκινητών από 63-67°C, με ιδανική Tm=64°C, επιθυμητό μήκος της αλληλουχίας στόχου μεταξύ 80-150nt, 3' συμπληρωματικότητα=0 ή 1 το πολύ, αποφυγή συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών, εκκινητές σε διαφορετικά εξόνια κλπ. Ελέγχθηκαν τα όρια ιντρονίων-εξονίων (intron-exon boundaries) με το πρόγραμμα "UCSC Genome Browser" (επιλογή των «ucsc genes»), ώστε οι δύο εκκινητές του ζεύγους να υβριδοποιούνται σε διαφορετικά εξόνια (απαραίτητο για αποφυγή διαμόλυνσης του προϊόντος με γενομικό DNA). Τα ζευγάρια εκκινητών μήκους 20nt που παραγγέλθηκαν (Sigma) και δοκιμάστηκαν στα πειράματα qPCR ήταν τα εξής:

Συμβολισμός των ζευγών	εκκινητής	(περιοχή όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής) Αλληλουχία (5' => 3')
P1	for	(381nt) TCCAGCCCTGGGGTTATTGT
	rev	(602nt) CTTTTTCAGGCGGGCAATTT
P2	for	(582nt) GAAATTGCCCGCCTGAAAAA
	rev	(815nt) TGGCTTTGCATCCGTAGAGG
P3	for	(308nt) TTCCAGCCCTGGGGTTATTG
	rev	(602nt) CTTTTTCAGGCGGGCAATTT

Δοκιμάστηκαν και τα τρία παραπάνω ζεύγη εκκινητών. Καλύτερα αποτελέσματα (από άποψη ειδικότητας των προϊόντων της qPCR) έδινε το ζεύγος P2, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στα περισσότερα πειράματα. Οι εκκινητές αναδιαλύθηκαν σε αποστειρωμένο milli-Q-H2O ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl.

• Απομόνωση ολικού RNA από τα υπό ανάλυση κύτταρα

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το TRIzol αντιδραστήριο της Invitrogen (Cat.No.15596-026). Η ακριβής πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. **Ομογενοποίηση:** Προσθήκη 800 µl αντιδραστηρίου TRIzol /10άρι τρυβλίο με κύτταρα. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλογή κυττάρων σε σωληνάκι τύπου erppendorf με πιπετάρισμα. Επώαση ξανά για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. **Διαχωρισμός φάσεων:** Προσθήκη 200 µl χλωροφορμίου. Ανάμειξη (vortex) μέχρι το ομογενοποίημα να πάρει ροζ χρώμα. Επώαση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g (12.200 RCF) στους 4°C για 16 min. Με τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται 3 φάσεις: η άνω (=RNA), η ενδιάμεση (=γενωμικό DNA) και η κάτω (=πρωτεΐνες).
3. **Κατακρήμνιση RNA:** Προσεκτική μεταφορά της ανώτερης φάσης (RNA) σε καινούριο erppendorf. Προσθήκη 500 µl ισοπροπανόλης και πολύ καλή ανάμειξη (vortex). Απότομη ψύξη στους -80°C, για 20-30 min (προαιρετικά, εφόσον χρειαστεί, η απομόνωση του RNA μπορεί να σταματήσει στη φάση αυτή, με απαραίτητη φύλαξη των δειγμάτων στους -80°C). Απόψυξη των δειγμάτων. Φυγοκέντρηση στα 12.000 g (12.200 RCF) στους 4°C για 15 min. Απόρριψη του υπερκειμένου.
4. **Πλύση του RNA:** Προσθήκη 1 ml 70% αιθανόλης και καλή ανάμειξη (vortex). Αποκόλληση του ιζήματος. Φυγοκέντρηση στα 10.000 g (9700 rpm) στους 4°C για 8-10 min. Προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου.
5. **Αναδιάλυση του RNA:** Αναδιάλυση του ιζήματος σε 50 µl DEPC H₂O. Επώαση στους 56°C για 5 min υπό ανάδευση.
6. **Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του απομονωθέντος RNA:** μέτρηση της ποσότητας και της ποιότητας του RNA (αναλογία 260/280) με φωτομέτρηση. Αποθήκευση στους -80°C.

• Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA από το RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε κιτ «SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR» της Invitrogen (Cat.No.18080-051). Η ακριβής πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Σε ένα σωληνάρι τύπου erppendorf παρασκευάζεται μείγμα RNA και εκκινητών, με την προσθήκη των εξής:

ολικό RNA	X μ l (~2 μ g)
oligo-dT εκκινητή (50 μ M)	1 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l
DEPC H ₂ O	X μ l
Σύνολο	10 μl

2. Σε μηχανήμα PCR εφαρμόζεται το πρόγραμμα: 10 min / 65°C. Επώαση στον πάγο.

3. Σύνθεση του βασικού (2x) διαλύματος (master-mix) σύνθεσης cDNA ως εξής:

	+S.S	-S.S* (αρνητικός μάρτυρας)
10x RT διάλυμα	2 μ l	2 μ l
25 mM MgCl ₂	4 μ l	4 μ l
0,1 DTT	2 μ l	2 μ l
ένζυμο RNAase OUT	1 μ l	1 μ l
ένζυμο Superscript III RT	1 μ l	-
milli-Q-H ₂ O	-	1 μ l
Σύνολο	10 μl	10 μl

*Η παρασκευή του «-S.S mix» διαλύματος εξυπηρετεί στην πραγματοποίηση των ίδιων αντιδράσεων σύνθεσης cDNA απουσία του ενζύμου. Το δείγμα αυτό χρησιμεύει ως μάρτυρας της επιμόλυνσης των δειγμάτων με γενωμικό DNA.

4. Προσθήκη του παραπάνω διαλύματος στα 10 μ l μείγματος RNA και εκκινητών από το βήμα 1, ανακίνηση και ήπια φυγοκέντρωση (spin).

5. Σε μηχανήμα PCR εφαρμόζεται το πρόγραμμα:

- α) 30min / 50°C
- β) 30min / 55°C
- γ) 5min / 85°C

3. Υλικά και Μέθοδοι

6. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο. Προσθήκη 1 μl RNAase H κι επώαση στους 37°C για 20 min (σε PCR).
7. Αποθήκευση των cDNAs στους -20°C ή απευθείας χρήση σε αντίδραση qPCR.

• Αντίδραση qPCR

1. Αραίωση του cDNA 1:50 με αποστειρωμένο milli-Q- H_2O .
2. Παρασκευή του master-mix της αντίδρασης PCR, ξεχωριστά για κάθε ζεύγος εκκινητή που θα χρησιμοποιηθεί, ως εξής (ποσότητες για μία αντίδραση):

SYBR Green PCR Master Mix (AB Applied Biosystems)	12,5 μl
forward εκκινητή (10 μM)	1 μl
reverse εκκινητή (10 μM)	1 μl
milli-Q-H_2O	5,5 μl
σύνολο	20 μl

3. Στα ειδικά πιάτα (optical plates, $12 \times 8 = 96$ θέσεων) για qPCR τοποθετούνται 20 μl από το παραπάνω μείγμα στις κατάλληλες θέσεις.
4. Προσθήκη του cDNA (από 5 μl) ανά θέση (δηλ. ανά αντίδραση).
5. Σφράγιση -με ειδική αυτοκόλλητη ταινία- του πιάτου της qPCR. Φυγοκέντρωση (προαιρετικά) σε χαμηλές στροφές για μερικά δευτερόλεπτα (spin) (απαιτούνται ειδικές υποδοχές σε φυγόκεντρο τύπου Jouan).
6. Τοποθέτηση του φορτωμένου με τα δείγματα πιάτου στο μηχάνημα της pPCR (Chromo4 Real Time PCR Machine της Biorad, εικόνα 3.13). Γίνεται ο προγραμματισμός της αντίδρασης μέσω υπολογιστή (πρόγραμμα Opticon Monitor 3). Προσθήκη, στο τέλος του προγράμματος, της καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων (dissociation curves), για να εξακριβωθεί η μοναδικότητά τους και άρα η ειδικότητα της αντίδρασης.

Εικόνα 3.13: Αριστερά το μηχάνημα Chromo4 Real Time PCR και δεξιά εικόνα από το πρόγραμμα Opticon Monitor 3 που χρησιμοποιήθηκε.

Ε.2.3 Ανάλυση των πειραμάτων qRT-PCR

Στόχος των πειραμάτων qPCR ήταν η σύγκριση της έκφρασης της Geminin πριν και μετά τη διαμόλυνση με siRNA ή pSUPER πλασμίδια που στοχεύουν το mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική της **σχετικής ποσοτικοποίησης** («relative quantitation»). Σύμφωνα με αυτήν, γίνεται η κανονικοποίηση (normalization) κάθε πειραματικού δείγματος με το συνολικό υπό ανάλυση mRNA. Για να επιτευχθεί αυτό, η ανάλυση των υπο εξέταση γονιδίων ανάγεται ως προς κάποια γονίδια (συνήθως «συστατικά» γονίδια ή «house-keeping genes»), τα οποία οφείλουν να είναι παρόντα σε ίδιες ποσότητες μεταξύ των διεγμάτων (λέγονται γονίδια-αναφοράς, όπως πχ. η β-ακτίνη).

Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στο λεγόμενο «Threshold Value» (Ct) του κάθε δείγματος, που αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων που απαιτείται για να ξεπεράσει το κάθε υπό ανάλυση δείγμα ένα συγκεκριμένο όριο έντασης φθορισμού (το οποίο τίθεται μηχανικά μετά το τέλος της αντίδρασης, το λεγόμενο «threshold»). Ο μαθηματικός τύπος που περιγράφει τη διαφορά της ποσότητας δύο υπό σύγκριση δειγμάτων, βάσει των τιμών Ct που εμφανίζουν στο τέλος της αντίδρασης είναι ο εξής (Quantification strategies in real-time PCR by Michael W. Pfaffl, Editor: S.A. Bustin, International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA):

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_P}$$

όπου, **R** : φορές μεγαλύτερο ή μικρότερο το πρώτο από το δεύτερο,

και $\Delta\Delta CP$: η διαφορά των τιμών Ct των δύο δειγμάτων, αφού πρώτα έχει αφαιρεθεί και από τα δύο η τιμή Ct του γονιδίου-αναφοράς.

Έτσι, για ένα πείραμα στο οποίο επιθυμείται η σύγκριση της ποσότητας του «kd»-δείγματος (RNAi) σε σχέση με αυτή του «wt»-δείγματος (μάρτυρας), και ο εσωτερικός μάρτυρας είναι το mRNA της ακτίνης, η εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής :

$$\Delta\Delta CP_{kd} = (Ct_{kd} - Ct_{actin}) - (Ct_{wt} - Ct_{actin})$$

Και τελικά:

$$R_{kd} = 2^{-\Delta\Delta CP} \Rightarrow R_{kd} = 2^{-(Ct_{kd} - Ct_{actin}) - (Ct_{wt} - Ct_{actin})}$$

που δείχνει πόσες φορές μεγαλύτερο/μικρότερο είναι το «kd δείγμα» από το wt.

ΣΤ. ΛΟΙΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ακολουθούν οι συνταγές για την παρασκευή βασικών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, καθώς και των θρεπτικών υλικών όλων των τύπων κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν (και κάποια ακόμα διαλύματα κυτταροκαλλιέργειας):

- **Διάλυμα 1 M $MgCl_2$**

Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος αναδιαλύονται 10,165 gr $MgCl_2$ (MW=203,30) σε ddH₂O.

.

- **Διάλυμα 1 M KCl**

Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος αναδιαλύονται 3,73 gr KCl (MW=74,56) σε ddH₂O.

- **Διάλυμα 5 M NaCl**

Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος αναδιαλύονται 14,61 gr NaCl (MW=58,44) σε ddH₂O.

- **Διάλυμα 1 M HEPES-KOH**

Για 250 ml διαλύματος αναδιαλύονται 59,6 gr HEPES (Biomol, MW=238.3) σε 200 ml ddH₂O και ακολουθεί μεχαμέτρηση με διάλυμα 10 M KOH μέχρι την τιμή pH=6,7. Ογκομέτρηση στα 250 ml.

- **Διάλυμα 0,5 M φωσφορικών Na₂HPO₄/H₂NaPO₄, pH=7**

Αρχικά παρασκευάζονται 150 ml διαλύματος 0,5 M Na₂HPO₄ με την αναδιάλυση 10,64 gr της ουσίας σε 120 ml ddH₂O. Εν συνεχεία, παρασκευάζονται 50 ml διαλύματος 0,5 M H₂NaPO₄ με την αναδιάλυση 3,45 gr ουσίας σε 45 ml ddH₂O και ογκομέτρηση στα 50 ml. Ακολουθεί ανάμειξη των διαλυμάτων, ξεκινώντας από τα 150 ml διαλύματος 0,5 M Na₂HPO₄ με την αργή προσθήκη διαλύματος 0,5 M H₂NaPO₄ ενόσω το διάλυμα συγχρόνως πεχαμετρείται στην τιμή 7.

- **0,5 M EDTA, pH=8**

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος 0,5 M EDTA, pH=8 αναδιαλύονται 18,61 gr EDTA σε 60 ml ddH₂O και γίνεται πεχαμέτρηση με NaOH στην τιμή 8. Ογκομέτρηση στα 100 ml.

- **1M Tris-Cl, pH=8**

Για την παρασκευή 200ml διαλύματος 1M Tris-Cl, pH=8 αναδιαλύονται 24,22gr Trizma-base σε 150-160ml ddH₂O, ακολουθεί πεχαμέτρηση με HCl στην τιμή 8, και ογκομέτρηση στα 200ml.

- **200 mM Potassium ferrocyanide [K₄Fe(CN)₆·3H₂O], MW=422,4**

Για την παρασκευή 5 ml διαλύματος αναδιαλύονται 0,42241 gr σκόνης Potassium ferrocyanide (Sigma) σε αποστειρωμένο 1xPBS. Το διάλυμα διατηρείται στο σκοτάδι στους 4°C.

- **200 mM Potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆], MW=329,2**

Για την παρασκευή 5ml διαλύματος αναμειγνύω 0,32926 gr σκόνης Potassium ferricyanide (Sigma) σε αποστειρωμένο 1xPBS. Το διάλυμα διατηρείται στο σκοτάδι στους 4°C.

- **Δόσεις H_2O_2**

Για την επίτευξη οξειδωτικού στρες, οι δόσεις διαλύματος H_2O_2 (hydrogen peroxide ή perhydrol από MERCK ή RIEDEL) χορηγήθηκαν στα κύτταρα ως εξής:

- **1000 μM :** 30,6 μl αραιωμένου (1:100 σε H_2O) πυκνού H_2O_2 διαλύονται σε 10 ml θρεπτικό μέσο (10άρι τρυβλίο)
- **600 μM :** 18,4 μl αραιωμένου (1:100 σε H_2O) πυκνού H_2O_2 διαλύονται σε 10 ml θρεπτικό μέσο (10άρι τρυβλίο)
- **400 μM :** 12,2 μl αραιωμένου (1:100 σε H_2O) πυκνού H_2O_2 σε 10 ml θρεπτικό μέσο (10άρι τρυβλίο)
- **200 μM :** 6,12 μl αραιωμένου (1:100 σε H_2O) πυκνού H_2O_2 διαλύονται σε 10 ml θρεπτικό μέσο (10άρι τρυβλίο)
- **100 μM :** 3,06 μl αραιωμένου (1:100 σε H_2O) πυκνού H_2O_2 διαλύονται σε 10 ml θρεπτικό μέσο (10άρι τρυβλίο)
- **50 μM :** 1,5 μl αραιωμένου (1:100 σε H_2O) πυκνού H_2O_2 διαλύονται σε 10 ml θρεπτικό μέσο (10άρι τρυβλίο)

- **πολυμπρένιο (Hexadimethrine bromide-polybrene)**

Παρασκευή διαλύματος αποθήκευσης πολυμπρενίου με αναδιάλυσή του σε αποστειρωμένο milli-Q- H_2O ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 5 mg/ml (Sigma). Φύλαξη στους $-20^\circ C$. Για την επιτυχή έκβαση της διαμόλυνσης θα πρέπει το διάλυμα πολυμπρενίου να είναι όσο το δυνατόν πιο φρέσκο.

- **0,1 M κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)**

Αναδιάλυση 4,2 gr κιτρικού οξέος σε 200 ml dd H_2O .

- **0,2 M Na_2HPO_4**

Αναδιάλυση 5,68 gr σε 200 ml dd H_2O .

- **Διάλυμα χρώσης πυρήνων με Hoechst**

Για την παρασκευή 1 ml stock διαλύματος Hoechst 10 mg/ml γίνεται αναδιάλυση 10 mg σκόνης Hoechst (MW=533,9, Sigma Bisbenzimidazole H 33258) σε 1 ml dd H_2O .

Φύλαξη στους -20°C . Για τη χρήση του γίνεται αραίωση σε αναλογία 1:2000 σε διάλυμα PBS και πλύση των κυττάρων ως εξής:

1. Πλύση των κυττάρων με PBS-T κι επώαση με το διάλυμα Hoechst υπό ανάδευση για 2 min.
2. Ακολουθούν 2x2 min πλύσεις με PBS.

- **Θρεπτικά μέσα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν:**

- Όλα τα **καρκινικά** κύτταρα **HeLa**, **MCF7** και **U2OS** καθώς και οι **πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες** ούλου καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Gibco Cat. No. 41966-029) παρουσία 10% ορού FBS (fetal bovine serum, Gibco 10106-169) και των αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (P/S, Gibco, cat.no.15140-122). Η παρασκευή 500 ml πλήρους θρεπτικού μέσου γίνεται υπό άσπτες συνθήκες με την προσθήκη των εξής συστατικών:

Συστατικά	Συγκέντρωση stock	Στα 500 ml
DMEM	1x	500 ml
Ορός FBS	-	50 ml
Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη	100x	5 ml

- Τα πρωτογενή κύτταρα **WI-38** και **HUVEC** καλλιεργήθηκαν σε ειδικά θρεπτικά μέσα, των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται στους κάτωθι πίνακες

Για τα **WI-38**:

Θρεπτικό μέσο WI-38	Συγκέντρωση stock	Στα 500ml (τελική)
2x EMEM (Gibco)	2x	250 ml
Ορός FBS	-	50 ml (10%)
πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη	100X	5 ml
Phenol Red (Biochrome)	0,5 w/v	1 ml (10 µg/ml)
Αποστειρωμένο milli-Q-H₂O		250 ml

Για τα **HUVEC**:

Θρεπτικό μέσο HUVECs	Συγκέντρωση stock	Στα 200 ml (τελική)
M199 (Biochrome)	1x	1740ml
Ορός FBS	-	40 ml (20%)
πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη	100x	2 ml
HEPES (Sigma)	1 M	2 ml (10 mM)
L-γλουταμίνη (Gibco)	200 mM (100x)	2 ml (2 mM)
Ηπαρίνη (Sigma)	10 U/µl	100 µl
ECGS (Endothelial Cells Growth Supplement)	100x	2 ml (30 µg/ml)

- Το θρεπτικό υλικό των **MEF** (εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού) και των **υβριδωμάτων** ποντικού (για την παραγωγή του μονοκλωνικού αντισώματος) περιγράφεται στα επιμέρους κεφάλαια των «Υλικών και Μεθόδων» της εργασίας αυτής.

Στο τέλος γίνεται διήθηση των θρεπτικών υλικών με χρήση φίλτρου (Corning 430944) και μεταφορά τους σε νέο, καθαρό και αποστειρωμένο γυάλινο μπουκάλι. Φυλάσσονται στους 4°C.

- **Διάλυμα εργασίας 1X τρυψίνης**

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος 1x τρυψίνης γίνεται ανάμειξη υπό άσηπτες συνθήκες 1 ml 10x τρυψίνης (Gibco) με 9 ml αποστειρωμένου διαλύματος 1x PBS. Διήθηση με φίλτρο 0,22 μM. Η τρυψίνη αυτής της σύστασης χρησιμοποιήθηκε για όλα των ειδών τα κύτταρα εκτός των MEF, τα οποία απαιτούν διάλυμα τρυψίνης διαφορετικής σύστασης (βλ. κεφάλαιο Γ.2.1).

- **Διάλυμα ψύξης κυττάρων**

Η σύσταση του διαλύματος ψύξης κυττάρων είναι 10%DMSO*/FBS για όλα τα καρκινικά κύτταρα και τα υβριδώματα παραγωγής του μονοκλωνικού αντισώματος, ενώ για τα πρωτογενή κύτταρα ήταν 20%FBS/10%DMSO/DMEM. Για τα κύτταρα MEF το διάλυμα ψύξης είναι 15%FBS/10%DMSO/DMEM. Στο τέλος γίνεται αποστείρωση με φίλτρο μίας χρήσεως 0,22 μm. Φυλάσσεται στους -20°C.

(*DMSO: dimethylsulfoxide)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄

Ο παράγοντας αδειοδότησης Cdt1 και ο αρνητικός ρυθμιστής του Geminin ανιχνεύονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε πρωτογενή φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, ενώ τα επίπεδά τους μειώνονται σε κύτταρα προχωρημένης ηλικίας

1. Εισαγωγή

Ο όρος νεοπλασία αναφέρεται στη διαδικασία μη φυσιολογικής ανάπτυξης ιστού από κύτταρα γενετικώς εξαλλαγμένα, τα οποία απέκτησαν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται αυθαίρετα (Bartkova et al., 2006). Μηχανισμοί οι οποίοι με τη δράση τους διασφαλίζουν τη γονιδιωματική σταθερότητα των κυττάρων, συμβάλλουν στην αποφυγή τέτοιων φαινομένων. Ένας εξ αυτών είναι η διαδικασία που καθορίζει τη σωστή χρονικά και τοπικά έναρξη της αντιγραφής του DNA, γνωστή ως αδειοδότηση της αντιγραφής. Σε αυτή τη διαδικασία κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η συγκρότηση του προ-αντιγραφικού συμπλόκου (pre-Replicative Complex ή pre-RC) στις αφετηρίες της αντιγραφής. Βασικό μέλος του συμπλόκου αυτού είναι ο παράγοντας Cdt1, ο οποίος σε συνεργασία με τον παράγοντα Cdc6, είναι υπεύθυνος για την πρόσδεση των πρωτεϊνών MCM στη χρωματίνη. Η αδειοδοτική δράση του παράγοντα Cdt1 αναστέλεται από μια μικρομοριακή πρωτεΐνη, την Geminin (Nishitani et al., 2000; Wohlschlegel et al., 2000), η οποία ενεργοποιείται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη Cdt1 συσσωρεύεται στη χρωματίνη μετά το πέραςμα από τη μίτωση και κατά την αρχή της G1, προκειμένου να επιτραπεί ο σχηματισμός του προαντιγραφικού συμπλόκου κι επομένως η αδειοδότηση της αντιγραφής, ενώ κατά την πυροδότηση της αντιγραφής πρωτεολύεται από δύο – τουλάχιστον- διαφορετικούς μηχανισμούς (Nishitani et al., 2006; Nishitani et al., 2001). Αντίθετα, ο αναστολέας του Cdt1, Geminin, συσσωρεύεται στους πυρήνες των κυττάρων με την έναρξη της φάσης S, παραμένοντας μέχρι και τη μίτωση, οπότε και πρωτεολύεται από έναν τρίτο πρωτεολυτικό μηχανισμό που διαμεσολαβείται από το «σύμπλοκο-προώθησης της ανάφασης» (Anaphase Promoting Complex ή APC)(McGarry and Kirschner, 1998; Wohlschlegel et al., 2000). Παρά τις ενδείξεις έκφρασης των Cdt1 και Geminin σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών έχειδειχθεί, τόσο σε εκχυλίσματα ασύγχρονων ανθρώπινων καλλιιεργειών (με ανοσοκατακρύμνιση), όσο και *in vitro*, ενώ ο ρόλος της Geminin θεωρείται η αναστολή της δράσης του Cdt1, μέσω άμεσης πρόσδεσής της σε αυτόν (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Υπάρχει μια χρονική περίοδος συνέκφρασης των δύο πρωτεϊνών κατά τη

4. Αποτελέσματα

μετάβαση από την G1 στην S; Το πρότυπο συνέκφρασης των δύο πρωτεϊνών διαφοροποιείται στα καρκινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα;

Με σκοπό να απαντήσουμε τα παραπάνω ερωτήματα εστιάσαμε, στο πρώτο μέρος της συγκεκριμένης εργασίας, στη μελέτη του χωροχρονικού προτύπου της έκφρασης και της ρύθμισης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε ασύγχρονες καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών αλλά και καλλιέργειες πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών που αντιπροσωπεύουν, κατά το δυνατόν, τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού. Για τη μελέτη αυτή αξιοποιήθηκαν νέα εργαλεία ανίχνευσης του μορίου της Geminin που κατασκευάστηκαν για το λόγο αυτό, καθώς και τροποποιημένα πρωτόκολα ανοσοφθορισμού για την παρακολούθηση -σε επίπεδο ενός κυττάρου- της έναρξης της φάσης S.

2. Δημιουργία ενός νέου μονοκλωνικού αντισώματος για τη Geminin

Όπως έχει δείχθει και στο παρελθόν, η έκφρασή της Geminin είναι ιδιαίτερα χαμηλή στα πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η ανίχνευσή της (Xouri et al., 2004; Ξουρή, 2005, Διδακτορική Διατριβή). Για την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία ενός νέου μονοκλωνικού αντισώματος για την πρωτεΐνη Geminin.

Για τη δημιουργία του αντισώματος πραγματοποιήθηκε έκφραση ευρείας κλίμακας σε ετερόλογο βακτηριακό σύστημα της συντηρημένης περιοχής (76-160aa) της ανθρώπινης Geminin, συντηγμένης με επίτοπο 6-ιστιδινών (6-His tag), κι εν συνεχεία, καθαρισμός της παραχθείσας πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας σε κολώνα νικελίου. Η καθαρισμένη και συγκεντρωμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για τη δημιουργία υβριδωμάτων ικανών να παράγουν μονοκλωνικό αντίσωμα για την Geminin (EMBL Monoclonal Core Facility). Τα υβριδώματα καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο παρουσία ειδικού αυξητικού παράγοντα (Hybridoma Cloning Factor ή HCF, Sigma). Το μονοκλωνικό αντίσωμα συλλέχθηκε από το υπερκείμενο (Tissue Culture Supernatant ή TCS) και χρησιμοποιήθηκε απευθείας σε πείραμα ανοσοφθορισμού αλλά και σε ανοσοαποτύπωμα Western με σκοπό να προσδιοριστεί η ειδικότητά του (εικόνα 4.1). Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκε το ήδη χαρακτηρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-Geminin (Xouri et al., 2004).

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.1: Έλεγχος της ειδικότητας του νέου μονοκλωνικού αντισώματος για την Geminin με ανοσοαποτύπωμα Western (A) και ανοσοφθορισμό (B), χρησιμοποιώντας ως αντίσωμα αναφοράς το παλαιότερα χαρακτηρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα.

Όπως φαίνεται στο ανοσοαποτύπωμα Western της εικόνας 4.1A, το νέο αντίσωμα (αριστερά) αναγνωρίζει με ειδικό τρόπο μία μοναδική ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των ~30kDa, ενώ το γνωστό από προηγούμενες μελέτες πολυκλωνικό αντίσωμα (δεξιά), εκτός της ειδικής ζώνης, εμφανίζει και μία μη ειδική ζώνη γύρω στα ~50kDa. Τα HeLa κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της Geminin σε σχέση με τα MCF7 και με τα δύο αντισώματα, όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί (Xouri et al., 2004). Αντίστοιχα, στο πείραμα ανοσοφθορισμού με το μονοκλωνικό αντίσωμα (εικόνα 4.1B) παρατηρείται ειδική πυρηνική χρώση και απουσία χρώσης από τους πυρήνες σε ποσοστό περίπου ~50% των κυττάρων της καλλιέργειας (HeLa κυττάρων). Η εικόνα αυτή συμπίπτει με την εικόνα από το πολυκλωνικό αντίσωμα (εικόνα 4.1B).

Το νέο αυτό αντίσωμα αποτέλεσε ένα ευαίσθητο μοριακό εργαλείο, στην προσπάθεια ενδοκυτταρικής εντόπισης της Geminin και ανίχνευσης του μορίου σε ολικά εκχυλίσματα πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών, αλλά και πρωτογενών εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού (βλ. κεφάλαιο Δ).

3. Αντίστροφο πρότυπο χρονικής έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin κατά τον κυτταρικό κύκλο καρκινικών και φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων

Η σωστή χρονικά ρύθμιση της έκφρασης των Cdt1 και Geminin είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, αφού από αυτήν εξαρτάται η ορθή αδειοδότηση της αντιγραφής και μέσω αυτής η ομαλή εναλλαγή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η μείωση του παράγοντα Cdt1 κατά την G1/S είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία η οποία υπόκειται σε ελεγκτικούς μηχανισμούς που δρουν στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο του κύκλου, όπως είναι η αύξηση της κυκλίνης A και η ενεργοποίηση των αντίστοιχων κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDK), καθώς και η ενεργοποίηση λιγασών της ουβικουΐτινης, των οποίων η δράση είναι συζευγμένη με την πυροδότηση της αντιγραφής.

Με σκοπό να μελετήσουμε το χρονικό πρότυπο έκφρασης Cdt1 και Geminin κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και να αντιπαραβάλουμε το πρότυπο αυτό σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήσαμε πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού σε ασύγχρονες καλλιέργειες: 1) καρκινικών κυτταρικών σειρών τραχήλου της μήτρας (HeLa) και μαστού (MCF7), 2) νεαρών (P14 ή διπλασιασμοί κυττάρων PDLs=28) ανθρώπινων ινοβλαστών που απομονώθηκαν από βιοψίες ούλων νεαρών φυσιολογικών ατόμων (Εργαστήριο Παιδοενδοκρινολογίας, κα Σπηλιώτη-Γκρέκα), και 3) ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (HUVECs, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, κος Τσοπάνογλου). Με την τεχνική του ανοσοφθορισμού είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί τόσο ο έλεγχος της ενδοκυτταρικής εντόπισης πρωτεϊνών, όσο και η μελέτη της χρονικής έκφρασής τους με τη χρήση πρωτεϊνών-μαρτύρων των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι η κυκλίνη A, η οποία εκφράζεται ειδικά κατά την S και G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων διπλού ανοσοφθορισμού για Cdt1 και κυκλίνη A, και για Geminin και κυκλίνη A στους διάφορους κυτταρικούς τύπους παρουσιάζονται στη εικόνα 4.2.

Όπως φαίνεται στις φωτογραφίες της εικόνας 4.2A, τόσο η πρωτεΐνη Cdt1 όσο και η Geminin εκφράζονται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου: έκφραση της πρωτεΐνης Cdt1 ανιχνεύεται μόνο σε πυρήνες αρνητικούς για κυκλίνη A, τόσο στα πρωτογενή όσο και στα καρκινικά κύτταρα, επομένως, εκφράζεται σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση G1 (αυτό μαρτυρούν τα σχεδόν μηδενικά ποσοστά μαύρης μπάρας που αντιστοιχεί στη συνέκφραση των μορίων Cdt1 και κυκλίνης A). Η Geminin, αντίθετα, συνεκφράζεται με την κυκλίνη A σε υψηλά ποσοστά κυττάρων, τόσο στα πρωτογενή όσο και στα καρκινικά κύτταρα που εξετάστηκαν, γεγονός το οποίο συμφωνεί με ένα πρότυπο έκφρασης της Geminin που καλύπτει τις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου.

4. Αποτελέσματα

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι οι παράγοντες Cdt1 και Geminin εκφράζονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ το πρότυπο έκφρασής τους είναι παρόμοιο, τόσο σε καρκινικά μετασχηματισμένα όσο και σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα.

Εικόνα 4.2: Πρότυπο έκφρασης των μορίων Cdt1 και Geminin σε φυσιολογικά πρωτογενή και καρκινικά κύτταρα με πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού. Χρήση της κυκλίνης A ως πρωτεΐνης-αναφοράς των φάσεων S και G2 του κυτταρικού κύκλου. **A)** Χαρακτηριστικές φωτογραφίες ανοσοφθορισμού στις οποίες είναι εμφανές ότι τα μόρια Cdt1 και Geminin εκφράζονται σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων. Στο μπλε φίλτρο είναι ορατή η φθορίζουσα χρωστική DAPI που βάφει τους πυρήνες (DNA), με αποτέλεσμα να εμφανίζονται όλα τα κύτταρα του πεδίου, στο πράσινο φίλτρο βλέπουμε τις πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin, ενώ στο κόκκινο την κυκλίνη A, και **B)** ποσοτικοποίηση (%) της έκφρασης των Cdt1/κυκλίνη A και Geminin/κυκλίνη A στις καλλιέργειες των διαφόρων κυτταρικών τύπων. Η **συνέκφραση** (Cdt1+/κυκλίνη A+ και Geminin+/κυκλίνη A+) συμβολίζεται με **μαύρο** χρώμα, η **αρνητική** έκφραση και των δύο πρωτεϊνών με **λευκό**, ενώ η έκφραση μόνο του **πρώτου** (Cdt1+/κυκλίνη A- και Geminin+/κυκλίνη A-) ή μόνο του **δεύτερου** (Cdt1-/κυκλίνη A+ και Geminin-/κυκλίνη A+) συμβολίζονται με τις δύο αποχρώσεις του γκρι (σκούρο ή πιο ανοιχτό γκρι αντίστοιχα).

4. Η πρωτεΐνη Cdt1 δεν ανιχνεύεται στην S ενώ η Geminin συσσωρεύεται λίγο μετά την έναρξη της S σε καρκινικά και φυσιολογικά πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα

Δεδομένου του διαφορετικού χρονικού προτύπου έκφρασης των Cdt1 και Geminin κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, θελήσαμε να εστιάσουμε στη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου και να προσδιορίσουμε μικροσκοπικά, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, την έκφραση των δύο αυτών ρυθμιστών της αδειοδότησης συναρτήσει της έναρξης της φάσης S.

Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο διπλού ανοσοφθορισμού σε μεμονωμένα κύτταρα που προηγουμένως είχαν σημειωθεί παροδικά με βρωμοδεοξυουριδίνη (BrdU). Η βρωμο-δεόξυ-ουριδίνη (BrdU) είναι ένα χημικό ανάλογο της θυμιδίνης, το οποίο ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA κατά την αντιγραφή του στη φάση S και μπορεί να ανιχνευτεί με ανοσοφθορισμό, μέσω ειδικού για την BrdU αντισώματος. Προσθήκη BrdU στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων για μικρό χρονικό διάστημα (1-2 ώρες), επιτρέπει την σήμανση των κυττάρων που βρίσκονται τη δεδομένη στιγμή σε φάση S.

Παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι η αντιγραφή του DNA λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες υποπεριοχές του πυρήνα, οι οποίες, με ανοσοφθορισμό της ενσωματωμένης BrdU, εμφανίζονται ως μικρά φθορίζοντα στίγματα στον πυρήνα. Τα στίγματα αυτά παρουσιάζουν αλλαγές στον εντοπισμό, στο σχήμα, το μέγεθος και τον αριθμό τους με την πάροδο της S φάσης, δίνοντας έτσι, διαφορετικό πρότυπο χρώσης στους πυρήνες των κυττάρων στα διάφορα υποστάδια της S (αρχή, μέση ή τέλος S) (Dimitrova and Berezney, 2002; Dimitrova and Gilbert, 1999; Kennedy et al., 2000; Kikuchi et al., 1997; Mantamadiotis et al., 1998; Nakayasu and Berezney, 1989; O'Keefe et al., 1992). Στην αρχή (αρχή-I) ενεργοποιούνται οι θέσεις αντιγραφής που βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές (πολλαπλά μικρά στίγματα στο πυρηνόπλασμα μακριά από την περιφέρεια και τους πυρηνίσκους), ενώ λίγο αργότερα (αρχή-II και μέση S) ενεργοποιούνται και οι ετεροχρωματινικές περιοχές (πολλά, μεγαλύτερα και ακανόνιστου σχήματος στίγματα, τόσο διάχυτα στο πυρηνόπλασμα όσο και στην περιφέρεια του πυρήνα και τις περιπυρηνισκικές περιοχές). Στο τέλος της S παρατηρούνται λιγιστά και μεγάλα στίγματα, που μοιάζουν περισσότερο με κοκκία (Dimitrova and Berezney, 2002).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τόσο σε καρκινικά κύτταρα MCF7 όσο και σε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες. Χορηγήθηκε BrdU σε ασύγχρονα κύτταρα κι ακολούθως εφαρμόστηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού με στόχο την ταυτόχρονη ανοσο-εντόπιση των Cdt1 και BrdU και των Geminin και BrdU στα κύτταρα. Τα BrdU-θετικά κύτταρα αναλύθηκαν ως προς την έκφραση των Cdt1 και της Geminin που επιδείκνυαν. Τα αποτελέσματα του πειράματος

4. Αποτελέσματα

ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκε στα καρκινικά κύτταρα MCF7 και στα πρωτογενή κύτταρα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.3.

Εικόνα 4.3: Έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Geminin σε BrdU-θετικά καρκινικά κύτταρα MCF7. **A)** Ποσοτικοποίηση (%) της έκφρασης του Cdt1 (αριστερά) και της Geminin (δεξιά) σε BrdU θετικά κύτταρα, τόσο σε MCF7 όσο και πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες, και **B)** φωτογραφίες από το πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού για Cdt1/BrdU σε MCF7 καρκινικά κύτταρα.

Τα BrdU θετικά κύτταρα εμφανίζονται πάντα (100%) αρνητικά για Cdt1 (εικόνα 4.3A και 4.3B). Αντίθετα, τα BrdU θετικά κύτταρα εμφανίζονται στην πλειονότητά τους θετικά για Geminin, με ένα μικρό ποσοστό αυτών να εμφανίζουν αχνή ή αρνητική χρώση για Geminin (εικόνα 4.3A). Η έκφραση της Geminin συναρτήσει της πορείας της φάσης S φαίνεται στην εικόνα 4.4 (στα MCF7 καρκινικά κύτταρα) και 4.5 (φυσιολογικοί ινοβλάστες).

Εικόνα 4.4: Έκφραση της πρωτεΐνης Geminin συναρτήσει της εξέλιξης της φάσης S στα **MCF7 καρκινικά κύτταρα**. **A)** Οι πυρήνες τοποθετήθηκαν προς τα δεξιά σύμφωνα με τη χρονική εξέλιξη της φάσης S (η κατάταξη έγινε βάσει του προτύπου BrdU χρώσης που επιδεικνύουν οι πυρήνες σύμφωνα με Dimitrova *et. al.* (Dimitrova and Berezney, 2002), κι εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Geminin. Με λευκό βέλος σημαίνονται οι πυρήνες που μεγενθύνονται στην άκρη της εικόνας και αντιπροσωπεύουν το υποστάδιο της S στο οποίο αναφερόμαστε, **B)** προβολή (overlay) των μεγενθυμένων φωτογραφιών του A, για καλύτερη παρακολούθηση της συνεντόπισης των BrdU και Geminin, ανά κύτταρο, κατά την εξέλιξη της φάσης S, **Γ)** ανάλυση στα BrdU θετικά MCF7 κύτταρα: το 92% των κυττάρων που εκφράζουν Geminin βρίσκονται στη μέση ή στο τέλος της S, ενώ το 77% και το 80% των κυττάρων που δεν εκφράζουν ή εκφράζουν αχνά Geminin βρίσκονται στην αρχή της S, και **Δ)** στα ίδια κύτταρα, η αντίστροφη ανάλυση: πρώτα χαρακτηρισμός των κυττάρων ανάλογα με το υποστάδιο στο οποίο βρίσκονται (αρχή ή μέση/τέλος S) και ακολούθως προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της Geminin στα κύτταρα αυτά.

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.5: Μελέτη της έκφρασης της Geminin συναρτήσει της έναρξης της φάσης S σε **πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες**. **A)** Οι πυρήνες τοποθετήθηκαν από αριστερά προς τα δεξιά σύμφωνα με τη χρονική εξέλιξη της φάσης S (πάνω), κι εν συνεχεία, εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Geminin (κάτω). **B)** προβολή (overlay) των φωτογραφιών του A, για καλύτερη παρακολούθηση της συνεντόπισης των BrdU και Geminin, ανά κύτταρο, κατά την εξέλιξη της φάσης S.

Όπως είναι εμφανές στις παραπάνω εικόνες, τα επίπεδα της Geminin είναι χαμηλά τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα πρωτογενή κύτταρα που βρίσκονται στην αρχή της S, ενώ δείχνουν να αυξάνονται με την πρόοδο της S.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, γίνεται φανερό ότι:

- Η πρωτεΐνη Cdt1 δεν εκφράζεται σε BrdU θετικά κύτταρα, τόσο στα καρκινικά όσο και στα πρωτογενή που εξετάστηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ταχεία αρνητική ρύθμιση των επιπέδων του με την είσοδο των κυττάρων στη φάση S.
- Η πλειοψηφία των BrdU θετικών κυττάρων εμφανίζει έντονη χρώση για Geminin. Παρατηρήθηκαν, ωστόσο, μικρότερα ποσοστά BrdU θετικών κυττάρων που είτε δεν εξέφραζαν

4. Αποτελέσματα

καθόλου Geminin (λευκή μπάρα), είτε εξέφραζαν αχνά (γκρι μπάρα) τόσο στα πρωτογενή όσο και στα καρκινικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, κατά συντριπτική πλειοψηφία, κατατάσσονταν στην αρχή της φάσης S. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μετά την είσοδο στην S, πραγματοποιείται σταδιακά η συσσώρευση της πρωτεΐνης Geminin.

Συνολικά, συμπεραίνουμε ότι ο παράγοντας Cdt1 βρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα κατά την φάση S, ενώ αντίθετα η Geminin συσσωρεύεται λίγο μετά την έναρξη της S φάσης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin δε συνεκφράζονται κατά το χρονικό «παράθυρο» της G1/S μετάβασης.

5. Οι παράγοντες Cdt1 και Geminin δε συνεντοπίζονται στα ίδια κύτταρα – σημασία της πρωτεόλυσης για τη ρύθμιση του παράγοντα Cdt1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Για να διαπιστώσουμε άμεσα κατά πόσο οι παράγοντες Cdt1 και Geminin συνεκφράζονται σε κάποια χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, κι έχοντας ως εργαλείο το νέο μονοκλωνικό αντίσωμα που δημιουργήσαμε για την Geminin, πραγματοποιήσαμε πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων αντι-Cdt1 και αντι-Geminin, με στόχο την ταυτόχρονη ανοσοεντόπιση των δύο πρωτεϊνών, τόσο σε νεαρούς ινοβλάστες (P14 ή PDLs=28), όσο και σε καρκινικά MCF7 κύτταρα. Παράλληλα, θελήσαμε να εξετάσουμε τη συμβολή της πρωτεόλυσης στη ρύθμιση των επιπέδων των δύο πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Για το σκοπό αυτό, μέρος των καλλιιεργειών υποβλήθηκε προηγουμένως σε επώαση με το φάρμακο MG132, που αποτελεί γνωστό αναστολέα του πρωτεασώματος, κι ακολούθως πραγματοποιήθηκε πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού για όλα τα δείγματα μαζί. Στην εικόνα 4.6 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των πειραμάτων αυτών (Α), καθώς και τα ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών στον πληθυσμό πριν και μετά τη χορήγηση του MG132 (Β).

Και στους δύο τύπους κυττάρων που εξετάστηκαν (πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες και καρκινικά MCF7 κύτταρα) οι μόνοι πληθυσμοί που παρατηρήθηκαν ήταν κύτταρα που εξέφραζαν είτε μόνο Cdt1 (σκούρο γκρι), είτε μόνο Geminin (ανοικτό γκρι), είτε καμιά από τις δύο πρωτεΐνες (λευκό), ενώ πάντα απουσίαζε η μαύρη μπάρα που αντιστοιχούσε στη συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών. Αυτό δείχνει ότι, τουλάχιστον υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin δε συνεκφράζονται σε κυτταρικό επίπεδο.

Μετά την προσθήκη του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εξέφραζαν Cdt1 (από ~30% σε ~70% στους πρωτογενείς

4. Αποτελέσματα

ινοβλάστες και από ~50% σε ~90% στα καρκινικά κύτταρα MCF7). Αντίθετα, τα ποσοστά των κυττάρων που εξέφραζαν Geminin παρέμειναν αμετάβλητα. Κοιτώντας τη συνέκφραση των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin μετά την προσθήκη του MG132, διαπιστώνουμε δραματική αύξηση αυτής τόσο στα πρωτογενή όσο και στα καρκινικά κύτταρα MCF7 (εμφανίζεται με κίτρινο χρώμα στις προβολές των φωτογραφιών της εικόνας 4.6A και με μαύρη μπάρα στις ποσοτικοποιήσεις της εικόνας 4.6B). Τα ποσοστά των κυττάρων που εκφράζουν μόνο Cdt1 (σκούρο γκρι) παραμένουν αμετάβλητα, ενώ δεν παρατηρούνται κύτταρα που να εκφράζουν μόνο την πρωτεΐνη Geminin (ανοιχτό γκρι). Οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι, με την αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος, το Cdt1 ξεφεύγει της πρωτεόλυσής του και διατηρεί την έκφρασή του στις φάσεις S και G2, κατά τις οποίες φυσιολογικά εκφράζεται μόνο η Geminin, με αποτέλεσμα, οι δύο πρωτεΐνες να εμφανίζονται μαζί στους πυρήνες των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις αυτές.

Εικόνα 4.6: Έκφραση των Cdt1 και Geminin σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς μίας ασύγχρονης καλλιέργειας φυσιολογικών-πρωτογενών κυττάρων (P14) ή καρκινικών κυττάρων (MCF7). **A)** φωτογραφίες από πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού για Cdt1 και Geminin με ή χωρίς την επώαση με MG132, και **B)** ποσοτικοποίηση (%) της συνέκφρασης των Cdt1 και Geminin στους πληθυσμούς κυττάρων, πριν (C) και μετά (+MG132) την προσθήκη του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132. Τα γραφήματα στο κάτω μέρος της εικόνας

4. Αποτελέσματα

παρουσιάζουν τα συνολικά επίπεδα Cdt1 (αριστερά) και Geminin (δεξιά) στον πληθυσμό, πριν (C) και μετά (+MG132) την προσθήκη του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132.

Αντίθετα, η έκφραση της Geminin δε φάνηκε να αλλάζει στον πληθυσμό με την προσθήκη του MG132 και στους δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων που εξετάστηκαν, παρότι είναι γνωστό ότι πρωτεολύεται μέσω της δράσης του πρωτεασώματος στη φάση της μίτωσης. Το παραπάνω αποτέλεσμα επισημαίνει, ίσως, τη σημασία άλλων μηχανισμών μηχανισμών -πέραν της πρωτεόλυσης- στη ρύθμιση των επιπέδων της Geminin κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύτταρικού κύκλου, τόσο των πρωτογενών όσο και των καρκινικών κυττάρων.

6. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin είναι μειωμένα σε κύτταρα μεγάλης ηλικίας

Τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, σε αντίθεση με τα καρκινικά, δε διαιρούνται επ'άπειρον σε καλλιέργεια. Αφού επιτελέσουν ένα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων, εισέρχονται -μη αντιστρεπτά- σε μία κατάσταση εκτός κυτταρικού κύκλου, που ονομάζεται κυτταρική γήρανση. Με σκοπό να μελετηθεί η συνέκφραση και η ρύθμιση μέσω πρωτεόλυσης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε κύτταρα που γηράσκουν σε καλλιέργεια, υποβάλαμε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες που προηγουμένως είχαν αφεθεί να πολλαπλασιαστούν *in vitro* για πολλές κυτταρικές διαιρέσεις (απο γενιά P14 που αντιστοιχεί σε κυτταρικούς διπλασιασμούς PDLs=28 έως γενιά P32/PDLs=46) σε πείραμα ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας αντισώματα αντι-Cdt1 και αντι-Geminin, απουσία (C) ή παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 (+MG132). Τα αποτελέσματα που πήραμε συνοψίζονται στην εικόνα 4.7.

Στα κύτταρα προχωρημένης ηλικίας οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin διατηρούν τη σωστή ενδοκυτταρική τους εντόπιση (πυρηνική) και το σωστό χρονικό πρότυπο έκφρασης (όπως διαπιστώθηκε σε πείραμα με μάρτυρα την κυκλίνη A), ωστόσο, η έκφρασή τους περιορίζεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό (που δεν ξεπερνά το 10%) της καλλιέργειας. Αυτό γίνεται φανερό από το ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό αρνητικών και για τις δύο πρωτεΐνες κυττάρων (λευκή μπάρα, εικόνα 4.7B), σε σχέση με την αντίστοιχη κατηγορία στην καλλιέργεια των νεαρών κυττάρων (εικόνα 4.6B).

Μετά τη προσθήκη του MG132 το ποσοστό των +/- κυττάρων παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητο (μαύρα βέλη εικ.6B), γεγονός που υποδεικνύει ότι η μείωση της έκφρασης των παραγόντων Cdt1

4. Αποτελέσματα

και Geminin που παρατηρείται στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας δε λαμβάνει κατά κύριο λόγο χώρα μέσω πρωτεόλυσης. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin με την αύξηση της ηλικίας των πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών επιβεβαιώνεται και με ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων των παραπάνω κυττάρων με ανοσοαποτύπωμα Western. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής παρουσιάζονται στην εικόνα 4.7.

Εικόνα 4.7: Μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε καλλιέργεια πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών μεγάλης ηλικίας. Πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες που αφέθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε *in vitro* καλλιέργεια προκειμένου να μεγαλώσουν ηλικιακά, υποβλήθηκαν σε πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού για την ταυτόχρονη εντόπιση των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin. Συγχρόνως, ελέγχθηκε η ρύθμιση, μέσω πρωτεόλυσης, των πρωτεϊνών με τη χρήση του φαρμάκου MG132. **A)** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από το πείραμα διπλού ανοσοφθορισμού για Cdt1 και Geminin στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας, και **B)** Ποσοστά (%) κυττάρων που εκφράζουν Cdt1/Geminin (πάνω), αλλά και τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών στον πληθυσμό (κάτω), πριν και μετά τη προσθήκη του αναστολέα του πρωτεασώματος. Με μαύρα βέλη τονίζεται η αδυναμία συσσώρευσης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin στα κύτταρα μεγάλης ηλικίας, κατόπιν αναστολής της δράσης του πρωτεασώματος.

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.8: Μείωση των ολικών επιπέδων έκφρασης των Cdt1 (δεξιά) και Geminin (αριστερά) με την αύξηση της ηλικίας πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών, ύστερα από ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western. Παρατηρείται ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών κυκλίνη A (δείκτης S/G2 φάσης) και MCM7 (μέλος του προ-αντιγραφικού συμπλόκου), καθώς και της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Rb, ενώ αντίθετα παρατηρείται αύξηση της γ -H2AX (σηματοδοτεί τη συσσώρευση βλαβών στο DNA) και του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου $p21^{Cip1/Waf1}$ (ενδεικτικός της ενεργοποίησης του p53-μονοπατιού). Με αστερίσκο σημειώνονται οι μη ειδικές ζώνες που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων διαπιστώνουμε ότι ο παράγοντας αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, Cdt1, καθώς και ο αναστολέας αυτού, Geminin, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε καλλιέργειες κυττάρων αυξημένης ηλικίας. Το γεγονός αυτό, παραπέμπει σε πιθανή αρνητική ρύθμιση των δύο παραγόντων -με τρόπο που δεν εξαρτάται από τη δράση του πρωτεασώματος- κατά την είσοδο των ινοβλαστών σε κυτταρική γήρανση. Η υπόθεση αυτή εξετάζεται στα επόμενα κεφάλαια των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β'

Έκφραση των μορίων Cdt1 και Geminin κατά την κυτταρική γήρανση ανθρώπινων ινοβλαστών

1. Εισαγωγή

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας και άλλων έδειξαν ότι οι παράγοντες Cdt1 και Geminin εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα σε ταχέως διαιρούμενους ιστούς και σε καρκινικά κύτταρα, ενώ εμφανίζουν μειωμένη έκφραση σε κύτταρα σε φάση ηρεμίας (ή G0), τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεϊνικό (Bravou et al., 2005; de la Fuente et al., 2004; Kingsbury et al., 2005; Xouri et al., 2004). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η έκφραση των παραγόντων Cdt1 και Geminin είναι συνδεδεμένη με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται ως μία μη αντιστρεπτή, βιώσιμη κατάσταση εκτός κυτταρικού κύκλου, στην οποία εισέρχονται τα κύτταρα αφού επιτελέσουν ένα πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (αναπαραγωγική γήρανση) (Campisi, 1996; Hayflick, 1965). Κύριο χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων, εκτός από την ιδιαίτερη μορφολογία, είναι η αδυναμία περαιτέρω πολλαπλασιασμού. Κατά το παρελθόν έχει προταθεί ότι η πτώση των επιπέδων έκφρασης και λειτουργίας του προαντιγραφικού συμπλόκου μπορεί να λειτουργεί ως ένας μηχανισμός ελέγχου της εξόδου των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο και άρα ελέγχου του πολλαπλασιασμού τους (Bartkova et al., 2006; Kingsbury et al., 2005; Shreeram et al., 2002; Tachibana et al., 2005).

Πράγματι, όπως παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι παράγοντες Cdt1 και Geminin εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες προχωρημένης ηλικίας. Με στόχο να εξεταστεί εάν η μείωση των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων αδειοδότησης του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin σε ινοβλάστες μεγάλης ηλικίας σχετίζεται με την είσοδο των κυττάρων σε γήρανση, πραγματοποιήθηκαν μελέτες έκφρασης των συγκεκριμένων μορίων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής γήρανσης πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλάστων WI-38 («σειρά Hayflick»), μίας καλά χαρακτηρισμένης πρωτογενούς κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα κυτταρικής γήρανσης, αλλά και κατά την επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης ύστερα από οξειδωτικό στρες.

2. Πιστοποίηση εισόδου των WI-38 διπλοειδών ανθρώπινων ινοβλαστών σε αναπαραγωγική γήρανση

Αρχικά, έπρεπε να πιστοποιήσουμε την είσοδο των WI-38 κυττάρων σε αναπαραγωγική γήρανση. Για το σκοπό αυτό, νεαροί ανθρώπινοι ινοβλάστες WI-38 (γενιά P12, ATCC) διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα ούτως ώστε να οδηγηθούν σε αναπαραγωγική γήρανση. Κατά την πορεία αυτή, δείγματα κυττάρων συλλέγονταν με σκοπό την ανάλυσή τους με ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Πρόκειται για μία ιστοχημική μέθοδο πιστοποίησης της γήρανσης που ανακαλύφθηκε από τους Campisi J. και Dimri G.P (Dimri et al., 1995), όταν διαπίστωσαν ότι το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, που απαντάται φυσιολογικά στα λυσοσώματα όλων των κυττάρων και ανιχνεύεται με την προσθήκη του υποστρώματός του (X-gal) σε υδατικό διάλυμα με pH=4, παρουσιάζει «ιδιόμορφη συμπεριφορά» μόνο στα γηρασμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ανιχνεύσιμη και σε πιο βασικό pH (pH=6). Αν και έχουν δοθεί πολλές πιθανές ερμηνείες, δεν έχει πιστοποιηθεί η ακριβής βιοχημική-μοριακή βάση της συγκεκριμένης χρώσης. Παρόλα αυτά, αποτελεί μέχρι σήμερα τον πιο κοινά αποδεκτό βιομάρτυρα κυτταρικής γήρανσης, αφού αυξάνεται σε κύτταρα ή ιστούς αυξανόμενης ηλικίας, ενώ επίσης δεν βάφει καρκινικά, αποπτωτικά, διαφοροποιημένα ή κύτταρα σε φάση ηρεμίας G0. Στην εικόνα 4.9 παρατίθενται τα αποτελέσματα της χρώσης αυτής για τα κύτταρα WI-38 ηλικίας P15 έως P30.

Συμπεραίνουμε ότι η γήρανση επέρχεται στον πληθυσμό μετά τη γενιά P25. Εκτός από τη χαρακτηριστική μπλε χρώση της β-γαλακτοσιδάσης και τη μικρότερη πυκνότητα των γηρασμένων κυττάρων στην καλλιέργεια, παρατηρήθηκε αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων, από το λεπτό ατρακτοειδές σχήμα των ινοβλαστών, σε πιο στρογγυλό και πεπλατυσμένο. Η ποσοτικοποίηση του πειράματος δείχνει ότι η είσοδος των κυττάρων σε γήρανση ξεκινά μετά τη γενιά P24 (σταδιακή αύξηση της μαύρης μπάρας), ενώ η πλειονοψηφία των κυττάρων στην καλλιέργεια εισέρχεται σε γήρανση μετά τη γενιά P26. Τα κύτταρα κατηγοριοποιήθηκαν σε νεαρά, μέσης ηλικίας και γηρασμένα, ανάλογα με το ποσοστό της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό (πίνακας εικόνας 4.9).

Εικόνα 4.9: Πιστοποίηση της εισόδου των διπλοειδών ανθρώπινων ινοβλαστών WI-38 σε αναπαραγωγική γήρανση με τη χρήση της ιστοχημικής μεθόδου της β-γαλακτοσιδάσης. Πάνω: αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες αντίθεσης φάσεως ανθρώπινων ινοβλαστών αυξανόμενης ηλικίας, ύστερα από ιστοχημική ανάλυση με τη χρώση β-γαλακτοσιδάσης στο pH 4 (βάφει όλα τα κύτταρα) και 6 (βάφει μόνο τα γηρασμένα), και κάτω: ποσοστά (%) των κυττάρων της καλλιέργειας που βρέθηκαν θετικά για τη χρώση β-γαλακτοσιδάσης στις διάφορες ηλικίες των κυττάρων.

3. Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin, αν και διατηρούν το σωστό πρότυπο έκφρασης, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης κατά την αναπαραγωγική γήρανση των WI-38 διπλοειδών ανθρώπινων ινοβλαστών

Στόχος μας ήταν η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin, τόσο σε επίπεδο υποκυτταρικής εντόπισης όσο και χρονικής έκφρασης, σε ινοβλάστες WI-38 που γερνούν. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού σε καλλιέργειες WI-38 διπλοειδών ινοβλαστών αυξανόμενων ηλικιών. Η εικόνα 4.10 συνοψίζει τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος διπλού ανοσοφθορισμού.

Εικόνα 4.10: Πρότυπο έκφρασης των Cdt1 και Geminin σε διπλοειδείς ανθρώπινους ινοβλάστες WI-38 κατά την είσοδό τους σε αναπαραγωγική γήρανση. Κύτταρα WI-38 αφέθηκαν σε καλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να εισέλθουν σε αναπαραγωγική γήρανση και αναλύθηκαν με διπλό ανοσοφθορισμό για την έκφραση των πρωτεϊνών Cdt1 (πάνω) και Geminin (κάτω) σε σχέση με την έκφραση της κυκλίνης A (μάρτυρας των φάσεων S και G2 του κυτταρικού κύκλου). Κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες της ανοσοϊστοχημικής αντίχρεσης των πρωτεϊνών.

Στην εικόνα 4.11 ακολουθεί η ποσοτικοποίηση του παραπάνω πειράματος.

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.11: Ποσοτικοποίηση (%) της έκφρασης των Cdt1/κυκλίνη A (πάνω) και Geminin/κυκλίνη A (κάτω) σε καλλιέργειες WI-38 ανθρώπινων ινοβλαστών αυξανόμενης ηλικίας. Η **συνέκφραση** (Cdt1+/κυκλίνη A+ ή Geminin+/κυκλίνη A+) συμβολίζεται με **μαύρο** χρώμα, η **αρνητική** έκφραση και των δύο πρωτεϊνών με **λευκό**, ενώ η έκφραση μόνο του **πρώτου** (Cdt1+/κυκλίνη A- ή Geminin+/κυκλίνη A-) ή μόνο του **δεύτερου** (Cdt1-/κυκλίνη A+ ή Geminin-/κυκλίνη A+) συμβολίζονται με τις δύο αποχρώσεις του γκρι (**σκούρο** ή πιο **ανοιχτό** γκρι αντίστοιχα).

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων (εικόνες 4.10 και 4.11) συμπεραίνουμε ότι κατά την είσοδο των WI-38 ανθρώπινων ινοβλαστών σε αναπαραγωγική γήρανση:

- Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin διατηρούν την εντόπισή τους στον πυρήνα των πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών.
- Το χρονικό πρότυπο έκφρασή τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παραμένει σωστό: ο παράγοντας Cdt1 δεν συνεκφράζεται με την κυκλίνη A (φαίνεται από την απουσία μαύρης μπάρας σε όλες τις ηλικίες των κυττάρων που εξετάστηκαν), ενώ αντίθετα η Geminin δείχνει απόλυτη συσχέτιση της έκφρασής της με την κυκλίνη A (υψηλά ποσοστά μαύρης μπάρας σε όλες τις ηλικίες των κυττάρων).
- Ωστόσο, το ποσοστό (%) των κυττάρων που εκφράζουν Cdt1 και Geminin σταδιακά μειώνεται.

4. Αποτελέσματα

Τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονται θετικά για την έκφραση των πρωτεϊνών Cdt1, Geminin και κυκλίνης A στο παραπάνω πείραμα, φαίνονται στο σχήμα A της εικόνας 4.12. Είναι εμφανής η σταδιακή μείωση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τόσο Cdt1 όσο και Geminin μεταξύ των γενεών P15-P25, κυρίως όμως από τη γενιά P22 και μετά. Παρόμοια μείωση της έκφρασης με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων σημειώνεται και για τη κυκλίνη A, πρωτεΐνη που αποτελεί μάρτυρα της προόδου των κυττάρων στις φάσεις S και G2 του κύκλου. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται ύστερα από ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western (εικόνα 4.12B). Η μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin στο ανοσοαποτύπωμα είναι εμφανής πολύ νωρίτερα, ήδη από τη γενιά P17, προτού η πτώση γίνει ορατή στο πείραμα του ανοσοφθορισμού (από τη γενιά P22 και μετά), γεγονός που υποδεικνύει ότι, ήδη από τη γενιά P17, τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin μειώνονται ανά κύτταρο. Παρόμοια ρύθμιση κατά την αναπαραγωγική γήρανση των WI-38 εμφανίζει και η πρωτεΐνη MCM7 (εικόνα 4.12B), ένα βασικό συστατικό του προαντιγραφικού συμπλόκου (pre-RC).

Εικόνα 4.12: Μείωση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε καλλιέργειες WI-38 ανθρώπινων ινοβλαστών που εισέρχονται σε αναπαραγωγική γήρανση. **A)** Συνολικά ποσοστά (%) έκφρασης

4. Αποτελέσματα

των μορίων Cdt1, Geminin και κυκλίνη A σε καλλιέργειες πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών αυξανόμενων ηλικιών ύστερα από πείραμα ανοσοφθορισμού, και **B)** ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western των κυτταρικών εκχυλισμάτων των καλλιεργειών αυτών για τις πρωτεΐνες Cdt1, Geminin και MCM7. Η τουμπουλίνη λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας για την ισοφόρτωση των δειγμάτων. Με αστερίσκο σημειώνεται η μη ειδική ζώνη που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα, ενώ τα MCF7 και οι ανθρώπινοι ινοβλάστες ούλου χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί-μάρτυρες των υπό ανίχνευση πρωτεϊνών στα καρκινικά και τα πρωτογενή κύτταρα αντίστοιχα.

4. Πιστοποίηση της επαγωγής πρόωρης κυτταρικής γήρανσης (SIPS) σε νεαρούς ινοβλάστες ύστερα από την υποβολή τους σε ήπιο οξειδωτικό στρες

Η κυτταρική γήρανση αντανακλά μία κατάσταση απόκρισης σε στρες σε κυτταρικό επίπεδο και οφείλεται στην επίδραση παραγόντων που προκαλούν **γενετοξικό στρες** στα κύτταρα. Τέτοια αίτια είναι είτε η μείωση, κι επομένως, η δυσλειτουργία των τελομερών, γεγονός που ενοχοποιείται για τη λεγόμενη **αναπαραγωγική γήρανση** των κυττάρων που καλλιεργούνται *in vitro* για μεγάλο χρονικό διάστημα, είτε η επίδραση παραγόντων που προκαλούν βλάβη στο DNA ή σε άλλες υποκυτταρικές δομές, οπότε αναφερόμαστε στην **πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από στρες** (“*Stress-Induced Premature Senescence*” ή “SIPS”) (Muller et al., 2001). Στρεσογόνοι παράγοντες που προκαλούν SIPS είναι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα φάρμακα που επηρεάζουν τη δομή των μικροσωληνίσκων ή της χρωματίνης, η υπερέκφραση ογκογονιδίων καθώς και η επίδραση οξειδωτικών παραγόντων. Ολοένα και περισσότερες εργασίες, σήμερα, συνδέουν την κυτταρική γήρανση με την ύπαρξη βλαβών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες, όπως είναι για παράδειγμα οι διπλές θραύσεις στο DNA (Beckman and Ames, 1998; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Finkel and Holbrook, 2000; Harman, 2001; Herbig et al., 2004; Schriener et al., 2005) (Gorbunova and Seluanov, 2005; Sedelnikova et al., 2004).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στόχος μας ήταν να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα σχετικά με τη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin κατά την κυτταρική γήρανση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο σύστημα *in vitro* κυτταρικής γήρανσης, αυτή τη φορά προκαλούμενη από **οξειδωτικό στρες** (H₂O₂-επαγόμενη γήρανση). Η προσθήκη ήπιων δόσεων H₂O₂ στο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται συχνά για την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα (Chen et al., 2005; Chen et al., 2004; Chen et al., 1998; Duan et al., 2005). Το H₂O₂ προκαλεί εκτός των άλλων, διπλές θραύσεις στο DNA (DSBs). Βλάβες τέτοιου τύπου ανιχνεύονται στους πυρήνες των κυττάρων με αντισώματα έναντι πρωτεϊνών που έχουν την ιδιότητα να συσσωρεύονται στην περιοχή της βλάβης, όπως για παράδειγμα η φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 139 ιστόνη H2AX (γνωστή

4. Αποτελέσματα

ως γ -H2AX)(Chen et al., 2005; Huang et al., 2006; Redon et al., 2002; Rogakou et al., 1998). Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στην εικόνα 4.13Α (Chen et al., 2004), ενώ τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πρωτογενείς ινοβλάστες που απομονώθηκαν από βιοψίες ούλων φυσιολογικών νεαρών ατόμων.

Εικόνα 4.13: Πιστοποίηση εισόδου ασύγχρονης καλλιέργειας νεαρών ανθρώπινων ινοβλαστών σε πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες. **Α)** Παρουσίαση του πρωτοκόλλου που εφαρμόστηκε, **Β)** ανάλυση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων, κατά τη διάρκεια του πειράματος, με τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU, **Γ)** ιστοχημική ανάλυση β-γαλακτοσιδάσης για τον προσδιορισμό της κυτταρικής γήρανσης, και **Δ)** ανοσοαποτύπωμα Western για τον έλεγχο της συσσώρευσης της τροποποιημένης ιστόνης γ -H2AX μετά την υποβολή των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες.

Η προσθήκη του H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο προκάλεσε την παύση της αντιγραφής του DNA, όπως φάνηκε από την άμεση πτώση της ενσωμάτωσης BrdU στα κύτταρα (γράφημα της εικόνας 4.13Β). Η μπλε χρώση β-γαλακτοσιδάσης, ενδεικτική της γήρανσης, αυξήθηκε ιδιαίτερα μετά την προσθήκη της δεύτερης δόσης (5^η ημέρα του πειράματος), αγγίζοντας το μέγιστο ποσοστό (80% του

4. Αποτελέσματα

πληθυσμού) 10 ημέρες μετά. Η προσθήκη του H_2O_2 προκάλεσε τη συσσώρευση της τροποποιημένης ιστόνης γ -H2AX στα κύτταρα, κυρίως στην αρχή του πειράματος (αμέσως μετά τη χορήγηση των δόσεων του H_2O_2), ενώ αργότερα, με την είσοδο των κυττάρων σε γήρανση, τα επίπεδα έκφρασης της γ -H2AX παρουσίασαν σημαντική πτώση.

Στην εικόνα 4.14 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές φωτογραφίες αντίθεσης φάσεως των κυττάρων που αναλύθηκαν ιστοχημικά για ενεργότητα β -γαλακτοσιδάσης καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Η αύξηση του ποσοστού των θετικών για τη χρώση (μπλε) κυττάρων, η αλλαγή της μορφολογίας τους και η μείωση της κυτταρικής πυκνότητας της καλλιέργειας μαρτυρούν την είσοδο των κυττάρων σε πρόωρη κυτταρική γήρανση (SIPS).

Εικόνα 4.14: Φωτογραφίες από τη ιστοχημική ανάλυση β -γαλακτοσιδάσης πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών που εισέρχονται σε πρόωρη κυτταρική γήρανση ύστερα από την επίδραση οξειδωτικού στρες.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι με την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου οξειδωτικού στρες, η πλειοψηφία της καλλιέργειας νεαρών ανθρώπινων ινοβλαστών εισέρχεται σε πρόωρη κυτταρική γήρανση μέσα σε χρονικό διάστημα 15 περίπου ημερών.

4. Αποτελέσματα

5. Μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε κύτταρα που εισέρχονται σε H₂O₂-επαγόμενη γήρανση

Το πρότυπο έκφρασης των Cdt1 και Geminin σε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες που εισέρχονται σε πρόωρη γήρανση λόγω οξειδωτικού στρες αναλύθηκε με ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παρουσιάζονται στην εικόνα 4.15.

Εικόνα 4.15: Πείραμα ανοσοφθορισμού για τη μελέτη των Cdt1, Geminin, κυκλίνης A και γ-H2AX σε νεαρούς πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες που γηράσκουν πρόωρα σε καλλιέργεια ύστερα από την υποβολή τους σε ήπιο οξειδωτικό στρες. Παρατηρείται αρνητική ρύθμιση των παραγόντων Cdt1 και Geminin στα κύτταρα αυτά. **A)** Μείωση του ποσοστού (%) των κυττάρων της καλλιέργειας που συνεχίζει να εκφράζει Cdt1, Geminin και κυκλίνη A κατά την είσοδο των ινοβλαστών σε H₂O₂-επαγόμενη κυτταρική γήρανση, **B)** δραματική αύξηση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ-H2AX (δείκτης πρόκλησης βλαβών στο DNA), ιδιαίτερα μετά την προσθήκη της 1^{ης} δόσης H₂O₂ και **Γ)** διαφορά μεγέθους των πυρήνων ορισμένων πυρήνων της καλλιέργειας των ινοβλαστών πριν (C) και μετά το τέλος του πειράματος (2XH₂O₂ + 10 ημέρες), ύστερα από χρώση DAPI. Η εικόνα δείχνει τη μέγιστη διαφορά μεγέθους πυρήνων που παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο πληθυσμών. Οι αστερίσκοι στο διάγραμμα της κυκλίνης A δηλώνουν την έλλειψη κυτταρικών δειγμάτων προς ανάλυση τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Τα κόκκινα παραλληλόγραμμα μαρτυρούν τον κυτταρικό πληθυσμό που χρησιμοποιήθηκε σε στατιστικές/ποσοτικές αναλύσεις στη συνέχεια.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα ελάχιστα κύτταρα συνεχίζουν να εκφράζουν τόσο τον παράγοντα Cdt1 όσο και την πρωτεΐνη Geminin, από την προσθήκη της 2^{ης} δόσης και μετά και ως και το τέλος του πειράματος, όταν πια η πλειοψηφία των κυττάρων έχουν εισέλθει σε γήρανση. Επιπλέον, είναι εμφανές ότι η κινητική με την οποία η έκφραση των δύο πρωτεϊνών μειώνεται στον πληθυσμό είναι διαφορετική: ο παράγοντας Cdt1 ελαχιστοποιείται αμέσως σχεδόν μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης H₂O₂ στα κύτταρα. Αντιθέτως, η Geminin, στην αρχή παραμένει σταθερή και στη συνέχεια, με την προσθήκη της 2^{ης} δόσης, μειώνεται κι εκείνη με τη σειρά της. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της γ-H2AX στον πληθυσμό με πείραμα ανοσοφθορισμού επαληθεύει την προηγούμενη ανάλυσή μας με ανοσοαποτύπωμα Western: η έκφραση της γ-H2AX ανέρχεται σχεδόν στο 100% του πληθυσμού αμέσως μετά τη χορήγηση του H₂O₂ και στη συνέχεια, καθώς τα κύτταρα εισέρχονται σε γήρανση, σταδιακά μειώνεται (εικόνες 4.15B και 4.13Δ).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων με μεγάλους πυρήνες στην καλλιέργεια που υποβλήθηκε σε οξειδωτικό στρες. Ενδεικτικές είναι οι φωτογραφίες χρώσης DAPI (εικόνα 4.15Γ), οι οποίες δείχνουν το μέγιστο μέγεθος πυρήνων που παρατηρήθηκαν στην καλλιέργεια των πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών που είχαν υποστεί το οξειδωτικό στρες την τελευταία ημέρα του πειράματος.

Οι φωτογραφίες ανοσοφθορισμού των κυττάρων της τελευταίας ημέρας του πειράματος (εικόνα 4.16Α, κόκκινο παραλληλόγραμμο) χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική ανάλυση του σήματος φθορισμού των Cdt1 και Geminin στα γηρασμένα σε σύγκριση με τα νεαρά κύτταρα-μάρτυρες (με τη χρήση του προγράμματος Image J). Οι φωτογραφίες της εικόνας 4.16Α τραβήχτηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες ώστε να είναι δυνατή η άμεση σύγκρισή τους. Με το πρόγραμμα μετρήθηκε η ένταση του σήματος φθορισμού των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε μία μικρή επιφάνεια (συγκεκριμένου σχήματος κι εμβαδόν) του πυρήνα όλων των κυττάρων του πεδίου κι εκφράστηκε σε «τυχαίες μονάδες». Τέλος, επεικονίστηκαν οι εντάσεις φθορισμού σε άξονες έτσι ώστε να φαίνεται η διασπορά των τιμών, καταλήγοντας στη μορφή των διαγραμμάτων της εικόνας 4.16Β.

Με την ποσοτικοποίηση των σημάτων ανοσοφθορισμού επαληθεύεται ότι η πρωτεϊνική έκφραση των δύο παραγόντων Cdt1 και Geminin εμφανίζεται κατά πολύ μειωμένη στα γηρασμένα κύτταρα. Συγκρίνοντας τους μέσους όρους των εντάσεων φθορισμού, παρατηρούμε ~2 φορές μείωση για το Cdt1 και ~4 φορές για την Geminin στα κύτταρα που γερνούν. Επιπλέον, είναι εμφανές ότι η τιμές έντασης τόσο για το Cdt1 όσο και για την Geminin στην πλειοψηφία των γηρασμένων κυττάρων βρίσκονται σε επίπεδα αρνητικών τιμών έντασης του πληθυσμού, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα νεαρά κύτταρα μάρτυρες.

Εικόνα 4.16: Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin σε νεαρά (C) και γηρασμένα κύτταρα (2xH₂O₂+10ημέρες), με πείραμα ανοσοφθορισμού. **A)** Παρουσίαση αντιπροσωπευτικών φωτογραφιών από την τελευταία ημέρα του πειράματος ανοσοφθορισμού της εικόνας 4.15. Οι φωτογραφίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική και στατιστική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των Cdt1 (αριστερά) και Geminin (δεξιά) σε γηρασμένα κύτταρα, **B)** διασπορά των «τυχαίων μονάδων» φθορισμού για την πρωτεΐνη Cdt1 (αριστερά) και την Geminin (δεξιά) στα γηρασμένα σε σύγκριση με νεαρά κύτταρα. Οι οριζόντιες μαύρες γραμμές δείχνουν τον μέσο όρο των τιμών αυτών.

Τα επίπεδα έκφρασης των Cdt1 και Geminin, κατά την πορεία γήρανσης ανθρώπινων ινοβλαστών ύστερα από οξειδωτικό στρες, εξετάστηκε και με ανοσοαποτύπωμα Western (εικόνα 4.17).

Εικόνα 4.17: Ανάλυση με Western των ενδοκυτταρικών εκχυλισμάτων ανθρώπινων ινοβλαστών που εισέρχονται σε πρόωρη γήρανση ύστερα από την επίδραση H_2O_2 . Τα επίπεδα των παραγόντων Cdt1 και Geminin μειώνονται, με διαφορετική ωστόσο κινητική. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και γήρανσης. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν μη ειδικές ζώνες που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.

Όπως φαίνεται, η πρωτεΐνη Cdt1 μειώνεται μέσα στα πρώτα 30 λεπτά από την προσθήκη του H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο, μία ρύθμιση που, ενδεχομένως, σχετίζεται με άμεση απόκριση των κυττάρων στις βλάβες (διπλές θραύσεις στο DNA) που έχουν υποστεί (βλ. κεφάλαιο B.6 αποτελεσμάτων). Αντίθετα, η Geminin, δείχνει να παραμένει σταθερή τις πρώτες ώρες και να μειώνεται αργότερα, με την προσθήκη της 2^{ης} δόσης (5^η ημέρα του πειράματος).

Συμπερασματικά, επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι οι παράγοντες Cdt1 και Geminin ρυθμίζονται αρνητικά κατά την πορεία πρόωρης γήρανσης ανθρώπινων ινοβλαστών που προκαλείται από οξειδωτικό στρες, ενώ διαφέρει η κινητική με την οποία πραγματοποιείται η μείωση αυτή.

6. Χρονική συσχέτιση της πτώσης των επιπέδων της Geminin με την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου στα κύτταρα

Με σκοπό να προσδιορίσουμε ακριβέστερα το χρονικό σημείο μείωσης της έκφρασης της Geminin σε σχέση με την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου, εστίασαμε χρονικά τη μελέτη μας αμέσως μετά την προσθήκη της 1^{ης} δόσης H₂O₂ στο θεραπευτικό μέσο. Νεαροί ινοβλάστες υποβλήθηκαν σε μονή δόση H₂O₂ και δείγματα κυττάρων σε διάφορες χρονικές στιγμές αναλύθηκαν για την αντιγραφική δραστηριότητα (ενσωμάτωση BrdU) και τη χρώση β-γαλακτοσιδάσης που επιδείκνυαν (εικόνα 4.18).

Εικόνα 4.18: Εστίαση της μελέτης αμέσως μετά τη χορήγηση της 1^{ης} δόσης στα κύτταρα, με στόχο τον ακριβέστερο χρονικό προσδιορισμό της πτώσης της έκφρασης της Geminin σε σχέση με την εμφάνιση της γήρανσης. Χορηγήθηκε η δίωρη δόση H₂O₂ και τα κύτταρα αναλύθηκαν σε αρκετά χρονικά σημεία μετά για: **A)** την ικανότητα πολλαπλασιασμού του DNA τους (με τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU), και **B)** για την ενεργότητα του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης.

4. Αποτελέσματα

Όπως φαίνεται, τα κύτταρα σταματούν την αντιγραφή του DNA τους αμέσως μετά την προσθήκη της δόσης H_2O_2 , ενώ εμφανίζουν σημάδια γήρανσης μεταξύ των ημερών 5-8, όταν και παρατηρείται η αύξηση της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης.

Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων αυτών αναλύθηκαν, ως προς την έκφραση των Cdt1 και Geminin, με ανοσοαποτύπωμα Western (εικόνα 4.19). Η ανάλυση αυτή επαληθεύει τη γρήγορη ρύθμιση των επιπέδων του Cdt1 μετά την προσθήκη του H_2O_2 στα κύτταρα. Σε αντίθεση με το Cdt1, η Geminin παραμένει σταθερή για τουλάχιστον 12 ώρες, εμφανίζοντας αισθητή μείωση με την πάροδο 24h. Το διαφορετικό αυτό χρονικό πρότυπο έκφρασης, σε σχέση με το Cdt1 παραπέμπει, ενδεχομένως, σε διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών ύστερα από επίδραση οξειδωτικού στρες. Η έκφραση της γ -H2AX αυξάνεται αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O_2 και αργότερα μειώνεται, ταυτόχρονα με την αύξηση ενός αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και βιομάρτυρα της κυτταρικής γήρανσης, της πρωτεΐνης $p21^{Cip1/Waf1}$. Τέλος, η έκφραση της κυκλίνης A και της MCM7 παραμένει αρχικά σταθερή, παρουσιάζοντας πτώση μεταξύ των ημερών 1-3, ταυτόχρονα με τη μείωση της φωσφορυλίωσης του Rb (δείκτης εισόδου των κυττάρων σε γήρανση).

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.19: Ανάλυση με Western πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ανθρώπινων ινοβλαστών που υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες, με εστίαση στις πρώτες στιγμές μετά τη χορήγηση της δόσης του H_2O_2 . Το Cdt1 εξαφανίζεται μετά την 1^η δόση H_2O_2 . Αντίθετα, η Geminin παραμένει αρχικά σταθερή, ενώ μειώνεται εντός 24 ωρών. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αύξηση του αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου p21, ενώ λίγο αργότερα μειώνεται και η έκφραση των πρωτεϊνών κυκλίνη A και MCM7 συγχρόνως με την άνοδο της ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης (εικόνα 4.18B).

Συνολικά, επιβεβαιώνεται ότι με την υποβολή των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin υφίστανται αρνητική ρύθμιση, με διαφορετική, ωστόσο, κινητική.

7. Η πτώση των επιπέδων έκφρασης του Cdt1 μετά την επίδραση του οξειδωτικού στρες είναι μια ταχεία διαδικασία και εξαρτάται από τη δράση του πρωτεασώματος

Παρατηρήθηκε προηγουμένως ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Cdt1 μειώνονται άμεσα μετά την υποβολή των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες. Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω τα χαρακτηριστικά της ρύθμισης αυτής, υποβάλαμε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες σε δίωρη δόση H_2O_2 και δείγματα αυτών αναλύθηκαν, τόσο κατά τη διάρκεια της δόσης όσο και μετά την αφαίρεση αυτής, ως προς τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα Cdt1 και της αντιγραφικής ικανότητας των κυττάρων (εικόνα 4.20).

Στην προσπάθεια περαιτέρω χαρακτηρισμού της παρατηρούμενη άμεσης πτώσης του Cdt1 μετά την επίδραση του H_2O_2 διαπιστώνουμε ότι η στόχευσή του είναι δοσο-εξαρτώμενη κι εξαιρετικά ταχεία, λαμβάνοντας χώρα εντός μόλις 10-15 λεπτών από τη στιγμή της προσθήκης του H_2O_2 στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων (εικόνα 4.20).

Εικόνα 4.20: Περαιτέρω χαρακτηρισμός της πτώσης των επιπέδων του παράγοντα Cdt1 σε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες που υφίστανται οξειδωτικό στρες. **A)** Επίδραση με διάφορες αυξανόμενες δόσεις H₂O₂ σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα, κι ακολούθως, ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του Cdt1 στα κύτταρα αυτά με ανοσοαποτύπωμα Western (πάνω), και της ικανότητας αντιγραφής του DNA τους (κάτω), και **B)** μελέτη της κινητικής της πτώσης του παράγοντα Cdt1 μετά την προσθήκη H₂O₂.

Αυξανόμενες δόσεις H₂O₂ οδηγούν σε αντίστοιχη αύξηση του δείκτη διπλών κατατμήσεων γ-H2AX στους πυρήνες των κυττάρων και παράλληλη πτώση της έκφρασης του Cdt1 και του ποσοστού κυττάρων που αντιγράφουν το DNA τους (εικόνα 4.20A). Σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα, τα επίπεδα των πρωτεϊνών κυκλίνη A και MCM7 αλλά και της Geminin (δεν παρουσιάζεται) παρέμειναν αμετάβλητα.

Επιλέγοντας μία μέση δόση H₂O₂ (300μM) πραγματοποιήσαμε πείραμα κινητικής με στόχο τον προσδιορισμό της ταχύτητας στόχευσης του Cdt1 κατά το οξειδωτικό στρες των κυττάρων (εικόνα 4.20B). Διαπιστώνουμε ότι η στόχευση του Cdt1 υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι ταχεία και ολοκληρώνεται εντός 10 -15 λεπτών από την προσθήκη του H₂O₂ στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το Cdt1 αποτελεί στόχο πρωτεολυτικών μηχανισμών, που δρουν μέσω του πρωτεασώματος, μετά από επίδραση παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA (όπως ακτινοβολία UV ή γάμμα, χημειοθεραπευτικά φάρμακα κλπ) (Higa et al., 2003). Χρησιμοποιώντας τον ειδικό αναστολέα του πρωτεασώματος MG132, θελήσαμε να ελέγξουμε την πιθανή συμμετοχή του στην παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων του Cdt1 μετά από επίδραση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα (εικόνα 4.21).

4. Αποτελέσματα

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα της εικόνας 4.21, παρουσία του MG132 η επίδραση του H_2O_2 δε μπορεί να προκαλέσει την πτώση του Cdt1, αν και προκαλούνται βλάβες στο DNA (χρώση γ -H2AX, εικόνα 4.21A).

Διαπιστώνουμε ότι η μείωση των επιπέδων του παράγοντα Cdt1 υπό την επίδραση του H_2O_2 οφείλεται σε πρωτεόλυση που διαμεσολαβείται από το πρωτεάσωμα.

Εικόνα 4.21: Η μείωση των επιπέδων του Cdt1 αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O_2 διαμεσολαβείται από το πρωτεάσωμα. Ο ειδικός αναστολέας του πρωτεασώματος MG132 χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το H_2O_2 και η έκφραση του Cdt1 αναλύθηκε με πείραμα ανοσοφθορισμού. **A)** Χαρακτηριστικές φωτογραφίες ανοσοφθορισμού του πειράματος όπου με πράσινο χρώμα φαίνεται ο παράγοντας Cdt1 και με κόκκινο η πρωτεΐνη γ -H2AX, **B)** ποσοτικοποίηση της έκφρασης του Cdt1 (μαύρες μπάρες) από το παραπάνω πείραμα και της Geminin (ως αριθμητικά ποσοστά από κάτω), και **Γ)** το ίδιο πείραμα με ανάλυση Western.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ'

Διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας της πτώσης των επιπέδων της Geminin κατά την κυτταρική γήρανση των ανθρώπινων ινοβλαστών

1. Εισαγωγή

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, αναδεικνύουν την αρνητική ρύθμιση του παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, Cdt1, καθώς και του αναστολέα αυτού Geminin, τόσο κατά την αναπαραγωγική όσο και κατά την επαγόμενη γήρανση που προκαλείται από οξειδωτικό στρες. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρήθηκε ότι η πτώση των επιπέδων των Cdt1 και Geminin λαμβάνει χώρα σχετικά νωρίς σε σχέση με την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου στα κύτταρα. Στην οξειδωτικά επαγόμενη γήρανση, τα επίπεδα της Geminin μειώνονται νωρίς σε σχέση με την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου, χωρίς να χωρίς να παρατηρείται ταχεία στόχευσή της αμέσως μετά την επίδραση του στρεσογόνου σήματος. Μειωμένα ενδοκυττάρια επίπεδα της Geminin έχουν, γενικά, συνδεθεί με διαταραχές της ρύθμισης της αντιγραφής του DNA και πολυπλοειδικά φαινόμενα (Higa et al., 2003; Melixetian et al., 2004; Zhu et al., 2004). Έχει, επίσης, περιγραφεί ότι γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν παρόμοιους φαινότυπους (Wagner et al., 2001).

Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στη γήρανση σημαντικό ρόλο έχει προταθεί ότι κατέχουν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου και ρυθμιστές της μετάβασης από την G1 στην S (όπως οι p16^{Ink4a}, p21^{Cip1/Waf1}, p53 και pRb), μας ώθησαν να εξετάσουμε περαιτέρω κατά πόσο η παρατηρούμενη πτώση των επιπέδων της Geminin κατά τη γήρανση έχει λειτουργική σημασία. Πιο συγκεκριμένα, στόχος μας ήταν να διερευνηθεί κατά πόσον η μείωση των επιπέδων της Geminin στα κύτταρα δύναται να ενεργοποιήσει τα μοριακά μονοπάτια της γήρανσης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα γενετικής αποσιώπησης του γονιδίου της Geminin στα κύτταρα χρησιμοποιώντας την τεχνολογία RNAi. Η τεχνολογία της «παρεμβολής RNA» (RNA interference ή RNAi) αξιοποιείται σήμερα σε μελέτες απώλειας της λειτουργίας των γονιδίων, αποτελώντας σημαντικό εργαλείο διερεύνησης της λειτουργίας αυτών (Dykxhoorn et al., 2003; Fire et al., 1998; Timmons and Fire, 1998).

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, εξετάστηκαν δύο τρόποι αποσιώπησης του γονιδίου της Geminin που βασίζονται στο «μηχανισμό RNAi»:

1) χρήση 19μερών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για το mRNA της Geminin, γνωστών και ως μικρά παρεμβαλλόμενα δίκλωνα ολιγονουκλεοτίδια ή siRNAs

4. Αποτελέσματα

2) χρήση ενός πλασμιδιακού φορέα (του pSUPER: SUPpression of Endogenous RNA) ειδικού για το γονίδιο της Geminin, που επάγει την *in vivo* σύνθεση μορίων RNA (shRNAs) που μοιάζουν μορφολογικά στα siRNAs και δρουν εναντίον του mRNA της Geminin κατα τον ίδιο τρόπο.

Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο δημιουργίας και τον μηχανισμό δράσης των siRNAs και των shRNAs παρατίθενται στο κεφάλαιο Β της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι» της διατριβής.

Εικόνα 4.22: Α) το cDNA της ανθρώπινης Geminin (NM_015895). Με κόκκινο χρώμα τονίζονται οι 7 διαφορετικές 19-μερείς περιοχές-στόχευσης του mRNA της hGeminin, και Β) δοκιμάστηκαν δύο τρόποι γενετικής αποσίωπησης (RNAi) του γονιδίου της hGeminin: α) με δύο διαφορετικά siRNA ολιγονουκλεοτίδια (Nishitani et al., 2004), τα οποία συμβολίστηκαν ως PG-1 και PG-2, και β) με 7 διαφορετικά οχήματα pSUPER, τα οποία συμβολίστηκαν ως #1- #5, PG1 και PG2.

2. Δοκιμή της αποτελεσματικότητας των siRNAs για την αποσιώπηση του γονιδίου της Geminin σε ανθρώπινα κύτταρα

Αρχικά δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης του γονιδίου της Geminin μέσω χρήσης μικρών δίκλωνων siRNA αλληλουχιών. Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικά siRNAs (Invitrogen) ειδικά για το γονίδιο της Geminin, τα PG1 και PG2, τόσο σε καρκινικά (HeLa, MCF7 και U2OS) όσο και πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα (ινοβλάστες). Ως siRNA-μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε το δίκλωνο siRNA ολιγονουκλεοτίδιο έναντι ενός ανύπαρκτου (στα ανθρώπινα κύτταρα) γονιδίου, αυτό της λουσιφεράσης (siLuc). Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν παρόμοια: κύτταρα διαμολύνθηκαν με τη χρήση κατιονικών λιποσωμάτων με τα siRNAs, και 48-62 ώρες μετά αναλύθηκε σε αυτά η πρωτεϊνική έκφραση της Geminin μέσω πειράματος ανοσοφθορισμού ή/και ανοσοαποτυπώματος Western.

Στις επόμενες εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα από τα πειράματα RNAi που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του siRNA PG-1: α) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF7 και U2OS, β) στα καρκινικά κύτταρα HeLa, και γ) σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα. Το siRNA PG-2 δοκιμάστηκε σε παρόμοια πειράματα αποσιώπησης χωρίς να επιφέρει αποτελεσματικότερη αποσιώπηση (βλ. εικόνα 4.30).

Αποτελέσματα δοκιμών του siRNA PG1:

α) στις καρκινικές σειρές MCF7 και U2OS

Οι εικόνες στα αριστερά και τα διαγράμματα στα δεξιά της εικόνας 4.23 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του πειράματος ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκε για την πιστοποίηση της αποσιώπησης της Geminin στα κύτταρα MCF7 (πάνω) και U2OS (κάτω) 62 και 60 ώρες, αντίστοιχα, μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με το siRNA ολιγονουκλεοτίδιο PG-1. Επιπλέον, στα U2OS ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας του RNAi έγινε και με ανοσοαποτύπωμα Western (εικόνα 4.23).

Από τα αποτελέσματα της εικόνας 4.23 διαπιστώνουμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Geminin στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το siRNA PG-1 περιορίστηκε στο ελάχιστο (έκφραση σε ποσοστό <5% των κυττάρων της καλλιέργειας κι εξαφάνιση της ζώνης που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Geminin στο ανοσοαποτύπωμα Western). Επιπλέον, σημειώθηκε αύξηση του ποσοστού των θετικών για τη χρώση γ-H2AX (δείκτης διπλών κατατμήσεων του DNA) κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει την πρόκληση βλαβών στο DNA των κυττάρων μετά την επίδραση του siRNA της Geminin.

Εικόνα 4.23: Πείραμα γενετικής αποσιώπησης της Geminin με τη χρήση του siRNA PG-1 σε καρκινικά κύτταρα MCF7 (πάνω) και U2OS (κάτω) και πραγματοποίηση πειραμάτων ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτυπώματος Western για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου.

β) στην καρκινική σειρά HeLa

Παρόμοιο πείραμα δοκιμής του siRNA PG-1 για την αποσιώπηση της Geminin πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα HeLa (εικόνα 4.24).

Βάσει των κάτωθι παραπάνω αποτελεσμάτων ανοσοφθορισμού, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν Geminin 48ώρες μετά την διαμόλυνση με το siRNA PG1 μειώθηκε στο μισό μετά την επίδραση του siRNA, ενώ ανιχνεύσιμα επίπεδα Geminin παραμένουν στο ~20% των κυττάρων του πληθυσμού (εικόνα 4.24A). Ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού της χρώσης Geminin ανά πυρήνα, δείχνει ότι συσσωρεύεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το siRNA PG-1 σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (εικόνα 4.24B). Η μείωση των επιπέδων της Geminin στα διαμολυσμένα με το siRNA για την Geminin κύτταρα συνοδεύεται με έντονη

4. Αποτελέσματα

πυρηνική συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ -H2AX, όπως προηγούμενως στα κύτταρα MCF7 και U2OS, ενώ ακόμα διαπιστώθηκε και αύξηση της έντασης της DAPI στα κύτταρα αυτά (εικόνα 4.24B).

Εικόνα 4.24: Πείραμα γενετικής αποσιώπησης της Geminin με τη χρήση του siRNA PG1 σε καρκινικά κύτταρα HeLa. **A)** Ποσοστά κυττάρων που εκφράζουν Geminin 48h μετά το RNAi και χαρακτηριστικές φωτογραφίες από το πείραμα ανοσοφθορισμού, και **B)** ποσοτικοποιήσεις των σημάτων ανοσοφθορισμού της Geminin, γ -H2AX και DAPI, με τη χρήση του προγράμματος Image J, 48h μετά το RNAi για την Geminin.

γ) σε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες

Τέλος, πείραμα δοκιμής του siRNA PG-1 για την αποσιώπηση της Geminin πραγματοποιήθηκε και σε καλλιέργειες πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών, τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στην εικόνα 4.25.

Εικόνα 4.25: Πείραμα γενετικής αποσιώπησης της Geminin με τη χρήση του siRNA PG1 σε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες ούλου. **A)** Ποσοστά κυττάρων που εκφράζουν Geminin 62h μετά το RNAi και χαρακτηριστικές φωτογραφίες από το συγκεκριμένο πείραμα ανοσοφθορισμού, και **B)** ποσοτικοποιήσεις των σημάτων ανοσοφθορισμού για Geminin, γ-H2AX και DAPI, με τη χρήση του προγράμματος Image J, 62h μετά το RNAi για την Geminin.

Όπως φαίνεται, το ποσοστό πρωτογενών ινοβλαστών που συνεχίζει να εκφράζει Geminin 62h μετά την επίδραση του siRNA PG-1 είναι πολύ μικρό (<5%). Το ίδιο φαίνεται και στο γράφημα ποσοτικοποίησης του σήματος ανοσοφθορισμού της Geminin (εικόνα 4.25B). Η μείωση των επιπέδων έκφρασης της Geminin στα συγκεκριμένα κύτταρα δεν επέφερε αύξηση της έντασης της γ-H2AX ή της DAPI.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω καταλήγουμε στα εξής:

Το καλύτερο εκ των δύο διαθέσιμων siRNA ολιγονουκλεοτιδίων (PG1) δοκιμάστηκε:

-καρκινικά κύτταρα MCF7 και U2OS καθώς και στους πρωτογενείς ινοβλάστες ούλου, όπου επέφερε αξιόλογη μείωση της έκφρασης της Geminin σε πρωτεϊνικό επίπεδο (με ποσοστά κυττάρων <5% να εκφράζουν Geminin 48-62 ώρες μετά το RNAi),

-σε καρκινικά HeLa κύτταρα, όπου παρότι δεν προκάλεσε αποτελεσματική μείωση του % ποσοστού των κυττάρων που εξέφραζαν Geminin, επέφερε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Geminin ανά κύτταρο.

3. Δοκιμή της αποτελεσματικότητας των pSUPER πλασμιδιακών οχημάτων για την αποσιώπηση του γονιδίου της Geminin σε ανθρώπινα κύτταρα

Η δεύτερη μέθοδος αποσιώπησης γονιδίων που δοκιμάστηκε ήταν η διαμόλυνση των κυττάρων με ειδικά -για την Geminin- pSUPER πλασμιδιακά οχήματα. Τα οχήματα αυτά εισέρχονται με διαμόλυνση στα κύτταρα κι επάγουν την *in vivo* σύνθεση μεγάλων (64μερών) πρώιμων μονόκλωνων RNA-μεταγράφων σε δομή φουρκέτας (γνωστά ως shRNA). Τα RNA αυτά μετατρέπονται, τελικά, σε 19-μερή δίκλωνα ολιγονουκλεοτίδια, ικανά να ενεργοποιήσουν το siRNA-μονοπάτι, όπως ακριβώς και τα siRNA που εξετάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα (Brummelkamp et al., 2002a; Brummelkamp et al., 2002b). Σε συνεργασία με τον Δρ Agami Reuven, στο εργαστήριο «Βιολογίας του Καρκίνου» του Ινστιτούτου Καρκίνου της Ολλανδίας (Netherlands Cancer Institute ή NKI) κατασκευάστηκαν, συνολικά, επτά (7) διαφορετικά οχήματα που στοχεύουν σε διαφορετικά σημεία το mRNA της Geminin (βλ. εικόνα 4.22). Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο κατασκευής τους και τον μηχανισμό δράσης τους παρατίθενται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» της διατριβής.

Κύτταρα HeLa και U2OS διαμολύνθηκαν παροδικά (μέσω ηλεκτροδιάτρησης) με τα οχήματα pSUPER για Geminin. Τρία 24-ωρα αργότερα, τα κύτταρα ελέγχθηκαν για έκφραση της Geminin με ανοσοαποτύπωμα Western (εικόνα 4.26A) και με ποσοτική Real-Time PCR (εικόνα 4.26B). Ως μάρτυρας του ποσοστού διαμόλυνσης των καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα διαμολυσμένα με όχημα που φέρει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP ή με άδειο pSUPER-όχημα. Παράλληλο πείραμα RNAi της Geminin με τη χρήση του siRNA PG-1 συμπεριλήφθηκε στο πείραμα ελέγχου με ποσοτική Real Time PCR, ως μάρτυρας μειωμένων επιπέδων mRNA της Geminin (εικόνα 4.26B).

Όπως είναι εμφανές στα αποτελέσματα της εικόνας 4.26, η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με το PG1-pSUPER όχημα επέφερε ικανοποιητική μείωση της έκφρασης της Geminin στα U2OS και μικρότερη μείωση στα HeLa κύτταρα. Σε πείραμα ποσοτικής Real Time-PCR για την ανάλυση των επιπέδων mRNA της Geminin (εικόνα 4.26B), επιβεβαιώθηκε, σε συμφωνία με τα siRNA πειράματα, πως το καλύτερο εκ των pSUPER οχημάτων που κατασκευάστηκαν και δοκιμάστηκαν είναι το PG1. Σε αντίθεση, όμως, με το αντίστοιχο PG1 siRNA ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο στο ίδιο πείραμα επέφερε πολύ μεγαλύτερη αποσιώπηση της Geminin (5x φορές μείωση των επιπέδων του mRNA της),

4. Αποτελέσματα

το PG1-pSUPER όχημα προκάλεσε πτώση του mRNA της Geminin κατά μόλις x2,15 φορές (εικόνα 4.26B).

Εικόνα 4.26: Πείραμα RNAi για την Geminin με τη χρήση του πλασμιδιακού συστήματος αποσίωπησης της έκφρασης γονιδίων pSUPER. Δοκιμάστηκαν τα έξι από τα επτά Geminin-pSUPER-οχήματα, καθώς και συνδυασμοί αυτών, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε καρκινικά κύτταρα HeLa και U2OS. 72ώρες αργότερα τα κύτταρα εξετάστηκαν για έκφραση της Geminin σε πρωτεϊνικό ή σε επίπεδο mRNA, με **A**) ανάλυση Western, και **B**) ποσοτική Real Time-PCR αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη CDK4 στο **A** λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφορτώματος των πηγαδιών. Στο **B**, επισημαίνονται με κόκκινο βέλος τα Geminin-pSUPER οχήματα που έδειξαν τη καλύτερη αποτελεσματικότητα συγκρινόμενα με το PG1 siRNA. Τα επίπεδα mRNA των κυττάρων έχουν υπολογιστεί σε σχέση με αυτά των κυττάρων-μαρτύρων (empty-pSUPER), τα οποία θεωρήθηκαν ως μονάδα.

Συνολικά, συμπεραίνουμε ότι εκ των δύο μεθόδων γενετικής αποσίωπησης που δοκιμάστηκαν για την Geminin, η χρήση των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (siRNAs) κρίνεται, υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες ως πιο αποτελεσματική, καθώς έδειξε ότι οδηγεί σε καλύτερη στόχευση και, συνεπώς, εξάλειψη των επιπέδων της Geminin τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο, κυριότερα, στους πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες.

4. Παροδική αποσιώπηση της Geminin σε ασύγχρονες καλλιέργειες νεαρών ινοβλαστών επάγει πρόωρη κυτταρική γήρανση

Δεδομένης της δυνατότητας αποτελεσματικής αποσιώπησης της Geminin σε ανθρώπινα κύτταρα με τη χρήση των siRNAs, θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η πτώση των επιπέδων της Geminin σε νερά κύτταρα είναι από μόνη της ικανή να ενεργοποιήσει τα κυτταρικά μονοπάτια της γήρανσης. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμών, αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση των PG1 συνθετικών δίκλωνων siRNA ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία όπως δείξαμε μπορούν να επιτύχουν εξάλειψη της Geminin σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό. Το κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι νεαροί πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες ούλου. Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε και παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 4.27A, περιελάμβανε διπλή διαμόλυνση, εντός 24-ώρου, των ινοβλαστών με το siRNA PG1, κι ακολούθως, έλεγχο της καλλιέργειας (για περίπου 3 εβδομάδες) τόσο για έκφραση της Geminin όσο και για εμφάνιση χαρακτηριστικών γήρανσης, όπως θετική χρώση β-γαλακτοσιδάσης και αδυναμία περαιτέρω πολλαπλασιασμού.

Όπως φαίνεται στους ανοσοφθορισμούς της εικόνας 4.27B, 62 ώρες μετά το RNAi η Geminin εκφράζεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων (~3% των κυττάρων της καλλιέργειας), ενώ παραμένει στα χαμηλά αυτά επίπεδα για περισσότερο από μία εβδομάδα. Σύμφωνα με πρόσθετα αποτελέσματα (δεν παρουσιάζονται εδώ), η έκφραση της Geminin αρχίζει να ανακάμπτει από την 9^η ημέρα μετά το RNAi, ενώ, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 4.27Γ, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης την 16^η ημέρα. Παράλληλα με την απώλεια της Geminin, τα κύτταρα φαίνεται να χάνουν σταδιακά και την έκφραση των Cdt1 και κυκλίνη A, ήδη από τις 62 ώρες και τουλάχιστον για τις επόμενες 6 ημέρες. Στο διάστημα αυτό, τα siGeminin-κύτταρα όχι μόνο δεν πολλαπλασιάζονται, αλλά επιπλέον δείχνουν να μειώνονται σε αριθμό, σε αντίθεση με τα siLuc-κύτταρα που πολλαπλασιάστηκαν κανονικά, επιτελώντας σχεδόν τρεις διπλασιασμούς (εικόνα 4.27Γ).

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.27: Πείραμα γενετικής αποσιώπησης της Geminin σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες με τη χρήση δίκλωνων μορίων siRNA, με σκοπό τη μελέτη της πορείας εισόδου τους σε κυτταρική γήρανση. **A)** Σχηματική απεικόνιση του πειράματος, **B)** πείραμα ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο της έκφρασης της Geminin, του Cdt1 και της κυκλίνης A διάφορα χρονικά σημεία μετά το RNAi, και **Γ)** πολλαπλασιασμός των κυττάρων τις πρώτες 6 ημέρες μετά το RNAi.

Εξετάζοντας, στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά για ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης στο pH=6 (δείκτης κυτταρικής γήρανσης), διαπιστώσαμε ότι οι ινοβλάστες που είχαν υποστεί αποσιώπηση της Geminin εμφάνισαν γρηγορότερα και σε μεγαλύτερο βαθμό θετική χρώση β-γαλακτοσιδάσης, όπως φαίνεται και στις φωτογραφίες της εικόνας 4.28. Το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα φαίνεται και στο διάγραμμα ποσοτικοποίησης της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης που ακολουθεί (εικόνα 4.29).

Εικόνα 4.28: Η παροδική αποσιώπηση της Geminin σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες οδηγεί ένα ποσοστό αυτών σε γήρανση μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων. Χαρακτηριστικές φωτογραφίες αντίθεσης φάσεως από τη χρώση β-γαλακτοσιδάσης που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα κυττάρων καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Κάτω-δεξιά, η εικόνα των κυττάρων-μαρτύρων (siLuc) την τελευταία ημέρα του πειράματος.

Τέλος, τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το siRNA για την Geminin, εκτός από υψηλότερα ποσοστά χρώσης, διαφέρουν και σε μορφολογία από τα κύτταρα-μάρτυρες, όντας μεγαλύτερα, πιο πεπλατυσμένα και πιο αραιά.

Ανάλυση β-Γαλακτοσιδάσης (pH=6)

Εικόνα 4.29: Ποσοτικοποίηση (%) της ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης στον πληθυσμό των πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών μετά την παροδική αποσιώπηση της έκφρασης της Geminin. Τα κύτταρα που υπέστησαν παροδική αποσιώπηση της έκφρασης της Geminin (siGem) συγκρίθηκαν ως προς το ποσοστό γήρανσης που εμφάνισαν σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (siLuc ή χωρίς siRNA κύτταρα), σε διάφορα χρονικά σημεία μετά το RNAi για την Geminin.

5. Η αποσιώπηση του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 δείχνει ακόμα μεγαλύτερη ικανότητα επαγωγής πρόωρης γήρανσης σε ασύγχρονες καλλιέργειες νεαρών ινοβλαστών

Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν ότι η διατάραξη του ενδοκυτταρικού ισοζυγίου Cdt1:Geminin μπορεί να αποτελέσει αιτία για γονιδιωματική αστάθεια (Saxena and Dutta, 2005). Έχει, επίσης, προταθεί ότι η απώλεια της Geminin ισοδυναμεί με υπερέκφραση του παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής Cdt1, καθώς κύτταρα που στερούνται της έκφρασής της αποκτούν βλάβες στο DNA παρόμοιες με εκείνες που προκύπτουν ύστερα από υπερέκφραση του Cdt1. Με στόχο να διερευνηθεί κατά πόσο η γήρανση που επάγεται στα κύτταρα απουσία της Geminin θα μπορούσε να εξαρτάται από τον παράγοντα Cdt1, πραγματοποιήσαμε πείραμα ταυτόχρονης αποσιώπησης των παραγόντων Geminin και Cdt1 στα ίδια κύτταρα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών με το PG2-siRNA για την Geminin (ώστε ταυτόχρονα να γίνει επαλήθευση του φαινοτύπου γήρανσης που παρατηρήθηκε προηγουμένως με τη χρήση ενός δεύτερου siRNA) και μαζί με αυτό προστέθηκε και ένα siRNA ολιγονουκλεοτίδιο έναντι του παράγοντα Cdt1 (συνδιαμόλυνση). Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζεται σχηματικά στη εικόνα 4.30.

4. Αποτελέσματα

Νεαροί ανθρωπίνι ινοβλάστες διαμολύνθηκαν με siRNA έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης (siLuc), της Geminin (siGem)(PG2), του Cdt1 (siCdt1) και των δύο μαζί (siGem/siCdt1), και σε διάφορα χρονικά σημεία μετά τα κύτταρα εξετάστηκαν για την εμφάνιση χαρακτηριστικών γήρανσης (παρακολουθώντας την ταχύτητα ανάπτυξής τους και την εμφάνιση της ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης).

Εικόνα 4.30: Έλεγχος της αποτελεσματικότητας του siRNA σε πείραμα γενετικής αποσιώπησης της Geminin με τη χρήση ενός δευτέρου siRNA ολιγονουκλεοτιδίου (PG2) και ταυτόχρονη αποσιώπηση του Cdt1 για τη διερεύνηση της πιθανότητας εξάρτησης του φαινομένου από τη δράση του. **A)** Σχηματική απεικόνιση του πειράματος, **B)** πιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του RNAi με ανοσοφθορισμό (αριστερά αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες, δεξιά τα διαγράμματα), και **Γ)** πολλαπλασιασμός των κυττάρων τις πρώτες ημέρες του πειράματος.

Όπως φαίνεται στις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων στην εικόνα 4.30Γ, τα κύτταρα-μάρτυρες (siLuc) αναπτύσσονται ελάχιστα τις πρώτες 8 ημέρες μετά το RNAi πιθανώς λόγω στρες από την ίδια τη διαδικασία διαμόλυνσης. Τα siGem-κύτταρα τις μέρες αυτές όχι μόνο δεν πολλαπλασιάστηκαν,

4. Αποτελέσματα

αλλά αντίθετα μειώθηκαν κατά πολύ σε αριθμό (περίπου στο μισό), ενώ παρόμοια αρνητική ανάπτυξη αλλά με μικρότερες αριθμητικές απώλειες βλέπουμε να παρουσιάζουν τα siCdt1 κύτταρα. Στα κύτταρα στα οποία η απώλεια της Geminin συνδυάστηκε με ταυτόχρονη απώλεια του Cdt1 (siGem/siCdt1) παρουσίασαν πιο ομαλή ανάπτυξη σε σχέση με τα κύτταρα που στερήθηκαν μόνο το Cdt1 (siCdt1) ή μόνο τη Geminin (siGem), με ρυθμό που προσεγγίζει σχεδόν αυτή των κυττάρων-μαρτύρων (siLuc).

Όσον αφορά στην εμφάνιση γηρασμένου φαινοτύπου στα κύτταρα αυτά, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 4.31, τα siGem-κύτταρα παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά της ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης σε σχέση με τα siLuc-κύτταρα, αν και σε μικρότερα ποσοστά σε σχέση με την αποσιώπηση μέσω PG1 siRNA που είδαμε προηγουμένως. Ταυτόχρονη αποσιώπηση του Cdt1 στα κύτταρα δεν ανέστειλε την εμφάνιση γηρασμένων κυττάρων. Αντίθετα, η δράση του siRNA για το Cdt1 μόνο, ήταν ικανή να προκαλέσει κυτταρική γήρανση σε ποσοστό σχεδόν διπλάσιο από αυτό που προκαλούσε η απώλεια της Geminin, 7 και 13 ημέρες μετά το siRNA (εικόνα 4.31).

Εικόνα 4.31: Διάγραμμα χρώσης β-γαλακτοσιδάσης του παραπάνω πειράματος.

Συνοψίζοντας, η απώλεια της Geminin μπορεί εντός δύο εβδομάδων να επιφέρει γήρανση σε ένα μικρό αλλά αξιοσημείωτο ποσοστό (έως 15%) πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών siRNA ολιγονουκλεοτιδίων για τη Geminin, που στοχεύουν σε ξεχωριστές περιοχές του mRNA του γονιδίου (PG1 και PG2). Τα δεύτερο siRNA που χρησιμοποιήθηκε (PG2) ήταν λιγότερο αποτελεσματικό όσον αφορά στην αποσιώπηση του γονιδίου της Geminin, με αποτέλεσμα να δίνει λιγότερο έντονο φαινότυπο γήρανσης. Ταυτόχρονη αποσιώπηση του Cdt1 στα κύτταρα αυτά δε φάνηκε ικανή να αναστείλει τη γήρανση που προκάλεσε στα κύτταρα η απώλεια της Geminin, ενώ αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι η απώλεια του Cdt1 και μόνο φάνηκε να επάγει γήρανση σε ποσοστό υψηλότερο από την απώλεια της Geminin.

6. Επαγωγή φαινοτύπου πρόωρης γήρανσης ύστερα από αποσιώπηση της Geminin σε HeLa καρκινικά κύτταρα

Στη συνέχεια, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η επαγωγή γήρανσης ύστερα από απώλεια της Geminin μπορεί να λάβει χώρα και σε καρκινικά κύτταρα. Αφού δοκιμάστηκαν διάφορες καρκινικές σειρές, επιλέχτηκε για τεχνικούς λόγους η καρκινική σειρά τραχήλου της μήτρας HeLa, όπου και πραγματοποιήθηκε ένα παρόμοιο με τα προηγούμενα πείραμα κυτταρικής γήρανσης. Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 4.32Α.

Η μείωση των επιπέδων της Geminin πιστοποιήθηκε με ανοσοφθορισμό 55 ώρες μετά το RNAi (εικόνα 4.32Β). Παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζει Geminin μετά το RNAi και μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης ανά κύτταρο, όπως περιγράφηκε και στα διαγράμματα της εικόνας 4.24Β.

Τα κύτταρα παρακολούθηθηκαν για 3 εβδομάδες και αναλύθηκαν για την ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Στο διάστημα αυτό, τα μη διαμολυσμένα κύτταρα καθώς και τα siLuc-κύτταρα, σε αντίθεση με τα siGem-κύτταρα, ακολούθησαν έναν φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης, διπλασιαζόμενα σε αριθμό κάθε 2-3 ημέρες (πραγματοποιήθηκαν δηλαδή συνολικά 7 διπλασιασμοί). Τα ποσοστά της ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης που παρατηρήθηκαν ήταν σε γενικές γραμμές χαμηλά (μεταξύ 1,5%-3% στα siGem-κύτταρα όταν στα siLuc και στα μη διαμολυσμένα το ποσοστό αυτό δεν ξεπερνούσε ποτέ το 1%). Σε αντίθεση με τα siLuc ή τα μη διαμολυσμένα κύτταρα, στον πληθυσμό των siGem-κυττάρων παρατηρήθηκαν κύτταρα κεχρωσμένα (για χρώση β-γαλακτοσιδάσης), μεγάλα και πεπλατυσμένα (εικόνα 4.32Γ). Τα ποσοστά θετικής χρώσης β-γαλακτοσιδάσης αυξήθηκαν περισσότερο τις επόμενες ημέρες στα siGem-κύτταρα με φυσιολογική μορφολογία (πχ. ~20% την 21^η ημέρα, εικόνα 4.32Γ).

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.32: Η μείωση της έκφρασης της Geminin μπορεί να επάγει και σε καρκινικά κύτταρα HeLa την εμφάνιση μεγάλων και πεπλατυσμένων κυττάρων, θετικών στη ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης εντός τριών εβδομάδων. **A)** Σχηματικά το πείραμα που πραγματοποιήθηκε, **B)** πιστοποίηση των μειωμένων επιπέδων έκφρασης της Geminin μετά το RNAi, και **Γ)** ποσοστά και αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από την ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι την πρώτη εβδομάδα μετά την παροδική αποσιώπηση του γονιδίου της Geminin (και ειδικά μετά την 1^η ανακαλλιέργεια), ένα σημαντικό ποσοστό της καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων HeLa εμφάνισε έναν συγκεκριμένο φαινότυπο: έγιναν μικρά, στρογγυλά και σκουρόχρωμα, με ιδιαίτερα συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα, τα οποία παραπέμπουν σε κύτταρα με βλάβες ή σε αποπτωτικά κύτταρα. Μεταξύ των κυττάρων με φυσιολογική μορφολογία, παρατηρήθηκε ένα αξιοσημείωτο ποσοστό κυττάρων θετικών για την ειδική για γήρανση χρώση της β-γαλακτοσιδάσης.

7. Η απώλεια της Geminin καθιστά νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες περισσότερο επιρρεπείς σε πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες

Με σκοπό να διερευνήσουμε κατά πόσο η απώλεια της Geminin επιταχύνει την επαγόμενη από στρες γήρανση, επιδράσαμε σε κύτταρα που είχαν υποστεί RNAi για την Geminin με τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 . Συνεργιστική δράση των δύο, θα οδηγούσε τα siGem-κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό γήρανσης σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (siLuc). Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζεται στην εικόνα 4.33A, ενώ τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις ανοσοφθορισμού για Geminin, ενσωμάτωσης BrdU και τη ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης παρατίθενται στην εικόνα 4.33B, Γ και Δ αντίστοιχα.

Εικόνα 4.33: Κύτταρα που στερούνται της έκφρασης της Geminin γερνούν πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο βαθμό σε πείραμα πρόωρης γήρανσης, επαγόμενης από οξειδωτικό στρες. **A)** Σχηματική απεικόνιση του πειράματος. Δύο ημέρες μετά το RNAi τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δίωρη δόση του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 , κι εν συνεχεία μελετήθηκε: **B)** η έκφραση της Geminin με ανοσοφθορισμό, **Γ)** η αντιγραφική δραστηριότητα με τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU, και **Δ)** και η φαινότυπο γήρανσης με την ειδική για γήρανση χρώση της β-γαλακτοσιδάσης. Με κόκκινο αστερίσκο

4. Αποτελέσματα

επισημαίνεται η έλλειψη του συγκεκριμένου δείγματος, ενώ με κόκκινο βέλος αναδεικνύεται η συμβολή της έλλειψης της Geminin σε κύτταρα που ταυτόχρονα υφίστανται οξειδωτικό στρες, όσον αφορά στην εμφάνιση γηρασμένου φαινοτύπου.

Η έκφραση της Geminin 48 ώρες μετά το RNAi ανιχνεύεται σε πολύ μικρά ποσοστά στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το siRNA για την Geminin. Έξι ημέρες μετά την επίδραση του siRNA, και κατόπιν της δράσης του H₂O₂, η έκφραση της Geminin μειώνεται σε όλα αδιακρίτως τα κύτταρα, ενώ ακολούθως, όταν ξεκινά η επανάκαμψη των κυττάρων (βάσει των ποσοστών ενσωμάτωσης BrdU), αρχίζει να επανέρχεται σταδιακά η έκφραση της Geminin σε όλα τα κύτταρα (με πιο αργούς ρυθμούς στα siGem-κύτταρα). Εστιάζοντας στα διαγράμματα β-γαλακτοσιδάσης της εικόνας 4.33Δ, διαπιστώνουμε ότι τα κύτταρα που απώλεσαν την έκφραση της Geminin πριν υποστούν το οξειδωτικό στρες έδειχναν σαφή τάση να γερνούν πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο βαθμό από όλα τα κύτταρα-μάρτυρες. Αντιπροσωπευτικά της διαφοράς που παρατηρήθηκε μεταξύ των siGem- και των siLuc- ή των μη διαμολυσμένων κυττάρων όσον αφορά στην εμφάνιση γήρανσης είναι τα ποσοστά (κόκκινο βέλος, εικόνα 4.33Δ), αλλά και οι φωτογραφίες από την ιστοχημική χρώση β-γαλακτοσιδάσης την 3^η ημέρα του πειράματος (εικόνα 4.34).

Συμπεραίνουμε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της Geminin σε νεαρούς πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂, λειτουργεί συνεργιστικά με αυτόν, οδηγώντας σε επιτάχυνση και αύξηση των ποσοστών γηρασμένων κυττάρων που εμφανίζονται στον πληθυσμό.

Χρώση β-Γαλακτοσιδάσης την 3^η ημέρα

Εικόνα 4.34: Χαρακτηριστικές φωτογραφίες από την ανάλυση της β-γαλακτοσιδάσης την 3^η ημέρα του πειράματος. Τα siGem-κύτταρα με εμφανή τα χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης ήδη από την 3^η ημέρα του πειράματος, σε αντίθεση με τους μη διαμολυσμένους ή τους siLuc-ινοβλάστες που διατηρούν τη φυσιολογική τους μορφολογία και παραμένουν άβαφοι ύστερα από την ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ'

Διερεύνηση της συσχέτισης της διαταραχής των επιπέδων έκφρασης της Geminin με την εμφάνιση κυτταρικής γήρανσης σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού

1. Εισαγωγή

Στο προηγούμενο κεφάλαιο δείξαμε ότι η έκφραση δύο βασικών παραγόντων ρύθμισης της έναρξης της αντιγραφής του DNA, των Cdt1 και Geminin, μειώνεται σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα που γερνούν, είτε αυθόρμητα (αναπαραγωγική γήρανση), είτε πρόωρα ύστερα από την επίδραση ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), ενώ η πτώση της Geminin φάνηκε να προηγείται

της εμφάνισης του γηρασμένου φαινοτύπου στα κύτταρα. Θέλοντας να διερευνήσουμε την πιθανή λειτουργική σημασία της πτώσης της Geminin κατά τη γήρανση, προκαλέσαμε εξωγενώς, με τη χρήση της τεχνολογίας RNAi, την ελάττωση των επιπέδων της στα κύτταρα, και διαπιστώσαμε σημαντική αύξηση της παρατηρούμενης γήρανσης του πληθυσμού, τόσο σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας, όσο και υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Τέλος, η απώλεια της Geminin φάνηκε να επιδεινώνει και να επιταχύνει τα συμπτώματα πρόωρης κυτταρικής γήρανσης νεαρών ανθρώπινων ινοβλαστών υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Στο τελευταίο αυτό μέρος της διατριβής στραφήκαμε στο σύστημα του ποντικού, προκειμένου να διερευνήσουμε τη λειτουργική συσχέτιση της έκφρασης της Geminin με την επαγωγή της γήρανσης. Χρησιμοποιήθηκαν εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts ή MEFs) για την πραγματοποίηση των εξής πειραμάτων: 1) ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους ινοβλάστες αγρίου τύπου ως προς την ικανότητά τους να γηράσκουν σε καλλιέργεια, τόσο υπό κανονικές συνθήκες, όσο και υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, και 2) υπερέκφραση της Geminin σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού και παρακολούθηση της «αυθόρμητης» γήρανσης που παρουσιάζουν, συγκρίνοντάς την με αυτή των ινοβλαστών-μαρτύρων

2. Εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού ετερόζυγοι για Geminin (+/-), ως ένα *in vivo* μοντέλο μειωμένης γονιδιακής δόσης της Geminin, για τη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης

Η στοχευμένη μεταλλαγή ενός γενετικού τόπου με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού σε εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα (ES cells) χρησιμοποιείται συχνά για τη δημιουργία ζωικών μοντέλων στα οποία έχει αδρανοποιηθεί *in vivo* ένα συγκεκριμένο γονίδιο («knock-out» ζώα). Τέτοια ζώα, αποτελούν ένα σημαντικό «εργαλείο» στην προσπάθεια διερεύνησης του *in vivo* ρόλου των γονιδίων. Η δημιουργία πειραματοζώων που να έχουν υποστεί καθολική αδρανοποίηση του γονιδίου της Geminin δεν είναι εφικτή, αφού έχει δείχτει ότι αυτά πεθαίνουν πολύ νωρίς κατά την εμβρυογένεση (Hara et al., 2006; Tachibana et al., 2005) (Κοταντάκη, Π., διδακτορική διατριβή). Για το λόγο αυτό, στην προσπάθεια διερεύνησης του *in vivo* ρόλου της Geminin στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των συστημάτων του ποντικού, δημιουργήθηκαν ζώα που στερούνται του ενός αλληλομόρφου της Geminin (+/-) (Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ταραβήρας Σ.) και τα οποία είναι βιώσιμα (Κοταντάκη, Π., διδακτορική διατριβή). Στα ζώα αυτά πιστοποιήθηκε η μείωση των επιπέδων έκφρασης της Geminin, τόσο σε ενήλικους ιστούς όσο και σε εμβρυικούς ινοβλάστες, σε σχέση με τους

4. Αποτελέσματα

αντίστοιχους ιστούς ή ινοβλάστες αγρίου τύπου (Κοταντάκη, Π., διδακτορική διατριβή)(και εικόνα 4.35).

Εικόνα 4.35: Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western των επιπέδων της πρωτεΐνης Geminin σε ετερόζυγους για Geminin εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού. Τα επίπεδα έκφρασης της Geminin στα κυτταρικά εκχυλίσματα των ετερόζυγων ινοβλαστών +/- (αριστερά) εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με αυτά των αγρίου τύπου +/+ (δεξιά).

Στο ανοσοαποτύπωμα της παραπάνω εικόνας φαίνεται η μεγάλη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της Geminin στα κυτταρικά εκχυλίσματα ετερόζυγων για Geminin (+/-) και αγρίου τύπου (+/+) εμβρυικών ινοβλαστών, γενιάς P3. Επομένως τα ζώα αυτά, αλλά και οι εμβρυικοί ινοβλάστες που απομονώνονται από αυτά, μπορούν να θεωρηθούν ως ένα καλό *in vivo* σύστημα μειωμένης γονιδιακής δόσης της Geminin, στην προσπάθεια διερεύνησης νέων κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες πιθανά εμπλέκεται (για παράδειγμα στην παρούσα εργασία στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης).

Για την παραγωγή των ετερόζυγων (+/-) για Geminin εμβρυικών ινοβλαστών, θηλυκά ετερόζυγα ποντίκια διασταυρώθηκαν με αρσενικά αγρίου τύπου και οι ινοβλάστες απομονώθηκαν από τα έμβρυα την 13^η προς 14^η ημέρα της κύησης (οι ινοβλάστες αυτοί θεωρήθηκαν γενιάς P0). Με γονοτύπηση του DNA των εμβρύων (βασισόμενη σε αντιδράσεις PCR)(Κοταντάκη, Π., διδακτορική διατριβή) έγινε η διάκριση των εμβρύων σε ετερόζυγα και αγρίου τύπου, ενώ για την αξιόπιστη σύγκριση των κυττάρων των δύο γονοτύπων χρησιμοποιήθηκαν πάντοτε ζευγάρια (+/+ και +/-) από την ίδια μητέρα.

Οι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού μπορούν να παραμείνουν σε *in vitro* καλλιέργεια για λίγες κυτταρικές διαιρέσεις (7-10 γενιές ή κατά μέσο όρο 15-30 διπλασιασμούς), προτού μεταπέσουν «αυθόρμητα» σε μία κατάσταση που αποδίδεται σε «καλλιεργητικό σοκ» λόγω της *ex vivo* καλλιέργειάς τους, και προσομοιάζει πολύ στην κυτταρική γήρανση («spontaneous senescence»)(Kamijo et al., 1997; Sebastian et al., 2005). Πιστεύεται ότι, σε αντίθεση με τους ανθρώπινους ινοβλάστες, οι ινοβλάστες ποντικού, υπό τις κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

4. Αποτελέσματα

(παρουσία 20% O₂), υφίστανται έντονο οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα τη γρήγορη συσσώρευση βλαβών στο DNA που παρεμποδίζει τον παραιτέρω πολλαπλασιασμό τους (Busuttil et al., 2004; Kamijo et al., 1997; Kuschak et al., 2002; Parrinello et al., 2003). Εξαιτίας της εγγενούς αυτής αδυναμίας των MEFs να παραμένουν *in vitro* για πολλές κυτταρικές διαιρέσεις, είναι σημαντικό όλα τα πειράματα να ξεκινούν με όσο το δυνατόν νεαρότερα κύτταρα. Στην εικόνα 4.36Α παρακολουθούμε την ανάπτυξη των ινοβλαστών αγρίου τύπου (+/+) μεταξύ των γενεών P3-P7, κατά την οποία είναι εμφανής η σταδιακή μείωση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας.

Εικόνα 4.36: Μείωση της έκφρασης της Geminin και συγχρόνως της πολλαπλασιαστικής ικανότητας εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού αγρίου τύπου (+/+) με την πάροδο των γενεών. **Α)** Συγκεκριμένος αριθμός ινοβλαστών γενιάς P3 επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri και ανά 3 ημέρες υπολογιζόταν ο αριθμός των κυτταρικών διπλασιασμών που επιτελούσαν, **Β)** έκφραση της Geminin σε ινοβλάστες αγρίου τύπου νεαρής (P3) και μεγάλης (P7) ηλικίας με ανάλυση Western. Το δείγμα ανθρώπινων ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της έκφρασης της Geminin, **Γ)** έκφραση της Geminin με ανοσοφθορισμό σε αυξανόμενες γενιές των WT MEFs, και **Δ)** παρουσίαση εικόνων ανοσοφθορισμού από το πείραμα στο Γ. Οι εικόνες τραβήχτηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες ώστε να είναι δυνατή η άμεση σύγκρισή τους. Τα NIH3T3 κύτταρα χρησιμεύουν ως θετικός μάρτυρας της Geminin σε κύτταρα ποντικού.

4. Αποτελέσματα

Παρατηρούμε ότι η Geminin υφίσταται ταχεία μείωση των επιπέδων έκφρασής της στα κύτταρα αυτά, τόσο συνολικά στον πληθυσμό (ανοσοαποτύπωμα εικόνας 4.36B), όσο και ανά κύτταρο (πείραμα ανοσοφθορισμού, εικόνα 4.36Γ). Ενδεικτικά, το ποσοστό των κυττάρων του πληθυσμού που εμφανίζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης της Geminin μειώνεται στο μισό ήδη από την πρώτη κυτταρική διαίρεση (γενιά P3 προς P4).

Συμπεραίνουμε ότι, και στο σύστημα του ποντικού, η Geminin υφίσταται αρνητική ρύθμιση κατά τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, παρόμοια με τη ρύθμιση που υφίσταται όταν πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες γηράσκουν.

3. Ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (+/-) εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά «αυθόρμητης» κυτταρικής γήρανσης σε σχέση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+)

Απώτερος στόχος ήταν η αξιοποίηση του συστήματος αυτού μειωμένης έκφρασης της Geminin (τους ετερόζυγους εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού) για τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των μειωμένων ενδοκυττάρων επιπέδων της Geminin με την ενεργοποίηση των μονοπατιών της κυτταρικής γήρανσης. Αρχικά εξετάστηκε ο ρυθμός εισόδου ετερόζυγων εμβρυικών ινοβλαστών σε γήρανση ύστερα από συνεχή ανακαλλιέργεια. Αγρίου τύπου (+/+) κι ετερόζυγοι (+/-) για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες αφέθηκαν σε καλλιέργεια για 8 ημέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων καταγράφηκαν η ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων (εικόνα 4.37A) και τα ποσοστά γήρανσης που επιδείκνυαν ύστερα από την ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης (εικόνα 4.37B).

Εικόνα 4.37: Ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες εισέρχονται σε «αυθόρμητη» γήρανση γρηγορότερα και σε μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου. Ετερόζυγοι και αγρίου τύπου ινοβλάστες (P4) αφέθηκαν σε καλλιέργεια για οκτώ (8) ημέρες. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιήθηκαν: **A**) καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων, και **B**) χρώση β-γαλακτοσιδάσης, για τον προσδιορισμό της εισόδου των κυττάρων σε γήρανση.

4. Αποτελέσματα

Σύμφωνα με τις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων στην εικόνα 4.37A, τα ετερόζυγα (+/-) κύτταρα σταματούν γρηγορότερα τον πολλαπλασιασμό τους, σε σχέση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+), οι οποίοι, συγκριτικά με τους πρώτους, επιτέλεσαν μέσα σε μια εβδομάδα τριπλάσιο αριθμό διπλασιασμών. Τα ποσοστά γήρανσης που καταγράφηκαν, βάσει της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης, στους δύο διαφορετικούς πληθυσμούς παρουσιάζονται στο γράφημα της εικόνας 4.37B. Όπως είναι εμφανές, τα ετερόζυγα κύτταρα επιδείκνυαν πάντα μεγαλύτερα και στατιστικώς σημαντικά (* $p=0,03663$) ποσοστά γήρανσης σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου, σε όλες τις γενιές που εξετάστηκαν.

Τα παραπάνω αποτελέσματα θελήσαμε να τα επαληθεύσουμε χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό ζεύγος (+/+ και +/-) εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού. Στην εικόνα 4.38 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού.

Εικόνα 4.38: Επανάληψη πειράματος «αυθόρμητης» κυτταρικής γήρανσης διαφορετικού (σε σχέση με την εικόνα 4.37) ζεύγους εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού (+/+ και +/-). **A)** καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων, και **B)** χρώση β-γαλακτοσιδάσης για τον προσδιορισμό των ποσοστών γηρασμένων κυττάρων.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι ετερόζυγοι ινοβλάστες (+/-) έδειχναν εξ αρχής πολύ χαμηλότερα αρχικά ποσοστά διαιρούμενων κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου (εικόνα 4.38A), ενώ με την πάροδο των ημερών τα ποσοστά και των δύο συνέκλιναν στα ίδια περίπου επίπεδα (την 5^η

ημέρα, εικόνα 4.38Α). Τα ποσοστά θετικής χρώσης β-γαλακτοσιδάσης των ετερόζυγων (+/-) κυττάρων ήταν μεγαλύτερα (περίπου διπλάσια) σε σχέση με αυτά των κυττάρων αγρίου τύπου (+/+), σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εικόνας 4.37. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση β-γαλακτοσιδάσης της τελευταία ημέρας του πειράματος φαίνονται στο κάτω μέρος της εικόνας 4.38Β. Η μορφολογία των ετερόζυγων ινοβλαστών την ημέρα εκείνη (σε αντίθεση με αυτή των ινοβλαστών αγρίου τύπου) προσομοιάζει περισσότερο αυτή γηρασμένων κυττάρων: μεγάλα σε μέγεθος, πεπλατυσμένα, με μακριές αποφυάδες και κοκκιώδες κυτταρόπλασμα.

4. Ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (+/-) εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης σε σχέση με τους ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+) υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες

Κατ'αντιστοιχία με τα ευρήματα των πειραμάτων κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινους ινοβλάστες, θελήσαμε στη συνέχεια, να συγκρίνουμε την γήρανση αγρίων τύπου κι ετερόζυγων εμβρυικών ινοβλαστών ύστερα από υποβολή τους σε οξειδωτικό στρες με τη χορήγηση H₂O₂ στο θρεπτικό μέσο. Αρχικά ελέγχθηκε εάν το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στους ανθρώπινους ινοβλάστες (εικόνα 4.13Α) προκαλούσε, ομοίως, οξειδωτικό στρες στους εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (εικόνα 4.39Α). Ως θετικός μάρτυρας πρόκλησης οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήθηκε η φωσφορυλίωση της ιστόνης γ-H2AX (εικόνα 4.39Β).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.39, το πρωτόκολλο οξειδωτικού στρες που εφαρμόστηκε προκάλεσε βλάβες στους πυρήνες, τόσο των αγρίου τύπου (+/+) όσο και των ετερόζυγων για Geminin (+/-) ινοβλαστών, το οποίο έγινε εμφανές από την αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που έδειχναν θετική χρώση (έντονη ή μέτρια) για την ιστόνη γ-H2AX (εικόνα 4.39Β).

Εικόνα 4.39: Δοκιμή του πρωτοκόλλου οξειδωτικού στρες σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs). **A)** Σχηματικά το πείραμα που πραγματοποιήθηκε: ετερόζυγοι και αγρίου τύπου ινοβλάστες υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες με την προσθήκη H₂O₂ στο θρεπτικό μέσο (διπλή δόση εντός 5 ημερών και **B)** έλεγχος των προκαλούμενων -από τη δράση του H₂O₂- βλαβών στο DNA, με χρώση έναντι της τροποποιημένης ιστόνης γ-H2AX (δείκτης διπλών θραύσεων), 4 ώρες μετά τη δεύτερη δόση. Χαρακτηριστικές φωτογραφίες από το πείραμα ανοσοφθορισμού πριν (-) και μετά (+) την προσθήκη του H₂O₂ (πάνω), και ποσοτικοποίηση αυτής (κάτω).

Οι εικόνες 4.40, 4.41 και 4.42, 4.43 που ακολουθούν περιγράφουν τα αποτελέσματα δύο πειραμάτων γήρανσης που πραγματοποιήθηκαν με δύο διαφορετικά ζευγάρια εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού, ύστερα από εφαρμογή του παραπάνω πρωτοκόλλου. Να σημειωθεί ότι στο πρώτο κατά σειρά πείραμα χρειάστηκε και μία τρίτη λίγο μεγαλύτερη δόση H₂O₂ (1000μM, 5 ημέρες μετά τη 2^η δόση) προκειμένου τα κύτταρα να εμφανίσουν σαφή σημάδια πρόωρης γήρανσης (εικόνα 4.40A).

Εικόνα 4.40: Πείραμα πρόωρης γήρανσης εμβρυικών ινοβλαστών μετά την επίδραση οξειδωτικού στρες (κλώνοι MEFs 11+/+ και 12+/-). **A)** το πείραμα που πραγματοποιήθηκε. Οι λατινικοί αριθμοί (I, II, III) συμβολίζουν τον αριθμό των δόσεων H_2O_2 με τις οποίες επιδράσαμε στα κύτταρα, και **B)** πείραμα ενσωμάτωσης BrdU (κατά τις ημέρες 6-10) με στόχο την παρακολούθηση του ποσοστού διαιρούμενων κυττάρων.

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των καλλιιεργειών δείχνει γενικά πτωτική, χωρίς να παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές στα κύτταρα των δύο διαφορετικών γονοτύπων (εικόνα 4.40B), με τα ετερόζυγα να δείχνουν ξανά χαμηλότερα αρχικά ποσοστά διαιρούμενων κυττάρων. Τα ποσοστά χρώσης β-γαλακτοσιδάσης είναι μεγαλύτερα (κατά μέσο όρο διπλάσια) στους ετερόζυγους εμβρυικούς ινοβλάστες (+/-)(εικόνα 4.41B), όπως και στα προηγούμενα πειράματα. Χαρακτηριστικές φωτογραφίες των ιστοχημικά βαμμένων για β-γαλακτοσιδάση κυττάρων παρουσιάζονται στην εικόνα 4.41, με κύριο γνώρισμα τη συχνότερη εμφάνιση μεγάλου μεγέθους κυττάρων που βάφονται θετικά στην ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης στις καλλιέργειες των ετερόζυγων (+/-) παρά των αγρίων τύπου (+/+) ινοβλαστών (μαύρα βέλη, εικόνα 4.41).

MEF11^{+/+} και MEF12^{+/-}

Χρώση β γαλακτοσιδάσης

Εικόνα 4.41: Φωτογραφίες από την ανάλυση β-γαλακτοσιδάσης από το παραπάνω πείραμα πρόωρης γήρανσης εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού, την 20^η ημέρα του πειράματος (αριστερά). Τα μαύρα βέλη δείχνουν τα μεγάλα, πεπλατυσμένα και θετικά για την ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης κύτταρα που εμφανίζονταν με μεγαλύτερη συχνότητα στους ετερόζυγους ινοβλάστες (+/-). Δεξιά: ποσοτικοποίηση της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα όταν το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με διαφορετικό ζεύγος εμβρυικών ινοβλαστών (MEF). Στις εικόνες 4.42 και 4.43 παρουσιάζονται το ακριβές πείραμα που πραγματοποιήθηκε και χαρακτηριστικές φωτογραφίες χρώσης β-γαλακτοσιδάσης αντίστοιχα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα η διαφορά των επιπέδων χρώσης β-γαλακτοσιδάσης να εμφανίζεται περισσότερο αμβλυμμένη μεταξύ ετερόζυγων κι αγρίου τύπου ινοβλαστών, ωστόσο εξακολουθεί να υπάρχει η ίδια τάση των πρώτων να επιδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά θετικής χρώσης β-γαλακτοσιδάσης καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (εικόνα 4.43A και 4.43B).

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.42: Δεύτερο πείραμα επαγωγής πρόωρης γήρανσης σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού, ύστερα από την επίδραση οξειδωτικού στρες (κλώνοι MEF 6+/+ και 5+/-). **A)** σχηματικά η πορεία του πειράματος που πραγματοποιήθηκε, και **B)** χαρακτηριστικές φωτογραφίες από την ανάλυση β-γαλακτοσιδάσης. Παρατηρήθηκε, και πάλι, ότι οι ετερόζυγες καλλιέργειες (+/-) εμφάνιζαν πιο συχνά μεγάλα και πεπλατυσμένα κύτταρα θετικά για χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε σχέση με τις καλλιέργειες εμβρυικών ινοβλαστών αγρίου τύπου (+/+). Οι λατινικοί αριθμοί I και II παραπέμπουν και πάλι στον αριθμό των δόσεων H_2O_2 με τις οποίες έχουμε επιδράσει στα κύτταρα.

Εικόνα 4.43: Ποσοστά χρώσης β-γαλακτοσιδάσης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, επιδρώντας στα κύτταρα είτε με μία, είτε με δύο δόσεις H_2O_2 .

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, ετερόζυγοι για Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες (+/-) συσχετίζονται, αφενός, με μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, αφετέρου με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης κυττάρων με γηρασμένο φαινότυπο (κύτταρα ευμεγέθη, πεπλατυσμένα και θετικά για την ειδική για γήρανση χρώση της β-γαλακτοσιδάσης).

5. Εξωγενής ιϊκή υπερέκφραση της Geminin σε εμβρυικούς ινοβλάστες αγρίου τύπου (+/+) οδηγεί σε μικρή μείωση της εμφανιζόμενης γήρανσης

Όπως δείχθηκε προηγουμένως, τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς Geminin μειώνονται γρήγορα σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού που γερνούν σε καλλιέργεια. Τελευταίο βήμα στην προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης της Geminin με την εμφάνιση γηρασμένου φαινοτύπου, αποτέλεσε η παρεμπόδιση της μείωσης των επιπέδων της Geminin σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες (+/+) που γερνούν σε καλλιέργεια. Εάν η μείωση των επιπέδων της Geminin σε κύτταρα που φυσιολογικά γερνούν έχει λειτουργική σημασία για την ενεργοποίηση των μονοπατιών της γήρανσης, τότε αναμένουμε η παρεμπόδιση της πτώσης της Geminin να αναστέλει ή να καθυστερεί την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου.

4. Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε εξωγενής έκφραση της ανθρώπινης Geminin (hGeminin) σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (+/+), μέσω χρήσης του ρετροϊκού φορέα pmx-Geminin-IRES-GFP (εικόνα 4.44A). Ο φορέας αυτός φέρει καρβοξυτελικά το cDNA της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, διευκολύνοντας τον προσδιορισμό του ποσοστού των διαμολυσμένων κυττάρων. Διαθέτει, επιπλέον, εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site ή IRES), η οποία επιτρέπει στο ενιαίο μετάγραφο, Geminin-GFP, να καθοδηγεί τη σύνθεση δύο ανεξάρτητων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, της Geminin και του GFP.

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε τη διαμόλυνση εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού αγρίου τύπου με πακεταρισμένους Geminin-ιούς, έχοντας ως μάρτυρες κύτταρα διαμολυσμένα με ιούς που φέρουν σκέτο GFP. Οι διαμολυσμένες καλλιέργειες παρακολουθήθηκαν για περίπου δυο εβδομάδες, κατά τη διάρκεια των οποίων καταγράψαμε τόσο τον ρυθμό ανάπτυξής τους, όσο και τα ποσοστά εμφανιζόμενης γήρανσης ύστερα από χρώση β-γαλακτοσιδάσης στο pH=6 (εικόνα 4.44).

Εικόνα 4.44: Υπερέκφραση της Geminin σε αγρίου τύπου ινοβλάστες ποντικού (+/+) με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα pmx-IRES-GFP. **Α)** σχηματική απεικόνιση του ρετροϊκού οχήματος που χρησιμοποιήθηκε, **Β)** πείραμα ανοσοφθορισμού για την πιστοποίηση της υπερέκφρασης της Geminin, την 5^η και την 13^η ημέρα μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων. **Πάνω:** αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες ανοσοφθορισμού από την 5^η ημέρα του πειράματος και **κάτω:** διάγραμμα με τα %

4. Αποτελέσματα

ποσοστά των κυττάρων θετικά για Geminin την 5^η και την 13^η ημέρα του πειράματος, και Γ) καμπύλες ανάπτυξης των διαμολυσμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Αρχικά πιστοποιήθηκε η υπερέκφραση της Geminin στα κύτταρα με πείραμα ανοσοφθορισμού (εικόνα 4.44B). Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Geminin, αφού λόγω της ύπαρξης του IRES, ανίχνευση του GFP θα σήμαινε διαμολυσμένα κύτταρα αλλά όχι απαραίτητα έκφραση και της εξωγενούς Geminin. Πράγματι, την 5^η ημέρα μετά τη διαμόλυνση και σύμφωνα με το διάγραμμα της εικόνας 4.44B, η Geminin δείχνει να υπερεκφράζεται στον πληθυσμό σε διπλάσια ποσοστά σε σχέση με την ενδογενή των κυττάρων-μαρτύρων (διαμολυσμένα με GFP ιό ή μη διαμολυσμένα). Η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη παραμένει πυρηνική (εικόνα 4.44B, κάτω), και σε επίπεδα που μοιάζουν με τα φυσιολογικά. Σε άλλα κυτταρικά συστήματα υπερέκφραση της Geminin μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της έναρξης της αντιγραφής του DNA και αυξημένα ποσοστά κυτταρικής απόπτωσης (Benjamin et al., 2004; Kerns et al., 2007; McGarry, 2002; McGarry, 2005; McGarry and Kirschner, 1998; Quinn et al., 2001; Salabat et al., 2008). Οι καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων της εικόνας 4.44B δείχνουν παρόμοιες, υποδεικνύοντας ότι η ήπια υπερέκφραση της Geminin που επιτεύχθηκε συνέβαλε στην αύξηση των επιπέδων της στον πληθυσμό, χωρίς να επιφέρει επιπτώσεις στην επιβίωση των κυττάρων. Παρακολουθώντας την πορεία γήρανσης των κυττάρων αυτών με χρώση β-γαλακτοσιδάσης, καταλήξαμε στο διάγραμμα της εικόνας 4.45.

Εικόνας 4.45: Μειωμένα ποσοστά γήρανσης βάσει της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού ύστερα από υπερέκφραση της Geminin με χρήση του ρετροϊκού φορέα

4. Αποτελέσματα

pmx-IRES-GFP. **A)** χαρακτηριστικές φωτογραφίες της χρώσης β-γαλακτοσιδάσης την 13^η ημέρα του πειράματος, και **B)** ποσοστά θετικής χρώσης β-γαλακτοσιδάσης κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Οι διαφορές στη γήρανση των δύο πληθυσμών δεν είναι στατιστικώς σημαντικές λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων, εντούτοις υπήρχε η ίδια τάση καθόλη τη διάρκεια του πειράματος: τα κύτταρα που υπερεξέφραζαν Geminin, παρότι είχαν υποστεί την ίδια μεταχείριση με τα κύτταρα-μάρτυρες, έδειχναν χαμηλότερα επίπεδα θετικής χρώσης β-γαλακτοσιδάσης. Στις φωτογραφίες μπορούμε να διακρίνουμε τα σχετικά χαμηλότερα ποσοστά θετικής χρώσης στους εμβρυικούς ινοβλάστες που υπερεκφράζουν Geminin σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Παρόμοιο πείραμα επαναλήφθηκε με χρήση διαφορετικού κλώνου ινοβλαστών αγρίου τύπου (MEF6), ενώ αυτή τη φορά επιδράσαμε στα κύτταρα με H₂O₂ λίγες μέρες μετά τη διαμόλυνση με τους ιούς-Geminin, με σκοπό να επιταχύνουμε την πορεία τους προς γήρανση (εικόνα 4.46A).

Η υπερέκφραση της Geminin με τη χρήση των ρετροϊκών φορέων στους MEF πιστοποιήθηκε και πάλι με πείραμα ανοσοφθορισμού, με αντισώματα τόσο έναντι της φθορίζουσας χρωστικής GFP όσο κι έναντι της Geminin (εικόνα 4.46).

Εικόνα 4.46: Υπερέκφραση της Geminin σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες (MEF6) που γερνούν σε καλλιέργεια κατόπιν επίδρασης του οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂. **A)** σχηματικά η πορεία του πειράματος που πραγματοποιήθηκε, και **B)** τα ποσοστά έκφρασης του GFP (αριστερά) και της Geminin (δεξιά) σε πείραμα ανοσοφθορισμού 3, 7 και 9 ημέρες μετά τη διαμόλυνση.

Βάσει των ποσοστών GFP φθορισμού στα διαγράμματα της εικόνας 4.46B (αριστερά), τα ποσοστά επιτυχίας της διαμόλυνσης ξεπερνούν κατά μέσο όρο το 50%, των κυττάρων, ενώ σημαντική είναι και η υπερέκφραση της Geminin στον πληθυσμό την 3^η ημέρα του πειράματος (έκφραση

4. Αποτελέσματα

Geminin στο ~55% των διαμολυσμένων με Geminin-ιούς κυττάρων σε σύγκριση με το ~35% των κυττάρων διαμολυσμένων με GFP-ιούς ή ~30% των μη διαμολυσμένων κυττάρων). Τα ποσοστά αυτά φαίνεται να διατηρούνται τουλάχιστον για μια εβδομάδα. Την 9^η ημέρα του πειράματος (4 ημέρες μετά τη διαμεσολάβηση της δόσης H₂O₂), η έκφραση της Geminin, τόσο της ενδογενούς όσο και της ιϊκής, ελαχιστοποιείται, γεγονός που ερμηνεύεται βάσει των όσων περιγράψαμε στα προηγούμενα πειράματά μας, αναφορικά με την αρνητική επίδραση του οξειδωτικού στρες στα επίπεδα έκφρασης της Geminin, ενώ συγχρόνως επέρχεται και η φυσιολογική γήρανση στον πληθυσμό.

Ενδεικτικές φωτογραφίες ανοσοφθορισμού την 3^η ημέρα μετά την διαμόλυνση με τους ιούς παρουσιάζονται στην εικόνα 4.47. Αφού η Geminin υπερκωδάζεται με IRES-ρετροϊκό όχημα, η ταυτόχρονη παρουσία στα κύτταρα πράσινου (GFP) και κόκκινου σήματος (Geminin) πιστοποιεί την υπερέκφραση της ιϊκής (εξωγενούς) Geminin στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Εικόνα 4.47: Εκτίμηση της ιϊκής υπερέκφρασης της Geminin σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού με πείραμα ανοσοφθορισμού. Χαρακτηριστικές φωτογραφίες του πειράματος ανοσοφθορισμού την 3^η ημέρα μετά τη

4. Αποτελέσματα

διαμόλυνση. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με δύο συνδυασμούς αντισωμάτων για την Geminin (Gem) και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)(m=αντίσωμα που παρήχθει σε ποντικό, r=αντίσωμα που παρήχθει σε κουνέλι).

Πραγματοποιώντας πείραμα χρώσης β-γαλακτοσιδάσης με σκοπό να καταγράψουμε τα ποσοστά γήρανσης των πληθυσμών καταλήξαμε στο γράφημα της εικόνας 4.48. Διαπιστώνουμε ότι, αν και οι διαφορές δεν είναι στατιστικώς σημαντικές, εντούτοις, εξακολουθεί να υπάρχει η ίδια τάση μειωμένης γήρανσης των Gem-IRES-GFP κυττάρων.

Εικόνα 4.48: Χρώση β-γαλακτοσιδάσης στα κύτταρα του παραπάνω πειράματος. Και πάλι, τα Geminin-IRES-GFP κύτταρα εμφανίζουν μειωμένα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης, σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες IRES-GFP.

Διαπιστώνουμε, επομένως, ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Geminin σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού οδηγεί σε μείωση της εμφανιζόμενης γήρανσης, σε σχέση με τη γήρανση των ινοβλαστών-μαρτύρων (διαμολυσμένοι με GFP-ιούς), το οποίο συμφωνεί με αποτελέσματα προηγούμενου πειράματος (εικόνα 4.45).

Τα παραπάνω ενισχύουν την υπόθεση ότι η διατάραξη των ενδοκυττάρων επιπέδων της Geminin σχετίζεται με την εμφάνιση γηρασμένου φαινοτύπου και υποδεικνύουν ότι ο ρόλος της Geminin ίσως να είναι σημαντικός στη διαδικασία επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Εισαγωγή

Στόχος όλων των φυσιολογικών κυττάρων ενός πολυκύτταρου οργανισμού είναι να πολλαπλασιάζονται, αλλά συγχρόνως να συμβάλλουν στη σωστή διαμόρφωση ιστών και οργάνων. Η διασφάλιση της ομοιόστασης σε οργανισμικό επίπεδο στηρίζεται στην αυστηρή ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης, παραμονής σε φάση ηρεμίας (ή G0) ή εισόδου σε γήρανση. Απορρύθμιση των μηχανισμών εκείνων που ρυθμίζουν την ορθή έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και την ενεργοποίηση των παραπάνω μονοπατιών δύναται, υπό συνθήκες, να αποτελέσει αιτία κακοήθους εξαλλαγής, με αποτέλεσμα τον συνεχή κι ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τελικά τη νεοπλασία.

Αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια αναδεικνύουν το βασικό ρόλο που κατέχει το προ-αντιγραφικό σύμπλοκο (pre-RC) και η διαδικασία αδειοδότησης της αντιγραφής (licensing) όχι μόνο στη χρονικά σωστή εναλλαγή των φάσεων του μιτωτικού κύκλου αλλά και στη ρύθμιση της εισόδου κι εξόδου των κυττάρων από αυτόν, τόσο *in vitro* όσο και σε ιστούς μεταζώων (Blow and Hodgson, 2002; Kingsbury et al., 2005; Stoeber et al., 2001; Wharton et al., 2004). Ενώ αρκετά δεδομένα έχουν προκύψει για τη ρύθμιση και τον πιθανό ρόλο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αδειοδότηση της χρωματίνης σε καταστάσεις εκτός κυτταρικού κύκλου, όπως κατά την έξοδο σε φάση ηρεμίας, κατά τη διαφοροποίηση ή την απόπτωση, λίγα είναι γνωστά για την πιθανή συμμετοχή των μορίων αυτών στη διαδικασία της μη αναστρέψιμης απόσυρσης από τον κυτταρικό κύκλο, γνωστή ως κυτταρική γήρανση. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης ενός κεντρικού ρυθμιστή της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, του Cdt1, και του αναστολέα αυτού Geminin, κατά την είσοδο πρωτογενών ινοβλαστών σε κυτταρική γήρανση, αναπαραγωγική ή επαγόμενη με την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων.

2. Παρόμοιο το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin στους πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες σε σχέση με κύτταρα προερχόμενα από καρκινικό ιστό και σημασία πρωτεολυτικής ρύθμισης του Cdt1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Προηγούμενες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα υποστηρίζουν ότι η έκφραση των Cdt1 και Geminin εντοπίζεται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ συγχρόνως αναδεικνύουν τη σημασία της αρνητικής ρύθμισης του Cdt1 κατά την G1/S μετάβαση (οπότε και η έκφραση της Geminin αυξάνεται). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας κρίθηκε, αρχικά, σκόπιμος ο

χαρακτηρισμός του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin σε ασύγχρονες καλλιέργειες πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων και η σύγκρισή του με το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης στα περισσότερα μελετημένα –έως τώρα– καρκινικά κύτταρα.

Αν και τα καρκινικά κύτταρα αποτελούν σήμερα ένα άριστο *in vitro* κυτταρικό σύστημα μελέτης των ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών, λόγω της ευκολίας τόσο στην καλλιέργεια όσο και στην ανάλυσή τους (ειδικά όσον αφορά στις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου τις οποίες συχνά υπερεκφράζουν), ωστόσο, είναι φανερό ότι ολοκληρωμένη θεώρηση θα έχουμε μόνο όταν στα πειραματικά δεδομένα από μελέτες σε καρκινικά κύτταρα προστεθούν πληροφορίες που προέρχονται από καλλιέργειες πρωτογενών-φυσιολογικών κυττάρων, και οι οποίες μέχρι σήμερα είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Ένας, επιπλέον, λόγος που καθιστά πολύτιμες τις μελέτες σε πρωτογενή κύτταρα που προέρχονται απευθείας από ιστούς ή βιοψίες είναι ότι τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί καμία ή ελάχιστες γενετικές τροποποιήσεις (μεταλλαγές), με αποτέλεσμα να αντιπροσωπεύουν στο μέγιστο δυνατό βαθμό τα φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται *in vivo* στον οργανισμό. Επιπλέον, η μελέτη της ρύθμισης των μορίων Cdt1 και Geminin σε φυσιολογικούς ή καρκινικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές είναι πάντοτε χρήσιμη για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τους μηχανισμούς διασφάλισης της γενωμικής σταθερότητας στα ποικίλα κυτταρικά περιβάλλοντα, ειδικά μετά τις πρόσφατες αποκαλύψεις που συνδέουν την απορρύθμιση της έκφρασής τους με φαινόμενα πολυπλοειδίας και χρωμοσωματικής αστάθειας κυττάρων, καθώς και με κακοήγη εξαλλαγή σε προκαρκινικές αλλοιώσεις ιστών (Bartkova et al., 2006; Karakaidos et al., 2004; Li and Blow, 2004; Melixetian et al., 2004; Tatsumi et al., 2006; Vaziri et al., 2003; Zhu et al., 2004).

Πειράματα ανοσοφθορισμού με την χρήση αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων μαρτύρων των φάσεων του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνης A που αποτελεί μάρτυρα των φάσεων S και G2 και του αναλόγου της θυμιδίνης BrdU που αποτελεί μάρτυρα της S φάσης) έδειξαν ότι το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των Cdt1 και Geminin κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου νεαρών πρωτογενών ινοβλαστών δε διαφοροποιείται σε σχέση με εκείνο των καρκινικά μετασχηματισμένων κυττάρων. Σε όλα τα πρωτογενή κύτταρα που εξετάστηκαν (ανθρώπινοι ινοβλάστες ούλου, WI-38 εμβρυικοί ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα και HUVEC ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου) οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin εντοπίστηκαν αποκλειστικά στον πυρήνα, κατά προσέγγιση στο 50% των διαιρούμενων κυττάρων της καλλιέργειας, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας σε καρκινικά κύτταρα (Nishitani et al., 2001). Αντίστοιχα πειράματα ανοσοφθορισμού με τη χρήση κυκλίνης A επιβεβαίωσαν την αναμενόμενη (από μελέτες σε καρκινικά κύτταρα) έκφραση των μορίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου: η έκφραση της πρωτεΐνης Cdt1 περιορίστηκε σε κύτταρα αρνητικά για κυκλίνη A (δηλαδή σε G1 κύτταρα), ενώ

εκείνη της Geminin σε κύτταρα θετικά για κυκλίνη A. Πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού (Cdt1 και Geminin μαζί) που επιχειρήθηκαν στις καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων αξιοποιώντας το νέο, ειδικό, μονοκλωνικό αντίσωμα για την Geminin που παρασκευάστηκε στα πλαίσια της εργασίας αυτής, επιβεβαίωσαν ότι είναι αδύνατη η ανίχνευση κυττάρων που να συνεκφράζουν και τις δύο πρωτεΐνες. Διαπιστώνουμε, επομένως, ότι οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin παρουσιάζουν αντίστροφο χρονικό πρότυπο έκφρασης, τόσο στα καρκινικά όσο και στα πρωτογενή κύτταρα, επιβεβαιώνοντας την «ανταγωνιστική σχέση» των δύο μορίων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Nishitani et al., 2001).

Εστιαζόμενοι στη μετάβαση από την G1 στην S και θέλοντας να προσδιορίσουμε μικροσκοπικά, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, την έκφραση των Cdt1 και Geminin, πραγματοποιήσαμε χρώση των κυττάρων έναντι του αναλόγου της θυμιδίνης BrdU (κατόπιν ανάλογης σήμανσής τους), καταλήγοντας στα εξής συμπεράσματα: η πρωτεΐνη Cdt1 απουσιάζει αυστηρά από κύτταρα φάσης S, σε αντίθεση με την Geminin, η οποία δείχνει να συσσωρεύεται σταδιακά με την έναρξη της S. Το πρότυπο έκφρασης αυτό παρατηρήθηκε τόσο στα καρκινικά όσο και στα πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα, μη αφήνοντας κανένα περιθώριο συνέκφρασης των μορίων στο «χρονικό παράθυρο» της G1/S μετάβασης. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τις πρώτες μελέτες για τον παράγοντα Cdt1 που έδειχναν ότι είναι απαραίτητος για την έναρξη αλλά όχι για την επιμήκυνση της αντιγραφής του DNA (Rialland et al., 2002), δικαιολογώντας, έτσι, την απουσία του από κύτταρα της φάσης S. Τέλος, παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης των Cdt1 και Geminin ήταν αρκετά χαμηλότερα στα πρωτογενή κύτταρα σε σύγκριση με κύτταρα προερχόμενα από καρκινικό ιστό, σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Xouri et al., 2004; Ξουρή, 2005, Διδακτορική Διατριβή).

Εστιαζόμενοι, στη συνέχεια, στην πρωτεολυτική ρύθμιση των παραγόντων Cdt1 και Geminin κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, υποβάλαμε ασύγχρονες διαιρούμενες καλλιέργειες τόσο πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών όσο και καρκινικών MCF7 κυττάρων σε επώαση με τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132 (benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-l-leucinal) και παρατηρήσαμε τα εξής: τα πρωτεϊνικά επίπεδα του παράγοντα Cdt1 σταθεροποιήθηκαν σχεδόν στο σύνολο των κυττάρων της καλλιέργειας, ενώ αντίθετα, η Geminin δε φάνηκε να σταθεροποιείται μετά την αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος, διατηρώντας τα ολικά της ποσοστά στον πληθυσμό στα επίπεδα των κυττάρων-μαρτύρων. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν τόσο σε καλλιέργειες ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών όσο και καρκινικών κυττάρων, ενώ έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναδεικνύουν την πρωτεόλυση ως τον βασικό τρόπο ρύθμισης του Cdt1 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων (Nishitani et al., 2001; Sugimoto et al., 2004).

Γνωρίζουμε ότι η ρύθμιση των μορίων Cdt1 και Geminin μπορεί να συμβαίνει τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Karakaidos et al., 2004; Markey et al., 2004; Nishitani et al., 2006; Nishitani et al., 2001; Yoshida et al., 2004), ωστόσο, αρκετά είναι τα πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η ρύθμισή τους κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται, πρωτίστως, σε επίπεδο πρωτεόλυσης: το mRNA τόσο του Cdt1 όσο και της Geminin δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου καρκινικών HeLa κυττάρων, ενώ πλήθος δημοσιεύσεων περιγράφουν την αυστηρή ρύθμιση και των δύο παραγόντων σε επίπεδο πρωτεόλυσης (Bastians et al., 1999; Fujita, 2006; Kulartz et al., 2003; McGarry and Kirschner, 1998; Mizushina et al., 2008a; Mizushina et al., 2008b; Mizushina et al., 2008c; Nishitani et al., 2006; Nishitani et al., 2001; Sugimoto et al., 2008; Sugimoto et al., 2004; Tatsumi et al., 2006; Tsurumi et al., 2005).

Κι αν τα παραπάνω εξηγούν γιατί το Cdt1 παρουσίασε άμεση σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων απουσία πρωτεολυτικής δράσης στα κύτταρα, δε συνέβη το ίδιο με την Geminin. Ένα ερώτημα που προκύπτει εδώ είναι γιατί, σε αντίθεση με το Cdt1, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Geminin δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη του αναστολέα της πρωτεόλυσης MG132, παρότι, όπως αναφέρθηκε, η Geminin αποτελεί γνωστό πρωτεολυτικό στόχο του συμπλόκου APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) κατά τη μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση της μίτωσης (Bastians et al., 1999; McGarry and Kirschner, 1998). Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να έχει τη βάση της στη μερική αναστολή της λειτουργίας του πρωτεοσώματος. Το 20S πρωτεόσωμα (ο πυρήνας του πρωτεοσώματος) είναι μια μεγαλομοριακή-πολυκαταλυτική πρωτεάση με κυλινδρική δομή, η οποία πλαισιώνεται από δύο 19S ρυθμιστικές υπομονάδες, σχηματίζοντας έτσι το 26S πρωτεάσωμα. Τρεις είναι οι κύριες καταλυτικές ενεργότητες ενδοπεπτιδάσης που κατέχει το πρωτεόσωμα και διαμεσολαβούνται από τις 3 καταλυτικές υπομονάδες β1, β2 και β5: οι trypsin-like (TL), chymotrypsin-like (CTL), peptidylglutamylpeptide hydrolase (PGPH), οι οποίες εστιάζονται στον πυρήνα του μορίου (20S) (Groll et al., 1999; Rivett, 1993; Tanaka, 1998; Voges et al., 1999). Θα ήταν ενδιαφέρουσα η υπόθεση κατά την οποία οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin πρωτεολύονται με τη διαμεσολάβηση διαφορετικών καταλυτικών ενεργοτήτων του πρωτεοσώματος, οι οποίες δεν αδρανοποιούνται με τη χρήση ενός και μόνο αναστολέα. Το MG132 (ανάλογο της λευπεπτίνης), αν και θεωρείται ένας γενικευμένος αναστολέας του πρωτεοσώματος και χρησιμοποιείται ευρέως για το σκοπό αυτό, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ενεργότητα της TL και σε πολύ λιγότερο βαθμό της PGPH και της C-TL (Crawford et al., 2006; Tsubuki et al., 1996). Η δοκιμή, ίσως άλλων, ακόμα πιο γενικευμένων αναστολέων του πρωτεοσώματος, πχ της εποξομυκίνης ή του αναστολέα BzLLCOCHO (αναστέλλουν και τις 3 κύριες ενεργότητες του πρωτεοσώματος) (Crawford et al., 2006; Sin et al., 1999), ίσως να βοηθούσε στη διαλεύκανση αυτής της υπόθεσης.

Να σημειωθεί ότι με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή με σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων ύστερα από χρήση του MG132 σε ασύγχρονες κυτταροκαλλιέργειες, αναδείχτηκε η πρωτεολυτική ρύθμιση –διαμεσολαβούμενη από το σύμπλοκο APC/C- του παράγοντα αδειοδότησης Cdc6, στην αρχή της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου (Petersen et al., 2000).

Συγκεντρωτικά, λοιπόν, συμπεραίνουμε ότι το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 και του αναστολέα αυτού, Geminin, διατηρείται σταθερό στα καρκινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά-πρωτογενή κύτταρα τα οποία εξετάστηκαν. Με εξαίρεση τα επίπεδα έκφρασής τους, η ικανότητα των Cdt1 και Geminin εντοπίζονται στον πυρήνα αλλά και να εκφράζονται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου παραμένει σταθερή τόσο στα πρωτογενή όσο και στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός το οποίο αναδεικνύει την κρισιμότητα της συγκεκριμένης ρύθμισης σε κυτταρικό επίπεδο.

3. Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin ρυθμίζονται αρνητικά με τρόπο που δε σχετίζεται με πρωτεόλυση κατά την αναπαραγωγική γήρανση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να εξεταστεί η ρύθμιση των παραγόντων του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin κατά την κυτταρική γήρανση. Η κυτταρική γήρανση αναφέρεται στη μη αναστρέψιμη έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο μετά το πέρας ενός συγκεκριμένου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων σε *in vitro* καλλιέργεια («όριο Hayflick»), με κύριο χαρακτηριστικό την αδυναμία των κυττάρων για περαιτέρω πολλαπλασιασμό (Hayflick and Moorhead, 1961). Διακρίνεται στην αναπαραγωγική γήρανση η οποία ενεργοποιείται λόγω σταδιακής απώλειας των άκρων των χρωμοσωμάτων και στην πρόωρη γήρανση προκαλούμενη από στρες ή SIPS (Stress-Induced Premature Senescence), η οποία προσομοιάζει, τόσο φαινοτυπικά όσο και μοριακά, την αναπαραγωγική γήρανση και στην οποία εισέρχονται τα κύτταρα ύστερα από την επίδραση γενοτοξικών παραγόντων (Chen and Ames, 1994; Dumont et al., 2000; Muller et al., 2001; Zhu et al., 2004). Η γήρανση είναι μία βιώσιμη και ενεργή μεταβολικά κατάσταση, κατά την οποία τα κύτταρα συγκεντρώνουν βασικούς αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (p16^{INK4a}, p21^{WAF1/CIP1}, p53) και υποφωσφορυλιωμένο-ενεργό-Rb, παραβλέποντας τα όποια μιτογόνα ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Blagosklonny, 2003; Campisi, 1996). Ωστόσο, καμία πληροφορία δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστή για τη ρύθμιση μορίων-κλειδιών του αδειοδοτικού μηχανισμού της αντιγραφής του DNA, όπως των Cdt1 και Geminin, κατά τη διαδικασία αυτή.

5. Συζήτηση

Πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού με μάρτυρα στην κυκλίνη A που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη μελέτη του προτύπου έκφρασης των Cdt1 και Geminin σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα αυξανόμενων ηλικιών αποκάλυψαν ότι, αν και οι πρωτεΐνες διατηρούν τη σωστή ενδοκυτταρική τους εντόπιση (πυρηνική) και το σωστό πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (όπως περιγράφηκε στο πρώτο κεφάλαιο), υφίστανται και οι δύο αρνητική ρύθμιση κατά την εξέλιξη του φαινομένου της αναπαραγωγικής γήρανσης. Η πλειοψηφία της καλλιέργειας ινοβλαστών προχωρημένης ηλικίας παρουσίαζε δραματική μείωση των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα νεαρά κύτταρα ή με κύτταρα προερχόμενα από καρκίνο του μαστού (MCF7), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες των επιπέδων έκφρασης των μορίων (εικόνα 5.1).

Η ίδια αρνητική ρύθμιση των μορίων παρατηρήθηκε όταν στο πείραμα αναπαραγωγικής γήρανσης χρησιμοποιήθηκαν τόσο νεαροί πρωτογενείς ινοβλάστες από βιοψίες ούλου φυσιολογικών ατόμων όσο και οι WI-38 άνθρωποι διπλοειδείς ινοβλάστες, η κυτταρική σειρά του Hayflick που χρησιμοποιείται κατά κόρον σε πειράματα κυτταρικής γήρανσης. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η απουσία έκφρασης των Cdt1 και Geminin είναι γενικό χαρακτηριστικό γηρασμένων ανθρώπινων πρωτογενών ινοβλαστών. Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν η δραματική μείωση των παραγόντων Cdt1 και Geminin σε κύτταρα προχωρημένης ηλικίας οφείλεται σε πιθανή ρύθμιση μέσω πρωτεόλυσης.

Εικόνα 5.1: Δραματική πτώση της έκφρασης των παραγόντων Cdt1 και Geminin σε καλλιέργειες γηρασμένων πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών. Από πειράματα ανοσοφθορισμού διαπιστώθηκε ότι το ~80% της καλλιέργειας γηρασμένων ινοβλαστών (PDLs=46) δεν εξέφραζε καμία εκ των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα νεαρά κύτταρα (PDLs=28) στα οποία το αντίστοιχο ποσοστό κυμαινόταν στο 25%. Υποθέτουμε ότι τα μόρια Cdt1 και Geminin ρυθμίζονται αρνητικά, πιθανότατα μέσω μεταγραφής, σε πρωτογενείς ινοβλάστες που γερνούν, εφόσον η παρουσία του MG132 δε συνέβαλε στη σταθεροποίηση των επιπέδων τους στον

5. Συζήτηση

γηρασμένο πληθυσμό. Τα MCF7 καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες της έκφρασης των υπό μελέτη μορίων.

Το γεγονός ότι τα πολύ χαμηλά ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin των αναπαραγωγικά γηρασμένων κυττάρων δεν αυξήθηκαν ύστερα από χρήση του αναστολέα του πρωεασώματος MG132, υποδεικνύει, ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασής τους κατά τη γήρανση δεν οφείλεται σε πρωτεολυτική ρύθμιση των μορίων, αλλά σε ρύθμιση σε άλλο επίπεδο, πχ. μεταγραφικό (εικόνα 5.1).

Είδαμε και προηγουμένως ότι η ρύθμιση των μορίων Cdt1 και Geminin μπορεί να λαμβάνει χώρα τόσο μεταγραφικά (μέσω της δράσης των E2F μεταγραφικών παραγόντων) όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, με την ουβικουϊτινο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση από το 26S πρωτεόσωμα να θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου. Η είσοδος σε κυτταρική γήρανση προϋποθέτει το πέρασμα των κυττάρων από το περιοριστικό σημείο του κυτταρικού κύκλου (restriction point) στην φάση G1, εκεί όπου το κύτταρο αποφασίζει αν θα επιτελέσει ακόμα ένα κύκλο αντιγραφής του DNA ή θα αποσυρθεί από αυτόν (Planas-Silva and Weinberg, 1997). Σήμερα γνωρίζουμε ότι βασικό ρόλο στο σημείο αυτό του κυτταρικού κύκλου διαδραματίζει η ενεργοποίηση του μονοπατιού Rb/E2F, αφού με τη δράση του καθορίζει αν θα λάβει χώρα η μετάβαση από την G1 στην S (Chan et al., 2001; Chellappan et al., 1991; Fattaey et al., 1993) ή η έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο προς καταστάσεις όπως η διαφοροποίηση ή η φάση ηρεμίας G0. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και γνωρίζοντας ότι αφενός οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin αποτελούν γνωστούς μεταγραφικούς στόχους του Rb/E2F μονοπατιού κι αφετέρου ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη ρύθμιση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η δραματική πτώση των επιπέδων έκφρασης των Cdt1 και Geminin που καταγράφηκε στα πειράματα κυτταρικής γήρανσης που πραγματοποιήθηκαν ίσως να οφείλεται στη μεταγραφική ρύθμιση των μορίων μέσω του συγκεκριμένου μοριακού μονοπατιού.

Η πρόταση περί αναστολής της E2F μεταγραφικής ενεργότητας στα γηρασμένα κύτταρα είχε τεθεί και στο παρελθόν (Dimri et al., 1994; Hara et al., 1996; Itahana et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, τα γηρασμένα κύτταρα, σε αντίθεση με κύτταρα σε φάση ηρεμίας, παρουσία μιτογόνων ερεθισμάτων αδυνατούν να εκφράσουν γονίδια της G1/S μετάβασης. Η ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων E2F σε κύτταρα μεγάλης ηλικίας εμφανίζεται μειωμένη. Ο Dimri G. και οι συνεργάτες του έδειξαν συγκεκριμένα ότι ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1, ο βασικότερος εκ των παραγόντων της οικογένειας E2F (ο οποίος ευθύνεται για την αυξομείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των E2Fs κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου), είναι μη ανιχνεύσιμος σε

γηρασμένα κύτταρα, ενώ έδειξαν επίσης ότι τα γηρασμένα κύτταρα στερούνται ενεργών μεταγραφικών συμπλόκων E2F (ικανών, δηλαδή, να προσδένονται σε «E2F-περιοχές» του DNA)(Dimri et al., 1994). Η ταυτόχρονη αύξηση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{CIP1/WAF1} που επίσης καταγράφηκε στα πειράματά μας, τόσο αναπαραγωγικής όσο και πρόωρης γήρανσης προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες υποστηρίζει την υπόθεση αυτή, αφού η συσσώρευση των CKIs (p16^{INK4a}, p19^{INK4b}, p21^{CIP1/WAF1}, p53), ένα γενικό χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων (Campisi, 1996; Campisi, 1997; Chen et al., 2000; Stein et al., 1999; Wei and Sedivy, 1999), θεωρείται υπεύθυνη για την αναστολή των συμπλόκων κινασών/κυκλινών που δρουν στην G1 φάση, την υποφωσφορυλίωση του Rb και την επακόλουθη ενεργοποίησή του. Η ενεργοποίηση του Rb στα κύτταρα αυτά έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της E2F μεταγραφικής ενεργότητας και την παύση του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση (Dimri et al., 1996; Dulic et al., 1993; Herbig et al., 2003; Nasheuer et al., 2002; Stein et al., 1999; Stevaux and Dyson, 2002).

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πολλές περιπτώσεις αρνητικής ρύθμισης πρωτεϊνών του προαντιγραφικού συμπλόκου κατά την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, στις οποίες πιθανά εμπλέκεται το μονοπάτι Rb/E2F, όπως για παράδειγμα των πρωτεϊνών Cdc6 και MCM αλλά και Cdt1 και Geminin κατά την έξοδο προς G0 (Hodgson et al., 2002; Kingsbury et al., 2005; Stoeber et al., 2001; Xouri et al., 2004), των Cdc6, Orc1 και των πρωτεϊνών MCM κατά τα τελικά στάδια της κυτταρικής διαφοροποίησης (Stoeber et al., 2001; Williams et al., 1998), καθώς και των πρωτεϊνών Cdc6 και MCM σε μία μελέτη που περιελάμβανε κύτταρα που εισέρχονται σε αναπαραγωγική γήρανση (Stoeber et al., 2001). Η αρνητική ρύθμιση της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA ενδέχεται να αποτελεί έναν γενικότερο μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται ο αποτελεσματικότερος έλεγχος της μόνιμης εξόδου των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο (Eward et al., 2004; Kingsbury et al., 2005; Madine et al., 2000; Stoeber et al., 2001; Zhu et al., 2004).

Τέλος, η αρνητική ρύθμιση που παρατηρήσαμε για την πρωτεΐνη Geminin κατά τη γήρανση των κυττάρων, έρχεται σε αντίθεση με την παρατηρούμενη συσσώρευση κλασσικών αναστολέων του κύκλου (p21^{CIP1/WAF1}, p16^{INK4a}, p53) στα γηρασμένα κύτταρα. Συμφωνεί, όμως, με την αρνητική ρύθμιση που έχει περιγραφεί για τη Geminin κατά την έξοδο προς άλλες καταστάσεις εκτός κυτταρικού κύκλου, όπως η φάση ηρεμίας και η διαφοροποίηση (Hodgson et al., 2002; Kingsbury et al., 2005; Stoeber et al., 2001; Xouri et al., 2004). Το αποτέλεσμά μας, επομένως, επιβεβαιώνει ότι η Geminin, σε αντίθεση με τους κλασσικούς αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, χαρακτηρίζεται αποκλειστικά διαιρούμενα κύτταρα, ενώ η έξοδος των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο συνοδεύεται από αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της Geminin.

4. Οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin στοχεύονται με διαφορετικό τρόπο κατά την H₂O₂-επαγόμενη πρόωρη κυτταρική γήρανση, πιθανώς μέσω διαφορετικού μοριακού μηχανισμού

Ένας εναλλακτικός τρόπος επαγωγής κυτταρικής γήρανσης αποτέλεσε η πρόκληση οξειδωτικού στρες. Χρησιμοποιώντας ήπιες δόσεις ενός ισχυρού γενotoξικού παράγοντα στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων (υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂), προκαλέσαμε την πρόωρη γήρανση (SIPS) νεαρών ανθρώπινων ινοβλαστών μέσα σε διάστημα μόλις 2 εβδομάδων. Παρατηρήσαμε, κατ'αντιστοιχία με τα πειράματα αναπαραγωγικής γήρανσης που είχαν προηγηθεί, ότι κατά την είσοδο των κυττάρων σε πρόωρη γήρανση τα επίπεδα των πρωτεϊνών Cdt1 και Geminin παρουσιάζουν και πάλι αρνητική ρύθμιση. Η μείωση αυτή συνοδεύεται από άμεση διακοπή του κύκλου και της αντιγραφής του DNA (βάσει των ποσοστών ενσωμάτωσης BrdU του πληθυσμού), αύξηση των CKIs (p21^{CIP1/WAF1}) και της ειδικής για γήρανση χρώσης β-γαλακτοσιδάσης, καθώς και από υποφωσφορυλίωση του Rb, γεγονότα τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως μοριακοί δείκτες (βιομάρτυρες) της αναπαραγωγικής αλλά και της πρόωρα επαγόμενης κυτταρικής γήρανσης (SIPS) (Fripiat et al., 2003; Muller et al., 2001; Toussaint et al., 2002; Toussaint et al., 2000; Zhu et al., 2004). Επιπλέον, παρόμοια αρνητική ρύθμιση παρατηρήθηκε και για έναν ακόμα παράγοντα του προαντιγραφικού συμπλόκου, την πρωτεΐνη MCM7.

Ανάλογη δραματική μείωση της έκφρασης μελών της αντιγραφικής μηχανής κατά την επαγόμενη γήρανση προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες έχει αναφερθεί και κατά το παρελθόν, όπως για παράδειγμα οι περιπτώσεις των Cdc6, MCM2, MCM5 και PCNA (Chen et al., 2004; Zhu et al., 2004). Στην τελευταία εργασία μάλιστα, η απώλεια της έκφρασης των μελών του προαντιγραφικού συμπλόκου αποδόθηκε στην παύση του κυτταρικού κύκλου αυτή καθαυτή, ως αποτέλεσμα απόκρισης των κυττάρων στις βλάβες που προκλήθηκαν στο DNA. Η παύση του κυτταρικού κύκλου αποδόθηκε στη δράση του παράγοντα p53, του οποίου η έκφραση αυξανόταν εντός μιας ώρας από την προσθήκη του H₂O₂, αλλά και στην επακόλουθη αύξηση των CKIs (p21^{CIP1/WAF1} και p16^{INK4a}) (Zhu et al., 2004). Η παύση του κυτταρικού κύκλου σε καταστάσεις συσσώρευσης βλαβών στο DNA διευκολύνει την ενεργοποίηση των κατάλληλων μηχανισμών επιδιόρθωσης με στόχο την αποκατάσταση των βλαβών. Σε περίπτωση που η βλάβη είναι ανεπανόρθωτη ή η γενotoξική απειλή συνεχής, τότε το κύτταρο ενεργοποιεί άλλα μονοπάτια, όπως αυτό της απόπτωσης ή της γήρανσης.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H₂O₂ με σκοπό την επαγωγή πρόωρης γήρανσης (SIPS). Το H₂O₂ είναι γνωστό ότι προκαλεί διπλές θραύσεις στο DNA, από τις πιο σοβαρές και επιζήμιες -για τη γονιδιωματική σταθερότητα του κυττάρου- βλάβες που μπορεί να συμβούν στο DNA. Δείξαμε -με πειράματα κινητικής- ότι η απώλεια έκφρασης του

παράγοντα Cdt1 μετά την προσθήκη του H₂O₂ στο θρεπτικό μέσο είναι μία εξαιρετικά ταχεία διαδικασία (ολοκληρώνεται εντός μόλις 15 min), δοσοεξαρτώμενη, που συνοδεύεται από παύση της αντιγραφής του DNA και ακολουθείται από την υποφωσφορυλίωση του Rb. Επιπλέον, με τη χρήση του MG132 δείξαμε ότι η πτώση αυτή οφείλεται σε άμεση πρωτεόλυσή του μέσω του 26S πρωτεασώματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά της πτώσης του Cdt1 μας παραπέμπουν σε ρύθμισή του μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών αντιμετώπισης της βλάβης (DNA Damage Response ή DDR μονοπάτι). Πρόσφατες εργασίες δείχνουν μία άμεση ουβικουΐτινο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση του Cdt1 σε καταστάσεις πρόκλησης βλαβών στο DNA ύστερα από επίδραση γενοτοξικών παραγόντων, όπως UV και γ-ακτινοβολίας ή χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Η στόχευση αυτή φαίνεται να διαμεσολαβείται από το σύμπλοκο με δράση λιγάσης της ουβικουΐτινης, Cul4/DDB1/Cdt2/PCNA (Kondo et al., 2004; Nishitani et al., 2006; Pearson et al., 2000; Zhu et al., 2004; Α.Σταθοπούλου, Διδακτορική Διατριβή). Ανάλογο παράδειγμα είναι αυτό του Cdc6 (του έταιρου παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής), ο οποίος επίσης στοχεύεται για πρωτεόλυση σε καταστάσεις πρόκλησης βλαβών στο DNA, μέσω δράσης της Cdh1 υπομονάδας του συμπλόκου APC και μιας άλλης E3 λιγάσης της ουβικουΐτινης, της Huwe1 (Blanchard et al., 2002; Duursma and Agami, 2005; Hall et al., 2007).

Στην περίπτωση της Geminin η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης λαμβάνει χώρα σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία από ότι του Cdt1 (1 ημέρα μετά την προσθήκη H₂O₂), αλλά αρκετά νωρίς σε σχέση με την εμφάνιση του γηρασμένου φαινοτύπου στα κύτταρα (μεταξύ ημερών 5-8), όπως αυτός προσδιορίστηκε από την ειδική για γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης και τη μορφολογία των κυττάρων. Η μείωση της έκφρασης της Geminin στην περίπτωση αυτή θα μπορούσε να γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι βλάβες στο DNA προκαλούν, μεταξύ άλλων, υποφωσφορυλίωση του Rb, γεγονός το οποίο καταγράψαμε και στα δικά μας πειράματα (Lan et al., 2002; Linke et al., 1997; Martelli and Livingston, 1999). Η υποφωσφορυλίωση του Rb, με τη σειρά της, ευθύνεται για την αναστολή της E2F μεταγραφικής ενεργότητας, από την οποία γνωρίζουμε ότι εξαρτάται και η έκφραση της Geminin. Πειράματα ελέγχου του mRNA της Geminin ή της δραστηριότητας του υποκινητή της (promoter reporter analysis) θα βοηθούσαν στην πιστοποίηση της μεταγραφικής ρύθμισης του μορίου κατά την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης.

Στο παρακάτω σχήμα συνοψίζονται σχηματικά τα παραπάνω αποτελέσματα αναφορικά με τη ρύθμιση των μορίων Cdt1 και Geminin κατά την κυτταρική γήρανση (εικόνα 5.2).

Εικόνα 5.2: Οι παράγοντες Cdt1 και Geminin υφίστανται αρνητική ρύθμιση νωρίς κατά τη διαδικασία εισόδου των κυττάρων σε κυτταρική γήρανση, τόσο αναπαραγωγική (πάνω), όσο και πρόωρη, επαγόμενη από οξειδωτικό στρες (κάτω). **A:** Στην αναπαραγωγική γήρανση των ινοβλαστών οι πρωτεΐνες Cdt1 και Geminin έδειξαν παρόμοια κινητική μείωσης της έκφρασής τους με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων. **B:** Στη δεύτερη περίπτωση, η ενεργοποίηση των μηχανισμών απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) λόγω της επίδρασης του γενετοξικού παράγοντα H₂O₂, ενδέχεται να οδήγησε στην άμεση στόχευση του παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής, Cdt1, για πρωτεόλυση. Αντίθετα η Geminin παρέμεινε αρχικά σταθερή, κι αργότερα, λίγο πριν την εμφάνιση της ειδικής για γήρανση χρώσης της β-γαλακτοσιδάσης και της υποφωσφορυλίωσης του Rb υπέστη κι εκείνη με τη σειρά της αρνητική ρύθμιση, με τρόπο που ίσως σχετίζεται περισσότερο με τη διαδικασία της γήρανσης αυτής καθυστερημένης.

5. Λειτουργική συσχέτιση των επιπέδων της Geminin με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης

Είδαμε μέχρι τώρα ότι όταν νεαρά κύτταρα γερνούν, είτε ύστερα από την πάροδο πολλών κυτταρικών διαιρέσεων είτε με την πρόκληση οξειδωτικού στρες, σταματούν να εκφράζουν τόσο τον παράγοντα αδειοδότησης Cdt1, όσο και τον αναστολέα αυτού, Geminin (εικόνα 5.2). Τα ερωτήματα που αμέσως γεννήθηκαν ήταν τα εξής:

- Υπάρχει λειτουργική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης Geminin και της εμφάνισης κυτταρικής γήρανσης στον πληθυσμό;
- Είναι αναγκαία προϋπόθεση η πτώση της έκφρασης της Geminin προκειμένου τα κύτταρα να εισέλθουν σε κυτταρική γήρανση ή είναι απλά ένα γεγονός, μεταξύ πολλών άλλων, που συνοδεύει τη διαδικασία της γήρανσης των κυττάρων;

5. Συζήτηση

Όπως περιγράψαμε και προηγουμένως, η αύξηση των αρνητικών ρυθμιστών του κύκλου (p21, p16, p53) σηματοδοτεί την είσοδο των κυττάρων σε γήρανση, αφού με τη δράση τους αναστέλουν την E2F μεταγραφική ενεργότητα και σταματούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Εάν υποθέσουμε ότι η πτώση της Geminin είναι αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, τότε βρίσκεται αρκετά καθοδικά (downstream) στο μονοπάτι κυτταρικής γήρανσης και στην περίπτωση αυτή θα πρέπει μάλλον να θεωρηθεί ως απόρροια της παύσης του κυτταρικού κύκλου και της εισόδου των κυττάρων σε γήρανση. Εάν, όμως, η πτώση της Geminin έχει λειτουργική σημασία για τη διαδικασία της γήρανσης, αναμένεται αυτή να είναι ικανή από μόνη της να ενεργοποιήσει το μονοπάτι κυτταρικής γήρανσης (εικόνα 5.3).

Εικόνα 5.3: Διερεύνηση της λειτουργικής σημασίας της πτώσης της Geminin κατά τη γήρανση. Σχηματικά η υπόθεση εργασίας μας, όπως διαμορφώνεται από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα: κάθετα στο σχήμα με πλήρη μαύρα βέλη περιγράφονται τα βασικά γεγονότα που καταγράφησαν σε όλα τα πειράματα, τόσο

5. Συζήτηση

αναπαραγωγικής όσο και πρόωρης γήρανσης, ενώ με διάστικτα βέλη τα όσα μπορούμε να υποθέσουμε λαμβάνοντας υπόψη βιβλιογραφικά δεδομένα (PDLs=population doublings ή διπλασιασμοί κυττάρων).

Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα που εισήλθαν σε πρόωρη γήρανση ύστερα από την επίδραση οξειδωτικού στρες παρουσίαζαν σε μεγάλο ποσοστό υπερμεγέθεις πυρήνες ύστερα από χρώση του DNA με τη χρωστική DAPI, ένδειξη αυξημένου γονιδιακού υλικού και, ίσως, επαναντιγραφής του DNA (rereplication). Οι υπερμεγέθεις πολυπλοειδικοί πυρήνες έχουν αναφερθεί και στο παρελθόν ως χαρακτηριστικό γηρασμένων ενδοθηλιακών κυττάρων (Wagner et al., 2001), ενώ αρκετές εργασίες μέχρι σήμερα που έχουν συνδέσει την εμφάνιση υπερμεγεθών πυρήνων και φαινομένων επαναντιγραφής του DNA με την απώλεια της έκφρασης της Geminin (βλ. παρακάτω) (Melixetian et al., 2004; Zhu et al., 2004). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θελήσαμε να ελέγξουμε κατά πόσον η διατάραξη των ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών επιπέδων της Geminin συνδέεται λειτουργικά με το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε πειράματα τόσο αποσιώπησης όσο και υπερέκφρασης της Geminin σε κυτταρικά συστήματα ανθρώπου και ποντικού με σκοπό την καταγραφή της πορείας εισόδου των κυττάρων σε γήρανση. Γενετική αποσιώπηση της Geminin (RNAi) σε νεαρούς πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες προκάλεσε την εμφάνιση αξιοσημείωτου ποσοστού γηρασμένων κυττάρων στην καλλιέργεια, ενώ η επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 σε κύτταρα που στερούνταν της έκφρασης της Geminin επιτάχυνε τη διαδικασία γήρανσής τους. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το οξειδωτικό στρες και η απώλεια της έκφρασης της Geminin δρουν συνεργιστικά για την εκδήλωση του φαινομένου της γήρανσης, μέσα από παράλληλα μονοπάτια απόκρισης σε βλάβες του DNA (βλ. παρακάτω). Επίσης, παρακολουθήθηκε η πορεία της *in vitro* γήρανσης αγρίου τύπου εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού (WT MEFs). Παρατηρήθηκε ότι κατά τη διαδικασία αυτή, η οποία ήταν εξαιρετικά ταχεία, η έκφραση της Geminin μειωνόταν κατά πολύ, ήδη από πολύ νωρίς. Εμβρυικοί ινοβλάστες (MEFs), ημίζυγοι για το γονίδιο της Geminin, εμφάνιζαν σαφώς μειωμένη έκφραση της Geminin και γερνούσαν νωρίτερα από τους αντίστοιχους ινοβλάστες αγρίου τύπου. Αντίθετα, η υπερέκφραση της Geminin σε νεαρούς εμβρυικούς ινοβλάστες αγρίου τύπου προκαλούσε μείωση του ποσοστού εμφανιζόμενης γήρανσης, τόσο αναπαραγωγικής, όσο και μετά την επίδραση του H_2O_2 .

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της Geminin σχετίζονται με την εμφάνιση γήρανσης στα κύτταρα, και συγκεκριμένα η μείωση των επιπέδων της Geminin δείχνει έως ένα βαθμό ικανή να σηματοδοτήσει την κυτταρική γήρανση (εικόνα 5.4).

Εικόνα 5.4: Όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου της Geminin κατά την κυτταρική γήρανση ανέδειξαν τη μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Geminin στα κύτταρα ως έναν παράγοντα ικανό να οδηγήσει ένα ποσοστό αυτών σε γήρανση. Το ερώτημα που προκύπτει είναι πώς η απώλεια της έκφρασης της Geminin μπορεί να ενεργοποιήσει καθοδικά (downstream) τα μονοπάτια της κυτταρικής γήρανσης.

6. Επαγωγή γήρανσης ύστερα από απώλεια της έκφρασης της Geminin ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DDR)

Το βασικό επόμενο ερώτημα που προκύπτει είναι μέσω ποιού μοριακού μηχανισμού μπορεί η απώλεια της Geminin να επάγει κυτταρική γήρανση. Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα ίσως να έχει τη βάση της στα γεγονότα που ακολουθούν, σε μοριακό επίπεδο, την πτώση των επιπέδων της Geminin στα κύτταρα. Οι συνέπειες της μείωσης της έκφρασης του βασικού αναστολέα της αδειοδότησης του κυτταρικού κύκλου, Geminin, έχει μελετηθεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους τα τελευταία χρόνια, με την πραγματοποίηση πειραμάτων κυρίως γενετικής αποσίωπησης (RNAi). Η **απώλεια** της έκφρασης της **Geminin** προκαλεί, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο στον οποίο αναφερόμαστε, μερική ή ολική **επαναντιγραφή του DNA** (re-replication ή over-replication), με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αποκτούν υψηλό περιεχόμενο DNA ($>4N$) και να παρουσιάζουν υπερμεγέθεις πυρήνες (Higa et al., 2003; Melixetian et al., 2004; Zhu et al., 2004). Η επαναντιγραφή του DNA (rereplication) προκαλεί **σοβαρές βλάβες** στη διπλή έλικα του **DNA** (Higa et al., 2003;

Melixetian et al., 2004) κι ενεργοποιεί μοριακά μονοπάτια απόκρισης στις βλάβες (DNA damage response ή DDR)(Blow and Dutta, 2005; Davidson et al., 2006; Hook et al., 2007), όπως του ATR/ATM και των κινασών-τελεστών Chk1/Chk2, τα οποία, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, οδηγούν στη σταθεροποίηση του p53 (και συνεπώς και του p21) και την παύση του κυτταρικού κύκλου, συνήθως στο σημείο G2/M (Higa et al., 2003; Lin and Dutta, 2007; Melixetian et al., 2004; Saxena and Dutta, 2003; Zhu et al., 2004). Πρόσφατες εργασίες, μάλιστα, αναδεικνύουν το 9-1-1/Rad17/RFC $\rightarrow$ ATR $\rightarrow$ Chk1 ως το βασικό μονοπάτι σηματοδότησης των βλαβών που δημιουργούνται στο DNA λόγω επαναντιγραφής ύστερα από απώλεια της έκφρασης της Geminin (Lin and Dutta, 2007), ενώ το ίδιο μονοπάτι φαίνεται να ενεργοποιείται σε περίπτωση επαναντιγραφής του DNA ύστερα από υπερέκφραση του παράγοντα Cdt1 (Liu et al., 2007). Στις περιοχές της βλάβης εντοπίζονται φωσφορυλιωμένες μορφές πρωτεϊνών, όπως της τροποποιημένης ιστόνης γ -H2AX (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Rogakou et al., 1998) και προσελκύονται παράγοντες επιδιόρθωσης των βλαβών (Mahbubani et al., 1992). Οι Melixetian M. et al. αναφέρουν, για παράδειγμα, συνεντόπιση της Rad51 (πρωτεΐνης η οποία συμμετέχει στον ομόλογο ανασυνδυασμό για την επιδιόρθωση των διπλών θραύσεων του DNA) και της γ -H2AX -ύστερα από RNAi για την Geminin- στους πυρήνες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων αλλά και πρωτογενών ινοβλαστών (Melixetian et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε, πράγματι, συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης γ -H2AX και αύξηση του μεγέθους και της έντασης της χρώσης DAPI των πυρήνων σε πειράματα γενετικής αποσιώπησης (RNAi) της Geminin στις καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (U2OS, MCF7, HeLa), αλλά όχι και στους πρωτογενείς ινοβλάστες. Έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν ετερογένεια μεταξύ των καταγραφόμενων φαινοτύπων στα διάφορα κυτταρικά συστήματα μετά από γενετική αποσιώπηση της Geminin (Hall et al., 2008; Kulartz et al., 2003; Liu et al., 2007; Vaziri et al., 2003). Το γεγονός ότι οι πρωτογενείς ινοβλάστες δεν παρουσίασαν φαινότυπο επαναντιγραφής του DNA, αύξηση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ -H2AX και υπερμεγέθεις πυρήνες, ίσως υποδηλώνει ένα σημείο ελέγχου των πρωτογενών κυττάρων, το οποίο αντιλαμβάνεται τη διατάραξη της ισορροπίας Cdt1:Geminin, με συνέπεια την παύση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, τα καρκινικά ενδεχομένως να στερούνται του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου, προχωρώντας τον κυτταρικό τους κύκλο, επαναντιγράφοντας το DNA τους (rereplication) και συσσωρεύοντας, έτσι, ακόμα μεγαλύτερες βλάβες σε αυτό. Πράγματι, τα εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά ενσωμάτωσης BrdU που παρατηρήσαμε στα πρωτογενή κύτταρα 48h μετά το RNAi για την Geminin υποδηλώνουν έγκαιρη παύση του κυτταρικού τους κύκλου, σε αντίθεση με τα κύτταρα που είχαν δεχθεί το μη ειδικό-siRNA (siLuciferase), τα οποία συνέχιζαν να διαιρούνται. Περαιτέρω μελέτες σύγκρισης του φαινοτύπου RNAi της Geminin σε καρκινικές και

πρωτογενείς σειρές είναι απαραίτητες προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η παρατήρηση αυτή μπορεί να γενικευτεί, αναδεικνύοντας έναν μηχανισμό με τον οποίο τα φυσιολογικά (μη μετασχηματισμένα) κύτταρα προστατεύονται από φαινόμενα επαναντιγραφής. Διαφοροποίηση της απόκρισης των καρκινικών σε σχέση με τα πρωτογενή φυσιολογικά κύτταρα ύστερα από διατάραξη των επιπέδων μελών του αντιγραφικού συμπλόκου έχει καταγραφεί και στο παρελθόν, όπως για παράδειγμα σε πειράματα υπερέκφρασης της Geminin (Shreeram et al., 2002) και πιο πρόσφατα του Cdt1 (Liu et al., 2007), καθώς και σε πειράματα αποσιώπησης (RNAi) των Cdc6, Mcm2, πρωτεϊνών ORC και Cdc45 (Feng and Kipreos, 2003; Machida et al., 2005). Στηριζόμενοι στα παραπάνω, ο Blow και οι συνεργάτες του σε πρόσφατη δημοσίευσή τους πιθανολογούν την ύπαρξη στα πρωτογενή φυσιολογικά κύτταρα ενός σημείου ελέγχου (licensing checkpoint) κατά την είσοδο στην S, που σχετίζεται με την επάρκεια των συστατικών του προαντιγραφικού συμπλόκου (και κυρίως της πρόσδεσης των πρωτεϊνών MCM στις αφετηρίες). Τα πρωτογενή κύτταρα ανταποκρίνονται στο σημείο ελέγχου, καθυστερώντας ή αναστέλοντας την είσοδό τους σε S, σε αντίθεση με τα μετασχηματισμένα καρκινικά τα οποία εισέρχονται κανονικά σε S και αδυνατώντας να την ολοκληρώσουν, τελικά πεθαίνουν (Blow and Gillespie, 2008).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η **απώλεια της έκφρασης της Geminin**, ανεξάρτητα από το τελικό αποτέλεσμα στα κύτταρα (το οποίο σχετίζεται άρρηκτα με τους μηχανισμούς που διαθέτει ο κάθε κυτταρικός τύπος προκειμένου να την αντιμετωπίσει), αποτελεί μια ιδιαίτερα **στρεσογόνο κατάσταση** η οποία λαμβάνεται από τα κύτταρα ως μια «ενδογενής» **αιτία πρόκλησης βλαβών στο γονιδίωμα**. Πώς, όμως, συνδέονται οι βλάβες που προκαλούνται στο DNA των κυττάρων ύστερα από απώλεια της Geminin με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης;

Κατά τα τελευταία έτη, πολυάριθμες εργασίες υποστηρίζουν ότι η **γήρανση** επάγεται ως **απόκριση** των κυττάρων σε **βλάβες** που προκαλούνται στο DNA. Έχει, συγκεκριμένα, παρατηρηθεί αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης γ-H2AX (δείκτης διπλών θραύσεων) στο DNA κυττάρων ανθρώπου και ποντικού (Chevanne et al., 2003) ή ιστών ποντικού (Singh et al., 2001) με την αύξηση της ηλικίας τους και συνεντόπισή τους με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση διπλών θραύσεων του DNA (Bakkenist et al., 2004; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Sedelnikova et al., 2004). Η ίδια η διαδικασία της αναπαραγωγικής γήρανσης μπορεί να θεωρηθεί ως μια μορφή απόκρισης των κυττάρων σε βλάβες του DNA (von Zglinicki and Martin-Ruiz, 2005). Η συνεχής βράχυνση των τελομερών (Hayflick, 2000; Linskens et al., 1995) έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της ειδικής δομής (uncapping) που συγκρατεί τα άκρα των χρωμοσωμάτων, με συνέπεια, τα «εκτεθειμένα» πλέον άκρα των χρωμοσωμάτων να αναγνωρίζονται από τα κύτταρα ως διπλές θραύσεις του DNA (DSBs)(Griffith et al., 1999). Στα σημεία αυτά αυξάνεται η φωσφορυλίωση της ιστόνης γ-H2AX, το οποίο θα διευκολύνει τη συσσώρευση παραγόντων

επιδιόρθωσης και θα συμβάλει στην ενεργοποίηση καθοδικά των μονοπατιών ATR και ATM, Chk1 και Chk2 (von Zglinicki and Martin-Ruiz, 2005). Τέλος, είναι γνωστό ότι όλες οι περιπτώσεις πρόωρης γήρανσης (Stress Induced Premature Senescence ή SIPS) προκαλούμενης από στρεσογόνους παράγοντες (όπως οξειδωτικά και χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αναστολείς της αντιγραφής, τροποποιητές των ιστονών και της δομής της χρωματίνης κλπ) έχουν κατά κύριο λόγο τη βάση τους στις βλάβες (κυρίως απλές ή διπλές θραύσεις) που αυτοί προκαλούν στη διπλή έλικα του DNA.

Επιπλέον, το καλοκαίρι του 2005 μια σειρά εργασιών απέδειξε την *in vivo* επαγωγή κυτταρικής γήρανσης σε μοντέλα ογκογονιδιακής υπερδιέγερσης (Oncogene-Induced Senescence ή OIS) ανθρώπου ή ποντικού. Η εμφάνιση γήρανσης μαζί με δείκτες απόκρισης σε βλάβες του DNA σε πρώιμες προκαρκινικές αλλοιώσεις και η μετέπειτα απώλεια αυτής όταν οι δυσπλασίες εξελίσσονταν σε κακοήθεις όγκους υποδεικνύει ότι η **γήρανση** επάγεται, πράγματι, *in vivo* στον οργανισμό ως **απόκριση σε βλάβες του DNA**, με την οποία επιχειρείται η παρεμπόδιση της περαιτέρω κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων και επομένως της καρκινογένεσης (Braig et al., 2005; Campisi, 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Sharpless and DePinho, 2005; Zhang et al., 2005). Το σημαντικότερο που προσέθεσαν οι συγκεκριμένες εργασίες εστιαζόμενες στη γήρανση προκαλούμενη από ογκογονιδιακή υπερδιέγερση (OIS), είναι ότι τα μονοπάτια απόκρισης στις βλάβες του DNA δεν είναι απλά το αποτέλεσμα εισόδου των κυττάρων σε γήρανση (όπως αρχικά γνωρίζαμε), αλλά μπορεί να αποτελεί την **αιτία ενεργοποίησης των μονοπατιών της γήρανσης**, ένα είδος «συναγερμού» που ενεργοποιείται προσπαθώντας να σταματήσει τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μάλιστα, πρόσφατη δημοσίευση αναφέρει ότι η ενεργοποίηση και μόνο του ATR-μονοπατιού σηματοδότησης βλαβών του DNA, χωρίς την πραγματική ύπαρξη βλαβών (απλών ή διπλών θραύσεων) στο DNA, αρκεί για την επαγωγή κυτταρικής γήρανσης σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (Toledo et al., 2008).

7. Η πρόκληση «αντιγραφικού στρες» λόγω απουσίας της Geminin, ως πιθανή αιτία ενεργοποίησης των μοριακών μονοπατιών της κυτταρικής γήρανσης

Είδαμε, επομένως, μέχρι τώρα πώς η **απώλεια της έκφρασης της Geminin** συνδέεται με φαινόμενα πρόκλησης **βλαβών στο DNA** λόγω επαγωγής φαινομένων **επαναντιγραφής** και πώς αυτά, με τη σειρά τους, αποτελούν αιτία **εμφάνισης κυτταρικής γήρανσης**. Μέσω ποιού μηχανισμού, όμως, η απώλεια της έκφρασης της Geminin μπορεί προκαλέσει σοβαρές βλάβες στην

διπλή έλικα του DNA, ενεργοποιώντας μονοπάτια απόκρισης σε βλάβες, επάγοντας τελικά κυτταρική γήρανση;

Μια πιθανή απάντηση προκύπτει από τα δεδομένα πρόσφατων δημοσιεύσεων τα οποία προτείνουν ότι αιτία πρόκλησης διπλών θραύσεων του DNA σε ανθρώπινες δυσπλασίες είναι το λεγόμενο **αντιγραφικό στρες** που προκαλείται στα κύτταρα όταν η αντιγραφή δεν πυροδοτείται φυσιολογικά ή δεν εξελίσσεται ομαλά (Bartkova et al., 2005; Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Gorgoulis et al., 2005; Mallette and Ferbeyre, 2007; Venkitaraman, 2005)(ανασκόπηση (Halazonetis et al., 2008)). Αντιγραφικό στρες θεωρείται ότι παράγεται όταν, για οποιδήποτε λόγο, καθυστερήσουν ή σταματήσουν οι διχάλες αντιγραφής (Bartkova et al., 2006; Burhans and Weinberger, 2007; Di Micco et al., 2006; Osborn et al., 2002). Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω έλλειψης πρωτεϊνών της αντιγραφικής ή της προαντιγραφικής μηχανής, λόγω ύπαρξης δευτεροταγών δομών DNA που είναι δύσκολο να αποδιαταχτούν, λόγω επίδρασης χημικών που επιδρούν στη δομή του DNA, λόγω χαμηλού ενδοκυττάριου αποθέματος dNTPs, λόγω χαμηλής ενεργότητας των αφετηριών ή λόγω επαναντιγραφής του DNA (Burhans W. and Weinberger M., 2007). Ένα είδος αντιγραφικού στρες φαίνεται, για παράδειγμα, ότι βιώνουν τα κύτταρα στην περίπτωση ογκογονιδιακής υπερδιέγερσης, με συνέπεια την επαναντιγραφή του DNA (rereplication), τη δημιουργία βλαβών στο DNA, την ενεργοποίηση μηχανισμών απόκρισης στις βλάβες (DDR) και την επαγωγή της γήρανσης (OIS) (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). Τα ογκογονίδια πιστεύεται ότι ενεργοποιούν ανοδικά (upstream) αυξητικά μονοπάτια σηματοδότησης (παρόμοια με του HRAS και της κυκλίνης D) και μέσω ενός αγνώστου σήμερα μηχανισμού, αποτρέπουν την ολική απενεργοποίηση του αδειοδοτικού μηχανισμού κατά τις φάσεις S και G2, με αποτέλεσμα την επαναντιγραφή του DNA (Blow and Gillespie, 2008). Η επαναντιγραφή του DNA (re-replication) αποτελεί αιτία πρόκλησης αντιγραφικού στρες στα κύτταρα, καθώς πιστεύεται ότι προκαλεί ιδιαίτερα πολύπλοκες δομές στο μόριο του DNA (“bubbles within bubbles”), οι οποίες τελικά καταρρέουν, δίνοντας γένεση σε διπλές θραύσεις της έλικας του DNA (“head-to-tail fork collison”)(Blow and Gillespie, 2008; Davidson et al., 2006; Mallette and Ferbeyre, 2007; Venkitaraman, 2005).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω κι εφόσον έχει αναφερθεί ότι η απώλεια της Geminin συσχετίζεται με φαινόμενα επαναντιγραφής και βλάβες του γονιδιώματος, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το αντιγραφικό στρες που γεννάται στα κύτταρα όταν χάνεται η έκφραση της Geminin είναι η αιτία ενεργοποίησης των μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες (DDR) κι εν συνεχεία των μονοπατιών κυτταρικής γήρανσης (εικόνα 5.5).

Εικόνα 5.5: Πιθανό μοντέλο επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης μέσω γένεσης αντιγραφικού στρες στα κύτταρα, ύστερα από απώλεια της έκφρασης της Geminin.

Πειράματα που μπορεί να βοηθήσουν τη διερεύνηση της συσχέτισης της γήρανσης που προκαλείται από απώλεια της Geminin με το αντιγραφικό στρες και την ενεργοποίηση μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες είναι η παρακολούθηση της πορείας εισόδου σε γήρανση πρωτογενών ινοβλαστών οι οποίοι, κατά τη διάρκεια της αποσιώπησης (RNAi) της Geminin, δεν θα έχουν δυνατότητα εισόδου σε φάση S, είτε λόγω έλλειψης αυξητικών παραγόντων (παραμονή σε G0), είτε λόγω παρουσίας αναστολέων της αντιγραφής (πχ. της αφιδικολίνης), ή ινοβλαστών στους οποίους έχουμε ταυτόχρονα προκαλέσει αποσιώπηση βασικών DDR-πρωτεϊνών, όπως της ATM/ATR. Με

αυτόν τον τρόπο θα διαπιστωθεί εάν ο φαινότυπος γήρανσης που εμφανίζεται στα κύτταρα μία εβδομάδα περίπου μετά την παροδική εξάλειψη της Geminin προϋποθέτει έντονη αντιγραφική δραστηριότητα κι ενεργοποίηση μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες (DDR) και, άρα, πιθανότατα να οφείλεται σε αντιγραφικό στρες.

Γιατί, όμως, ένα μέρος μόνο μιας ασύγχρονης καλλιέργειας κυττάρων οδηγείται σε γήρανση ύστερα από αποσιώπηση της Geminin, και όχι μαζικά ο πληθυσμός; Η γήρανση καταρχήν ενός πληθυσμού είναι, γενικότερα, μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από ετερογένεια. Σε αυτό συνηγορούν αποτελέσματα που δείχνουν ότι η μείωση των τελομερών δεν είναι η ίδια, τόσο μεταξύ των χρωμοσωμάτων του ίδιου του κυττάρου όσο και μεταξύ των κυττάρων ενός πληθυσμού (Baird et al., 2003; Lansdorp et al., 1996; Zou et al., 2004). Επιπλέον, η απώλεια της Geminin πιθανώς να μην επηρεάζει ομοιόμορφα όλα τα κύτταρα μιας ασύγχρονης καλλιέργειας, αλλά να επιδρά πολύ περισσότερο σε κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Κάτι παρόμοιο έχει αναφερθεί, για παράδειγμα, για τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 , ο οποίος, δρα συνεργιστικά με την απώλεια της έκφρασης της Geminin, προκαλώντας, κυρίως, διπλές θραύσεις στο DNA. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι κύτταρα που βρίσκονταν σε φάση αντιγραφής του DNA (σε φάση S) ήταν πολύ πιο ευαίσθητα στη επίδραση του H_2O_2 , σε σύγκριση με κύτταρα που βρίσκονταν στις υπόλοιπες φάσεις, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν πολύ πιο έντονες βλάβες στο DNA, τάση για μονιμότερη έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και είσοδο σε πρόωρη κυτταρική γήρανση με έντονη χρώση β-γαλακτοσιδάσης (Zhang et al., 2005). Η πραγματοποίηση πειραμάτων επαγωγής κυτταρικής γήρανσης ύστερα από γενετική αποσιώπηση της Geminin σε συγχρονισμένους νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες, ίσως, να βοηθούσε στη διαλεύκανση της υπόθεσης αυτής.

Αρκετές εργασίες αποδεικνύουν ότι το αντιγραφικό στρες και οι επαγόμενες εξ αυτού βλάβες στο DNA ύστερα από απώλεια της έκφρασης της Geminin οφείλονται στην αυξημένη δραστηριότητα του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 (overlicensing). Αυξημένη δραστηριότητα του Cdt1 σημαίνει **υπεραδειοδότηση** των αφετηριών της αντιγραφής, δηλαδή, επανααδειοδότηση των αφετηριών που έχουν ήδη πυροδοτήσει κατά την τρέχουσα S φάση. Πράγματι, έχουν αναφερθεί φαινόμενα επαναντιγραφής και πρόκληση βλαβών στο DNA σε κύτταρα που υπερεκφράζουν Cdt1 και Cdc6 (Arentson et al., 2002; Bartkova et al., 2006; Liontos et al., 2007; Seo et al., 2005). Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι τα μονοπάτια απόκρισης στις βλάβες του DNA που ενεργοποιούνται αμέσως μετά την υπερέκφραση του Cdt1 είναι παρόμοια με εκείνα που ενεργοποιούνται ύστερα από πτώση της Geminin στα κύτταρα (πχ. γ -H2AX/ATR/Chk1/Chk2) (Lee et al., 2007; Lin and Dutta, 2007; Liontos et al., 2007; Liu et al., 2007). Σε άλλες, μάλιστα, εργασίες αποδεικνύεται η αναστροφή των φαινομένων επαναντιγραφής κι ενεργοποίησης των μονοπατιών απόκρισης σε βλάβες (DDR) που προκαλούνται ύστερα από αποσιώπηση (RNAi) της Geminin ύστερα από

ταυτόχρονη αποσιώπηση του παράγοντα Cdt1 (Higa et al., 2003; Melixetian et al., 2004; Zhu et al., 2004).

Εναλλακτικά, πρόσφατες εργασίες προτείνουν ότι αντιγραφικό στρες μπορεί να παραχθεί στα κύτταρα όχι μόνο λόγω αυξημένης αδειοδότησης των αφετηριών (overlicensing), αλλά και λόγω **υποαδειοδότησης** αυτών (underlicensing) (Blow and Gillespie, 2008; Ibarra et al., 2008). Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η μειωμένη πρόσδεση των πρωτεϊνών MCM στις αφετηρίες της αντιγραφής του DNA μειώνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης επαρκούντος αριθμού αφετηριών της αντιγραφής κατά την προσεχή φάση S, κάτι το οποίο τελικά οδηγεί σε υποαδειοδότηση της αντιγραφής. Η είσοδος σε φάση S με μειωμένο αριθμό αδειοδοτημένων αφετηριών δυσχεραίνει την ομαλή ολοκλήρωση της αντιγραφής, ειδικά σε περιπτώσεις που το κύτταρο αντιμετωπίζει κάποιο αντιγραφικό πρόβλημα με κάποιες από τις ήδη ενεργοποιημένες αφετηρίες αντιγραφής και βρίσκεται στην ανάγκη να «ξυπνήσει» αφετηρίες που βρίσκονταν μέχρι τώρα σε αδράνεια (dormant origins) (Ibarra et al., 2008; Woodward et al., 2006). Επομένως, παράγοντες που ευθύνονται για τη μείωση του αριθμού των αδειοδοτημένων αφετηριών με τις οποίες εισέρχονται τα κύτταρα σε φάση S, μπορούν εν δυνάμει να προκαλέσουν αντιγραφικό στρες, κι επομένως να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς απόκρισης σε βλάβες. Στη συγκεκριμένη εργασία δείξαμε ότι η αποσιώπηση του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 επάγει κυτταρική γήρανση. Μάλιστα, διαπιστώσαμε ότι η απώλεια της έκφρασης του Cdt1 επάγει γήρανση σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τη γήρανση που επάγεται ύστερα από απώλεια της έκφρασης της Geminin. Βάσει των παραπάνω, θα μπορούσε η μείωση της έκφρασης του Cdt1 να επάγει γήρανση μέσω, ίσως, ενός παρόμοιου μηχανισμού πρόκλησης υποαδειοδότησης της αντιγραφής στα κύτταρα κατά τη φάση S.

Διαπιστώνουμε, επομένως, ότι τόσο η απώλεια της Geminin (πρόκληση υπεραδειοδότησης), όσο και του Cdt1 (πρόκληση υποαδειοδότησης) είναι ικανή, μέσω γένεσης αντιγραφικού στρες, να επάγει την ενεργοποίηση των μονοπατιών απόκρισης στις βλάβες (DDR), και τελικά των μονοπατιών της γήρανσης. Το πιο σημαντικό που προκύπτει μέσα από την έννοια του αντιγραφικού στρες και αφορά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, είναι ότι συνδέεται η γήρανση των κυττάρων με την ενεργοποίηση των μονοπατιών απόκρισης στις βλάβες (DDR), και αυτά με τη σειρά τους με τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, για την έναρξη της οποίας γνωρίζουμε, ήδη, ότι καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει ο παράγοντας αδειοδότησης Cdt1 κι ο αναστολέας αυτού, Geminin αλλά και το ενδοκυττάριο ισοζύγιο αυτών (Cdt1:Geminin). Συγκεντρωτικά, λοιπόν, μπορούμε να καταλήξουμε σε ένα πιο γενικευμένο μοντέλο κατά το οποίο γήρανση επάγεται ως αποτέλεσμα αντιγραφικού στρες, τόσο λόγω της υπεραδειοδότησης όσο και της υποαδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, και κατ'επέκταση, ως αποτέλεσμα διατάραξης της ισορροπίας Cdt1:Geminin (εικόνα 5.6). Υπάρχει, άραγε, κάποιος μηχανισμός παρακολούθησης της ισορροπίας

5. Συζήτηση

Cdt1:Geminin στα κύτταρα; Το σίγουρο είναι ότι με τα παραπάνω αναδεικνύεται για ακόμη μια φορά η σημασία της συμβολής του ισοζυγίου Cdt1:Geminin, τόσο στη διασφάλιση της γονιδιωματικής σταθερότητας των κυττάρων, όσο και στην ενεργοποίηση των μονοπατιών αντιμετώπισης της κρίσης σε περιπτώσεις που αυτή διαταράσσεται (Melixetian et al., 2004; Saxena and Dutta, 2005; Zhu et al., 2004).

Εικόνα 5.6: Η διατάραξη του ισοζυγίου Cdt1:Geminin και η απορρύθμιση της διαδικασίας αδειοδότησης που αυτή προκαλεί, φαίνεται πως είναι αρκετή για τη γένεση αντιγραφικού στρες στα κύτταρα. Αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση των μονοπατιών απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) και η επαγωγή κυτταρικής γήρανσης, εφόσον βασικά ογκοκατασταλτικά μονοπάτια διατηρούνται ακεράια (κυρίως τα μονοπάτια του Rb και του p53). Σε αντίθετη περίπτωση, τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης περαιτέρω κακοήθους εξαλλαγής ή/και γονιδιωματικής αστάθειας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, R.T. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, **15**, 2177-2196.
- Agarwal, M.K., Ruhul Amin, A.R. and Agarwal, M.L. (2007) DNA replication licensing factor minichromosome maintenance deficient 5 rescues p53-mediated growth arrest. *Cancer Res*, **67**, 116-121.
- Aggarwal, B.D. and Calvi, B.R. (2004) Chromatin regulates origin activity in Drosophila follicle cells. *Nature*, **430**, 372-376.
- Aigner, S. and Gage, F.H. (2005) A small gem with great powers: geminin keeps neural progenitors thriving. *Dev Cell*, **9**, 171-172.
- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J.C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13742-13747.
- Allsopp, R.C. and Harley, C.B. (1995) Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **219**, 130-136.
- Aparicio, O.M., Weinstein, D.M. and Bell, S.P. (1997) Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, **91**, 59-69.
- Arellano, M. and Moreno, S. (1997) Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 559-573.
- Bakkenist, C.J., Drissi, R., Wu, J., Kastan, M.B. and Dome, J.S. (2004) Disappearance of the telomere dysfunction-induced stress response in fully senescent cells. *Cancer Res*, **64**, 3748-3752.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2004) Initiating cellular stress responses. *Cell*, **118**, 9-17.
- Ballabeni, A., Melixetian, M., Zamponi, R., Masiero, L., Marinoni, F. and Helin, K. (2004) Human geminin promotes pre-RC formation and DNA replication by stabilizing CDT1 in mitosis. *Embo J*, **23**, 3122-3132.
- Barradas, M., Gonos, E.S., Zebedee, Z., Kolettas, E., Petropoulou, C., Delgado, M.D., Leon, J., Hara, E. and Serrano, M. (2002) Identification of a candidate tumor-suppressor gene specifically activated during Ras-induced senescence. *Exp Cell Res*, **273**, 127-137.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J. and Bartek, J. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**, 864-870.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C.L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J. and Gorgoulis, V.G. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, **444**, 633-637.
- Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D. and Pagano, M. (2004) Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature*, **428**, 190-193.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, **78**, 547-581.
- Bell, S.P. and Dutta, A. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, **71**, 333-374.
- Bell, S.P. and Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, **357**, 128-134.
- Benito, J., Martin-Castellanos, C. and Moreno, S. (1998) Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *Embo J*, **17**, 482-497.
- Benjamin, J.M., Torke, S.J., Demeler, B. and McGarry, T.J. (2004) Geminin has dimerization, Cdt1-binding, and destruction domains that are required for biological activity. *J Biol Chem*, **279**, 45957-45968.
- Berthet, C. and Kaldis, P. (2007) Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, **26**, 4469-4477.
- Blagosklonny, M.V. (2003) Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep*, **4**, 358-362.

- Blain, S.W., Scher, H.I., Cordon-Cardo, C. and Koff, A. (2003) p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **3**, 111-115.
- Blow, J.J. and Hodgson, B. (2002) Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol*, **12**, 72-78.
- Blow, J.J. and Laskey, R.A. (1988) A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature*, **332**, 546-548.
- Blow, J.J. and Nurse, P. (1990) A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Cell*, **62**, 855-862.
- Blow, J.J. and Tada, S. (2000) Cell cycle. A new check on issuing the licence. *Nature*, **404**, 560-561.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
- Boos, A., Lee, A., Thompson, D.M. and Kroll, K.L. (2006) Subcellular translocation signals regulate Geminin activity during embryonic development. *Biol Cell*, **98**, 363-375.
- Borden, K.L. (2002) Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol*, **22**, 5259-5269.
- Bowers, J.L., Randell, J.C., Chen, S. and Bell, S.P. (2004) ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell*, **16**, 967-978.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T. and Schmitt, C.A. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, **436**, 660-665.
- Bramhill, D. and Kornberg, A. (1988a) Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, **52**, 743-755.
- Bramhill, D. and Kornberg, A. (1988b) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell*, **54**, 915-918.
- Bravou, V., Nishitani, H., Song, S.Y., Taraviras, S. and Varakis, J. (2005) Expression of the licensing factors, Cdt1 and Geminin, in human colon cancer. *Int J Oncol*, **27**, 1511-1518.
- Brewer, B.J. and Fangman, W.L. (1991) Mapping replication origins in yeast chromosomes. *Bioessays*, **13**, 317-322.
- Broceno, C., Wilkie, S. and Mitnacht, S. (2002) RB activation defect in tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14200-14205.
- Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K. and Nurse, P. (1991) Involvement of p34cdc2 in establishing the dependency of S phase on mitosis. *Nature*, **349**, 388-393.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002a) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002b) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Brunner, D. and Nurse, P. (2000) CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*, **102**, 695-704.
- Burhans, W.C. and Weinberger, M. (2007) DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7545-7556.
- Busuttill, R.A., Dolle, M., Campisi, J. and Vijga, J. (2004) Genomic instability, aging, and cellular senescence. *Ann N Y Acad Sci*, **1019**, 245-255.
- Calvi, B.R., Byrnes, B.A. and Kolpakas, A.J. (2007) Conservation of epigenetic regulation, ORC binding and developmental timing of DNA replication origins in the genus *Drosophila*. *Genetics*, **177**, 1291-1301.
- Campisi, J. (1996) Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell*, **84**, 497-500.
- Campisi, J. (1997) The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*, **33**, 703-709.
- Campisi, J. (2000) Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*, **14**, 183-188.
- Campisi, J. (2001) From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol*, **36**, 607-618.
- Campisi, J. (2005) Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science*, **309**, 886-887.
- Campisi, J., Dimri, G.P., Nehlin, J.O., Testori, A. and Yoshimoto, K. (1996) Coming of age in culture. *Exp Gerontol*, **31**, 7-12.

- Caro, E. and Gutierrez, C. (2007) A green GEM: intriguing analogies with animal geminin. *Trends Cell Biol*, **17**, 580-585.
- Carrel, A. and Lindbergh, C.A. (1935) The Culture of Whole Organs. *Science*, **81**, 621-623.
- Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N. and Winoto, A. (1995) Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol*, **15**, 2682-2688.
- Chang, Q., Li, Y., White, M.F., Fletcher, J.A. and Xiao, S. (2002) Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer Res*, **62**, 6035-6038.
- Chapman, J.W. and Johnston, L.H. (1989) The yeast gene, DBF4, essential for entry into S phase is cell cycle regulated. *Exp Cell Res*, **180**, 419-428.
- Chen, J.H., Ozanne, S.E. and Hales, C.N. (2005) Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1140-1148.
- Chen, J.H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S.E., Williams, G.H. and Hales, C.N. (2004) Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem*, **279**, 49439-49446.
- Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.Y., Wang, J.Y. and Lee, W.H. (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, **58**, 1193-1198.
- Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D. and Ames, B.N. (1998) Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J*, **332** (Pt 1), 43-50.
- Chen, Q.M., Prowse, K.R., Tu, V.C., Purdom, S. and Linskens, M.H. (2001) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res*, **265**, 294-303.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C. and Pandolfi, P.P. (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, **436**, 725-730.
- Cheung, A.L. and Deng, W. (2008) Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front Biosci*, **13**, 2075-2090.
- Chevanne, M., Calдини, R., Tombaccini, D., Mocali, A., Gori, G. and Paoletti, F. (2003) Comparative levels of DNA breaks and sensitivity to oxidative stress in aged and senescent human fibroblasts: a distinctive pattern for centenarians. *Biogerontology*, **4**, 97-104.
- Chiang, Y.J., Nguyen, M.L., Gurunathan, S., Kaminker, P., Tessarollo, L., Campisi, J. and Hodes, R.J. (2006) Generation and characterization of telomere length maintenance in tankyrase 2-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **26**, 2037-2043.
- Chuang, R.Y. and Kelly, T.J. (1999) The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2656-2661.
- Coleman, T.R., Carpenter, P.B. and Dunphy, W.G. (1996) The Xenopus Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell*, **87**, 53-63.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., Beach, D. and Serrano, M. (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, **436**, 642.
- Collado, M. and Serrano, M. (2006) The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer*, **6**, 472-476.
- Courtois-Cox, S., Genther Williams, S.M., Reczek, E.E., Johnson, B.W., McGillicuddy, L.T., Johannessen, C.M., Hollstein, P.E., MacCollin, M. and Cichowski, K. (2006) A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, **10**, 459-472.
- Coverley, D., Wilkinson, H.R. and Downes, C.S. (1996) A protein kinase-dependent block to reinitiation of DNA replication in G2 phase in mammalian cells. *Exp Cell Res*, **225**, 294-300.
- Coverley, D., Wilkinson, H.R., Madine, M.A., Mills, A.D. and Laskey, R.A. (1998) Protein kinase inhibition in G2 causes mammalian Mcm proteins to reassociate with chromatin and restores ability to replicate. *Exp Cell Res*, **238**, 63-69.

- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P. and Jackson, S.P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426**, 194-198.
- Da-Silva, L.F. and Duncker, B.P. (2007) ORC function in late G1: maintaining the license for DNA replication. *Cell Cycle*, **6**, 128-130.
- Danis, E., Brodolin, K., Menut, S., Maiorano, D., Girard-Reydet, C. and Mechali, M. (2004) Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol*, **6**, 721-730.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, **54**, 275-283.
- de la Fuente, R., Abad, J.L., Garcia-Castro, J., Fernandez-Miguel, G., Petriz, J., Rubio, D., Vicario-Abejon, C., Guillen, P., Gonzalez, M.A. and Bernad, A. (2004) Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Exp Cell Res*, **297**, 313-328.
- Del Bene, F., Tessmar-Raible, K. and Wittbrodt, J. (2004) Direct interaction of geminin and Six3 in eye development. *Nature*, **427**, 745-749.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A. and Antequera, F. (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J*, **17**, 2426-2435.
- DePamphilis, M.L. (1993a) Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. *Annu Rev Biochem*, **62**, 29-63.
- DePamphilis, M.L. (1993b) Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 434-441.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G. and d'Adda di Fagagna, F. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, **444**, 638-642.
- Diffley, J.F. (1996) Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev*, **10**, 2819-2830.
- Diffley, J.F. (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol*, **14**, R778-786.
- Diffley, J.F. and Cocker, J.H. (1992) Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature*, **357**, 169-172.
- Dimitrova, D.S., Prokhorova, T.A., Blow, J.J., Todorov, I.T. and Gilbert, D.M. (2002) Mammalian nuclei become licensed for DNA replication during late telophase. *J Cell Sci*, **115**, 51-59.
- Dimitrova, D.S. and Gilbert, D.M. (1999) The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell*, **4**, 983-993.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- Donovan, S. and Diffley, J.F. (1996) Replication origins in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 203-207.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L.S. and Diffley, J.F. (1997) Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5611-5616.
- Duan, J., Duan, J., Zhang, Z. and Tong, T. (2005) Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H2O2 involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 1407-1420.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, **7**, 379-387.
- Dudderidge, T.J., Stoeber, K., Loddo, M., Atkinson, G., Fanshawe, T., Griffiths, D.F. and Williams, G.H. (2005) Mcm2, Geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **11**, 2510-2517.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 457-467.

6. Βιβλιογραφία

- Dulic, V., Drullinger, L.F., Lees, E., Reed, S.I. and Stein, G.H. (1993) Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11034-11038.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023.
- Dumaz, N. and Meek, D.W. (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J*, **18**, 7002-7010.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-373.
- Dutta, A., Chandra, R., Leiter, L.M. and Lester, S. (1995) Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5386-5390.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elmore, L.W., Rehder, C.W., Di, X., McChesney, P.A., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, D.A. and Holt, S.E. (2002) Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem*, **277**, 35509-35515.
- Erzberger, J.P., Mott, M.L. and Berger, J.M. (2006) Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 676-683.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, **33**, 389-396.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J. and Lukas, J. (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, **410**, 842-847.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J. and Bartek, J. (2002) The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet*, **30**, 290-294.
- Feldser, D.M., Hackett, J.A. and Greider, C.W. (2003) Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer*, **3**, 623-627.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. and Lowe, S.W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*, **14**, 2015-2027.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Forsyth, N.R., Evans, A.P., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2003) Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell*, **2**, 235-243.
- Frampton, G., Moriya, S., Pearson, J.D., Isenberg, D.A., Ward, F.J., Smith, T.A., Panayiotou, A., Staines, N.A. and Murphy, J.J. (2000) Identification of candidate endothelial cell autoantigens in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell autoantigen. *Rheumatology (Oxford)*, **39**, 1114-1120.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. and Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**, 643-646.
- Fripiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 2531-2537.
- Fujita, M. (2006) Cdt1 revisited: complex and tight regulation during the cell cycle and consequences of deregulation in mammalian cells. *Cell Div*, **1**, 22.

- Fujita, M., Urano, T., Horie, K., Ikeda, K., Tsukui, T., Fukuoka, H., Tsutsumi, O., Ouchi, Y. and Inoue, S. (2002) Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **299**, 222-228.
- Fujita, M., Yamada, C., Tsurumi, T., Hanaoka, F., Matsuzawa, K. and Inagaki, M. (1998) Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase. *J Biol Chem*, **273**, 17095-17101.
- Fung, Y.K., Murphree, A.L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S.H. and Benedict, W.F. (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, **236**, 1657-1661.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D. and Labib, K. (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol*, **8**, 358-366.
- Garcia, V., Furuya, K. and Carr, A.M. (2005) Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1227-1239.
- Ghebranious, N. and Donehower, L.A. (1998) Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*, **17**, 3385-3400.
- Gil, J. and Peters, G. (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 667-677.
- Gillespie, P.J., Li, A. and Blow, J.J. (2001) Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins. *BMC Biochem*, **2**, 15.
- Gisselsson, D., Jonson, T., Petersen, A., Strombeck, B., Dal Cin, P., Hoglund, M., Mitelman, F., Mertens, F. and Mandahl, N. (2001) Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12683-12688.
- Gisselsson, D., Lv, M., Tsao, S.W., Man, C., Jin, C., Hoglund, M., Kwong, Y.L. and Jin, Y. (2005) Telomere-mediated mitotic disturbances in immortalized ovarian epithelial cells reproduce chromosomal losses and breakpoints from ovarian carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 22-33.
- Gonos, E.S. (1998) Expression of the growth arrest specific genes in rat embryonic fibroblasts undergoing senescence. *Ann N Y Acad Sci*, **851**, 466-469.
- Gonzalez, M.A., Tachibana, K.E., Adams, D.J., van der Weyden, L., Hemberger, M., Coleman, N., Bradley, A. and Laskey, R.A. (2006) Geminin is essential to prevent endoreduplication and to form pluripotent cells during mammalian development. *Genes Dev*, **20**, 1880-1884.
- Gonzalez, M.A., Tachibana, K.E., Chin, S.F., Callagy, G., Madine, M.A., Vowler, S.L., Pinder, S.E., Laskey, R.A. and Coleman, N. (2004) Geminin predicts adverse clinical outcome in breast cancer by reflecting cell-cycle progression. *J Pathol*, **204**, 121-130.
- Gopalakrishnan, V., Simancek, P., Houchens, C., Snaith, H.A., Frattini, M.G., Sazer, S. and Kelly, T.J. (2001) Redundant control of rereplication in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13114-13119.
- Gorbunova, V. and Seluanov, A. (2005) Making ends meet in old age: DSB repair and aging. *Mech Ageing Dev*, **126**, 621-628.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C. and Halazonetis, T.D. (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, **434**, 907-913.
- Graves, P.R., Yu, L., Schwarz, J.K., Gales, J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M. and Piwnicka-Worms, H. (2000) The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem*, **275**, 5600-5605.
- Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, **366**, 707-710.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G. and Xiong, Y. (1994) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*, **8**, 2939-2952.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002) Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, **347**, 1593-1603.

6. Βιβλιογραφία

- Hamlin, J.L. and Dijkwel, P.A. (1995) On the nature of replication origins in higher eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 153-161.
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S. and Peters, G. (1996) Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, **16**, 859-867.
- Hara, K., Nakayama, K.I. and Nakayama, K. (2006) Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos. *Genes Cells*, **11**, 1281-1293.
- Harbour, J.W. and Dean, D.C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, **14**, 2393-2409.
- Harman, D. (2001) Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*, **928**, 1-21.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R. and Reid, B.J. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, **183**, 46-51.
- Harvey, C.B., Wang, Y., Darmoul, D., Phillips, A., Mantei, N. and Swallow, D.M. (1996) Characterisation of a human homologue of a yeast cell division cycle gene, MCM6, located adjacent to the 5' end of the lactase gene on chromosome 2q21. *FEBS Lett*, **398**, 135-140.
- Harvey, D.M. and Levine, A.J. (1991) p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev*, **5**, 2375-2385.
- Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, **37**, 614-636.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621.
- Hayles, J., Fisher, D., Woollard, A. and Nurse, P. (1994) Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell*, **78**, 813-822.
- Helin, K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 28-35.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J. and Sedivy, J.M. (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, **14**, 501-513.
- Hereford, L.M. and Hartwell, J.H. (1974) Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis. *J Mol Biol*, **85**, 445-461.
- Hershko, A., Ganoth, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L.H., Luca, F.C., Ruderman, J.V. and Eytan, E. (1994) Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J Biol Chem*, **269**, 4940-4946.
- Higa, L.A., Mihaylov, I.S., Banks, D.P., Zheng, J. and Zhang, H. (2003) Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat Cell Biol*, **5**, 1008-1015.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, **15**, 2672-2681.
- Hodgson, B., Li, A., Tada, S. and Blow, J.J. (2002) Geminin becomes activated as an inhibitor of Cdt1/RLF-B following nuclear import. *Curr Biol*, **12**, 678-683.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Howard and Pelc. (1953).
- Hsu, J.Y., Reimann, J.D., Sorensen, C.S., Lukas, J. and Jackson, P.K. (2002) E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol*, **4**, 358-366.
- Huang, X., Tanaka, T., Kurose, A., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (2006) Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents is cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen species. *Int J Oncol*, **29**, 495-501.
- Hunt, T., Luca, F.C. and Ruderman, J.V. (1992) The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol*, **116**, 707-724.

6. Βιβλιογραφία

- Iizuka, M., Matsui, T., Takisawa, H. and Smith, M.M. (2006) Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol*, **26**, 1098-1108.
- Jackson, A.L., Pahl, P.M., Harrison, K., Rosamond, J. and Sclafani, R.A. (1993) Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 2899-2908.
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A. and van Lohuizen, M. (1999) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, **397**, 164-168.
- Jares, P. and Blow, J.J. (2000) Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. *Genes Dev*, **14**, 1528-1540.
- Johnson, M., Dimitrov, D., Vojta, P.J., Barrett, J.C., Noda, A., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1994) Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells. *Mol Carcinog*, **11**, 59-64.
- Johnston, L.H., Masai, H. and Sugino, A. (1999) First the CDKs, now the DDKs. *Trends Cell Biol*, **9**, 249-252.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G. and Sherr, C.J. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, **91**, 649-659.
- Kanemaki, M. and Labib, K. (2006) Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *Embo J*, **25**, 1753-1763.
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A. and Labib, K. (2003) Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature*, **423**, 720-724.
- Katayama, T. (2001) Feedback controls restrain the initiation of Escherichia coli chromosomal replication. *Mol Microbiol*, **41**, 9-17.
- Kawanishi, S. and Oikawa, S. (2004) Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*, **1019**, 278-284.
- Keith Wilson and John Walker. Principles and Techniques of Practical Biochemistry”,. *5th Edition*, Cambridge University Press.
- Kennedy, B.K., Barbie, D.A., Classon, M., Dyson, N. and Harlow, E. (2000) Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev*, **14**, 2855-2868.
- Kerns, S.L., Torke, S.J., Benjamin, J.M. and McGarry, T.J. (2007) Geminin prevents rereplication during xenopus development. *J Biol Chem*, **282**, 5514-5521.
- Kikuchi, J., Furukawa, Y., Iwase, S., Terui, Y., Nakamura, M., Kitagawa, S., Kitagawa, M., Komatsu, N. and Miura, Y. (1997) Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood*, **89**, 3980-3990.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, **11**, 895-904.
- Kim, S.T., Xu, B. and Kastan, M.B. (2002) Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev*, **16**, 560-570.
- Kim, W.Y. and Sharpless, N.E. (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, **127**, 265-275.
- King, R.W., Jackson, P.K. and Kirschner, M.W. (1994) Mitosis in transition. *Cell*, **79**, 563-571.
- Kingsbury, S.R., Loddo, M., Fanshawe, T., Obermann, E.C., Prevost, A.T., Stoeber, K. and Williams, G.H. (2005) Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells. *Exp Cell Res*, **309**, 56-67.
- Kitada, K., Johnston, L.H., Sugino, T. and Sugino, A. (1992) Temperature-sensitive cdc7 mutations of Saccharomyces cerevisiae are suppressed by the DBF4 gene, which is required for the G1/S cell cycle transition. *Genetics*, **131**, 21-29.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.

- Kreitz, S., Ritz, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001) The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem*, **276**, 6337-6342.
- Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M. and Kirschner, M.W. (1998) Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development*, **125**, 3247-3258.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y. and Campisi, J. (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12072-12077.
- Kubota, Y., Takase, Y., Komori, Y., Hashimoto, Y., Arata, T., Kamimura, Y., Araki, H. and Takisawa, H. (2003) A novel ring-like complex of Xenopus proteins essential for the initiation of DNA replication. *Genes Dev*, **17**, 1141-1152.
- Kulartz, M., Kreitz, S., Hiller, E., Damoc, E.C., Przybylski, M. and Knippers, R. (2003) Expression and phosphorylation of the replication regulator protein geminin. *Biochem Biophys Res Commun*, **305**, 412-420.
- Kulkarni, A.A., Loddo, M., Leo, E., Rashid, M., Eward, K.L., Fanshawe, T.R., Butcher, J., Frost, A., Ledermann, J.A., Williams, G.H. and Stoeber, K. (2007) DNA replication licensing factors and aurora kinases are linked to aneuploidy and clinical outcome in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, **13**, 6153-6161.
- Kurz, T., Leake, A., Von Zglinicki, T. and Brunk, U.T. (2004) Relocalized redox-active lysosomal iron is an important mediator of oxidative-stress-induced DNA damage. *Biochem J*, **378**, 1039-1045.
- Kuschak, T.I., Kuschak, B.C., Taylor, C.L., Wright, J.A., Wiener, F. and Mai, S. (2002) c-Myc initiates illegitimate replication of the ribonucleotide reductase R2 gene. *Oncogene*, **21**, 909-920.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Lavia, P. and Jansen-Durr, P. (1999) E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays*, **21**, 221-230.
- Lazzerini Denchi, E., Attwooll, C., Pasini, D. and Helin, K. (2005) Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol Cell Biol*, **25**, 2660-2672.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, **308**, 551-554.
- Lee, J.K. and Hurwitz, J. (2000) Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **275**, 18871-18878.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, **327**, 31-35.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M.R., Kihara, M., Sugino, A. and Tye, B.K. (1997) Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev*, **11**, 3365-3374.
- Lei, M. and Tye, B.K. (2001) Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*, **114**, 1447-1454.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S. and Nevins, J.R. (1998) E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*, **12**, 2120-2130.
- Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W. and Harley, C.B. (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*, **225**, 951-960.
- Li, A. and Blow, J.J. (2004) Negative regulation of geminin by CDK-dependent ubiquitination controls replication licensing. *Cell Cycle*, **3**, 443-445.
- Li, C.J. and DePamphilis, M.L. (2002) Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol*, **22**, 105-116.
- Li, X. and Rosenfeld, M.G. (2004) Transcription: origins of licensing control. *Nature*, **427**, 687-688.

- Lin, J.J. and Dutta, A. (2007) ATR pathway is the primary pathway for activating G2/M checkpoint induction after re-replication. *J Biol Chem*, **282**, 30357-30362.
- Linskens, M.H., Harley, C.B., West, M.D., Campisi, J. and Hayflick, L. (1995) Replicative senescence and cell death. *Science*, **267**, 17.
- Lohka, M.J. (1998) Nuclear responses to MPF activation and inactivation in *Xenopus* oocytes and early embryos. *Biol Cell*, **90**, 591-599.
- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M. and DeCarprio, J.A. (1993) Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 367-372.
- Ludlow, J.W., Shon, J., Pipas, J.M., Livingston, D.M. and DeCaprio, J.A. (1990) The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell*, **60**, 387-396.
- Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, **18**, 753-761.
- Luo, L., Uerlings, Y., Happel, N., Asli, N.S., Knoetgen, H. and Kessel, M. (2007) Regulation of geminin functions by cell cycle-dependent nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol*, **27**, 4737-4744.
- Luo, L., Yang, X., Takihara, Y., Knoetgen, H. and Kessel, M. (2004) The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature*, **427**, 749-753.
- Lygerou, Z. and Nurse, P. (2000) Cell cycle. License withheld--geminin blocks DNA replication. *Science*, **290**, 2271-2273.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, **288**, 1425-1429.
- Mantamadiotis, T., Taraviras, S., Tronche, F. and Schutz, G. (1998) PCR-based strategy for genotyping mice and ES cells harboring loxP sites. *Biotechniques*, **25**, 968-970, 972.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, **255**, 817-823.
- Markey, M., Siddiqui, H. and Knudsen, E.S. (2004) Geminin is targeted for repression by the retinoblastoma tumor suppressor pathway through intragenic E2F sites. *J Biol Chem*, **279**, 29255-29262.
- Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-185.
- Martin, G.M. (1985) Genetics and aging; the Werner syndrome as a segmental progeroid syndrome. *Adv Exp Med Biol*, **190**, 161-170.
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K. and Arai, K. (2000) Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdk5 and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 by Cdk5. *J Biol Chem*, **275**, 29042-29052.
- Massague, J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, **432**, 298-306.
- Masuda, T., Mimura, S. and Takisawa, H. (2003) CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45. *Genes Cells*, **8**, 145-161.
- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*, **177**, 129-145.
- Matsuno, K., Kumano, M., Kubota, Y., Hashimoto, Y. and Takisawa, H. (2006) The N-terminal noncatalytic region of *Xenopus* RecQ4 is required for chromatin binding of DNA polymerase alpha in the initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol*, **26**, 4843-4852.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*, **9**, 650-662.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. and Elledge, S.J. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10389-10394.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 2066-2076.

- McGarry, T.J. and Kirschner, M.W. (1998) Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*, **93**, 1043-1053.
- McGarry, T.J. (2002) Geminin deficiency causes a Chk1-dependent G2 arrest in *Xenopus*. *Mol Biol Cell*, **13**, 3662-3671.
- McGarry, T.J. (2005) Measurement of geminin activity in *Xenopus* egg extracts. *Methods Mol Biol*, **296**, 263-278.
- Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J. and Helin, K. (2004) Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J Cell Biol*, **165**, 473-482.
- Mendez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.Y., Hidaka, M., Tansey, W.P. and Stillman, B. (2002) Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. *Mol Cell*, **9**, 481-491.
- Meyerson, M. and Harlow, E. (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*, **14**, 2077-2086.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J. and Peeper, D.S. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, **436**, 720-724.
- Mimura, S. and Takisawa, H. (1998) *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J*, **17**, 5699-5707.
- Minshull, J., Murray, A., Colman, A. and Hunt, T. (1991) *Xenopus* oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol*, **114**, 767-772.
- Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J.V., Wu, M. and Hunt, T. (1989) The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl*, **12**, 77-97.
- Miyake, S. and Yamashita, S. (1998) Identification of *sna41* gene, which is the suppressor of *nda4* mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*, **3**, 157-166.
- Mizushima, T., Takahashi, N. and Stillman, B. (2000) Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro. *Genes Dev*, **14**, 1631-1641.
- Montanari, M., Boninsegna, A., Faraglia, B., Coco, C., Giordano, A., Cittadini, A. and Sgambato, A. (2005) Increased expression of geminin stimulates the growth of mammary epithelial cells and is a frequent event in human tumors. *J Cell Physiol*, **202**, 215-222.
- Montanari, M., Macaluso, M., Cittadini, A. and Giordano, A. (2006) Role of geminin: from normal control of DNA replication to cancer formation and progression? *Cell Death Differ*, **13**, 1052-1056.
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**, 131-134.
- Morse, L., Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y. and Chen-Kiang, S. (1997) Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity*, **6**, 47-56.
- Moser, B.A. and Russell, P. (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 631-636.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. and Wu, J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6622-6626.
- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 267-285.
- Murray, A.W., Solomon, M.J. and Kirschner, M.W. (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*, **339**, 280-286.
- Nakajima, R. and Masukata, H. (2002) SpSld3 is required for loading and maintenance of SpCdc45 on chromatin in DNA replication in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **13**, 1462-1472.
- Nakayama, K.I. and Nakayama, K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 369-381.
- Nakayasu, H. and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol*, **108**, 1-11.

- Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P. and Lowe, S.W. (2006) A novel role for high-mobility group proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*, **126**, 503-514.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. and Lowe, S.W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, **113**, 703-716.
- Nedelcheva, M.N., Roguev, A., Dolapchiev, L.B., Shevchenko, A., Taskov, H.B., Shevchenko, A., Stewart, A.F. and Stoyanov, S.S. (2005) Uncoupling of unwinding from DNA synthesis implies regulation of MCM helicase by Tof1/Mrc1/Csm3 checkpoint complex. *J Mol Biol*, **347**, 509-521.
- Nevins, J.R. (1998) Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ*, **9**, 585-593.
- Niida, H. and Nakanishi, M. (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, **21**, 3-9.
- Nishitani, H., Lygerou, Z. and Nishimoto, T. (2004) Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *J Biol Chem*, **279**, 30807-30816.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P. (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature*, **404**, 625-628.
- Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., Lygerou, Z. and Nishimoto, T. (2006) Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *Embo J*, **25**, 1126-1136.
- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z. and Nishimoto, T. (2001) The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem*, **276**, 44905-44911.
- Nurse, P. (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, **256**, 547-551.
- Nurse, P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, **100**, 71-78.
- Ogryzko, V.V., Hirai, T.H., Russanova, V.R., Barbie, D.A. and Howard, B.H. (1996) Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol*, **16**, 5210-5218.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. and Pagano, M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, **15**, 2612-2624.
- Oikawa, S. and Kawanishi, S. (1999) Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett*, **453**, 365-368.
- O'Keefe, R.T., Henderson, S.C. and Spector, D.L. (1992) Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol*, **116**, 1095-1110.
- Okorokov, A.L., Orlova, E.V., Kingsbury, S.R., Bagneris, C., Gohlke, U., Williams, G.H. and Stoeber, K. (2004) Molecular structure of human geminin. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1021-1022.
- Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M. and Masukata, H. (1999) Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol Cell Biol*, **19**, 6699-6709.
- Olovnikov, A.M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*, **41**, 181-190.
- Osaka, F., Seino, H., Seno, T. and Yamao, F. (1997) A ubiquitin-conjugating enzyme in fission yeast that is essential for the onset of anaphase in mitosis. *Mol Cell Biol*, **17**, 3388-3397.
- Owens, J.C., Detweiler, C.S. and Li, J.J. (1997) CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12521-12526.
- Pacek, M. and Walter, J.C. (2004) A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *Embo J*, **23**, 3667-3676.

- Painter, R.B. and Young, B.R. (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 7315-7317.
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P. and Peters, G. (1997) Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene*, **15**, 495-503.
- Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J. and Karnitz, L. (2004) Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1009-1014.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S. and Campisi, J. (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*, **5**, 741-747.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S. and Piwnicka-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**, 1501-1505.
- Peng, J., Marshall, N.F. and Price, D.H. (1998) Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J Biol Chem*, **273**, 13855-13860.
- Perkins, G., Drury, L.S. and Diffley, J.F. (2001) Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis. *Embo J*, **20**, 4836-4845.
- Petersen, B.O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E.R., Melixetian, M., Lazzerini Denchi, E., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J.M. and Helin, K. (2000) Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev*, **14**, 2330-2343.
- Petrini, J.H. and Stracker, T.H. (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol*, **13**, 458-462.
- Petropoulou, C., Kotantaki, P., Karamitros, D. and Taraviras, S. (2008) Cdt1 and Geminin in cancer: markers or triggers of malignant transformation? *Front Biosci*, **13**, 4485-4494.
- Plug-DeMaggio, A.W., Sundsvold, T., Wurscher, M.A., Koop, J.I., Klingelutz, A.J. and McDougall, J.K. (2004) Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6. *Oncogene*, **23**, 3561-3571.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. and Koff, A. (1994a) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, **8**, 9-22.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. and Massague, J. (1994b) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, **78**, 59-66.
- Quantification strategies in real-time PCR by Michael W. Pfaffl, A.-Z.o.q.P., Chapter 3, Editor: S.A. Bustin, International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA.
- Quinlan, M.P., Whyte, P. and Grodzicker, T. (1988) Growth factor induction by the adenovirus type 5 E1A 12S protein is required for immortalization of primary epithelial cells. *Mol Cell Biol*, **8**, 3191-3203.
- Quinn, L.M., Herr, A., McGarry, T.J. and Richardson, H. (2001) The Drosophila Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis. *Genes Dev*, **15**, 2741-2754.
- Ramsey, M.J., Moore, D.H., 2nd, Briner, J.F., Lee, D.A., Olsen, L., Senft, J.R. and Tucker, J.D. (1995) The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutat Res*, **338**, 95-106.
- Ran, Q. and Pereira-Smith, O.M. (2000) Genetic approaches to the study of replicative senescence. *Exp Gerontol*, **35**, 7-13.
- Randell, J.C., Bowers, J.L., Rodriguez, H.K. and Bell, S.P. (2006) Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell*, **21**, 29-39.
- Rao, H., Marahrens, Y. and Stillman, B. (1994) Functional conservation of multiple elements in yeast chromosomal replicators. *Mol Cell Biol*, **14**, 7643-7651.
- Rao, P.N. and Johnson, R.T. (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*, **225**, 159-164.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 162-169.

- Reynisdottir, I. and Massague, J. (1997) The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev*, **11**, 492-503.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H. and Lees, E. (1996) Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene*, **12**, 2631-2640.
- Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K. and Albiez, M. (1989) Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res*, **180**, 84-93.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.
- Salabat, M.R., Melstrom, L.G., Strouch, M.J., Ding, X.Z., Milam, B.M., Ujiki, M.B., Chen, C., Pelling, J.C., Rao, S., Grippo, P.J., McGarry, T.J. and Bentrem, D.J. (2008) Geminin is overexpressed in human pancreatic cancer and downregulated by the bioflavonoid apigenin in pancreatic cancer cell lines. *Mol Carcinog*.
- Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E. and Chodosh, L.A. (2007) Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, **9**, 493-505.
- Sasaki, M., Kumazaki, T., Takano, H., Nishiyama, M. and Mitsui, Y. (2001) Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev*, **122**, 1695-1706.
- Saxena, S. and Dutta, A. (2005) Geminin-Cdt1 balance is critical for genetic stability. *Mutat Res*, **569**, 111-121.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D.C. and Rabinovitch, P.S. (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, **308**, 1909-1911.
- Sebastian, T., Malik, R., Thomas, S., Sage, J. and Johnson, P.F. (2005) C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence. *Embo J*, **24**, 3301-3312.
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M. and Barrett, J.C. (2004) Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, **6**, 168-170.
- Sellers, W.R., Rodgers, J.W. and Kaelin, W.G., Jr. (1995) A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11544-11548.
- Sample, J.W., Da-Silva, L.F., Jarvis, E.J., Ah-Kee, J., Al-Attar, H., Kummer, L., Heikkila, J.J., Pasero, P. and Duncker, B.P. (2006) An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *Embo J*, **25**, 5150-5158.
- Senga, T., Sivaprasad, U., Zhu, W., Park, J.H., Arias, E.E., Walter, J.C. and Dutta, A. (2006) PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J Biol Chem*, **281**, 6246-6252.
- Seo, S., Richardson, G.A. and Kroll, K.L. (2005) The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development*, **132**, 105-115.
- Serrano, M. (1997) The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*, **237**, 7-13.
- Serrano, M., Hannon, G.J. and Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**, 704-707.
- Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A.C. and Land, H. (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**, 5588-5597.
- Sharpless, N.E. and DePinho, R.A. (1999) The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 22-30.
- Shiloh, Y. (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 71-77.
- Shreeram, S., Sparks, A., Lane, D.P. and Blow, J.J. (2002) Cell type-specific responses of human cells to inhibition of replication licensing. *Oncogene*, **21**, 6624-6632.

- Shrestha, P., Saito, T., Hama, S., Arifin, M.T., Kajiwar, Y., Yamasaki, F., Hidaka, T., Sugiyama, K. and Kurisu, K. (2007) Geminin: a good prognostic factor in high-grade astrocytic brain tumors. *Cancer*, **109**, 949-956.
- Sible, J.C., Erikson, E., Hendrickson, M., Maller, J.L. and Gautier, J. (1998) Developmental regulation of MCM replication factors in *Xenopus laevis*. *Curr Biol*, **8**, 347-350.
- Singh, N.P., Ogburn, C.E., Wolf, N.S., van Belle, G. and Martin, G.M. (2001) DNA double-strand breaks in mouse kidney cells with age. *Biogerontology*, **2**, 261-270.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T. and Davies, K.J. (2000) Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *Faseb J*, **14**, 2495-2502.
- Sivaprasad, U., Machida, Y.J. and Dutta, A. (2007) APC/C--the master controller of origin licensing? *Cell Div*, **2**, 8.
- Sladek, T.L. (1997) E2F transcription factor action, regulation and possible role in human cancer. *Cell Prolif*, **30**, 97-105.
- Sliwinska, M.A., Mosieniak, G., Wolanin, K., Babik, A., Piwocka, K., Magalska, A., Szczepanowska, J., Fronk, J. and Sikora, E. (2008) Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev*.
- Speck, C., Chen, Z., Li, H. and Stillman, B. (2005) ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 965-971.
- Stein, G.H. and Dulic, V. (1995) Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *Bioessays*, **17**, 537-543.
- Steinborn, K., Maulbetsch, C., Priester, B., Trautmann, S., Pacher, T., Geiges, B., Kuttner, F., Lepiniec, L., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Jurgens, G. and Mayer, U. (2002) The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev*, **16**, 959-971.
- Stevaux, O. and Dyson, N.J. (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 684-691.
- Stillman, B. (1993) DNA replication. Replicator renaissance. *Nature*, **366**, 506-507.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. and Davis, R.W. (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1035-1039.
- Sun, W.H., Coleman, T.R. and DePamphilis, M.L. (2002) Cell cycle-dependent regulation of the association between origin recognition proteins and somatic cell chromatin. *Embo J*, **21**, 1437-1446.
- Suzuki, M. and Boothman, D.A. (2008) Stress-induced premature senescence (SIPS)--influence of SIPS on radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)*, **49**, 105-112.
- Tachibana, K.E., Gonzalez, M.A., Guarguaglini, G., Nigg, E.A. and Laskey, R.A. (2005) Depletion of licensing inhibitor geminin causes centrosome overduplication and mitotic defects. *EMBO Rep*, **6**, 1052-1057.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J.J. (2001) Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol*, **3**, 107-113.
- Takai, H., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol*, **13**, 1549-1556.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A. and Araki, H. (2003) GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev*, **17**, 1153-1165.
- Takisawa, H., Mimura, S. and Kubota, Y. (2000) Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 690-696.
- Tanaka, S. and Diffley, J.F. (2002) Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol*, **4**, 198-207.
- Tanaka, S., Tak, Y.S. and Araki, H. (2007a) The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. *Cell Div*, **2**, 16.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2007b) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, **445**, 328-332.

- Tanaka, T., Knapp, D. and Nasmyth, K. (1997) Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell*, **90**, 649-660.
- Tapon, N., Moberg, K.H. and Hariharan, I.K. (2001) The coupling of cell growth to the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 731-737.
- Tchirkov, A. and Lansdorp, P.M. (2003) Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet*, **12**, 227-232.
- Tercero, J.A., Labib, K. and Diffley, J.F. (2000) DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *Embo J*, **19**, 2082-2093.
- Thepaut, M., Hoh, F., Dumas, C., Calas, B., Strub, M.P. and Padilla, A. (2002) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human Geminin coiled-coil domain. *Biochim Biophys Acta*, **1599**, 149-151.
- Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**, 854.
- Todaro, G.J. and Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, **17**, 299-313.
- Toussaint, O., Dumont, P., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Magalhaes, J.P., Zdanov, S. and Chainiaux, F. (2002) Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *ScientificWorldJournal*, **2**, 230-247.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000a) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-945.
- Toussaint, O., Remacle, J., Clark, B.F., Gonos, E.S., Franceschi, C. and Kirkwood, T.B. (2000b) Biology of ageing. *Bioessays*, **22**, 954-956.
- Townsend, F.M., Aristarkhov, A., Beck, S., Hershko, A. and Ruderman, J.V. (1997) Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2362-2367.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**, 67-74.
- van den Heuvel, S. and Harlow, E. (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, **262**, 2050-2054.
- Vargas, P.A., Cheng, Y., Barrett, A.W., Craig, G.T. and Speight, P.M. (2008) Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med*, **37**, 309-318.
- Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D.S. and Dutta, A. (2003) A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell*, **11**, 997-1008.
- Venkitaraman, A.R. (2005) Medicine: aborting the birth of cancer. *Nature*, **434**, 829-830.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. and Helin, K. (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol*, **19**, 6379-6395.
- von Zglinicki, T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*, **27**, 339-344.
- von Zglinicki, T. and Martin-Ruiz, C.M. (2005) Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*, **5**, 197-203.
- Voorhees, J.J., Duell, E.A., Chambers, D.A. and Marcelo, C.L. (1976) Regulation of cell cycles. *J Invest Dermatol*, **67**, 15-19.
- Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zworschke, W. and Jansen-Durr, P. (2001) Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol*, **36**, 1327-1347.
- Walker, D.H. and Maller, J.L. (1991) Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*, **354**, 314-317.
- Walter, J. and Newport, J. (2000) Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell*, **5**, 617-627.

- Wang, X., Wong, S.C., Pan, J., Tsao, S.W., Fung, K.H., Kwong, D.L., Sham, J.S. and Nicholls, J.M. (1998) Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res*, **58**, 5019-5022.
- Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, **239**, 197-201.
- Wei, W., Ayad, N.G., Wan, Y., Zhang, G.J., Kirschner, M.W. and Kaelin, W.G., Jr. (2004) Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*, **428**, 194-198.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Weintraub, S.J., Chow, K.N., Luo, R.X., Zhang, S.H., He, S. and Dean, D.C. (1995) Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature*, **375**, 812-815.
- Wharton, S.B., Hibberd, S., Eward, K.L., Crimmins, D., Jellinek, D.A., Levy, D., Stoeber, K. and Williams, G.H. (2004) DNA replication licensing and cell cycle kinetics of oligodendroglial tumours. *Br J Cancer*, **91**, 262-269.
- Wharton, S.B., Maltby, E., Jellinek, D.A., Levy, D., Atkey, N., Hibberd, S., Crimmins, D., Stoeber, K. and Williams, G.H. (2007) Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p,19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed non-proliferating cells. *Acta Neuropathol*, **113**, 119-127.
- Whittaker, A.J., Royzman, I. and Orr-Weaver, T.L. (2000) Drosophila double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts. *Genes Dev*, **14**, 1765-1776.
- Wildwater, M., The, I. and van den Heuvel, S. (2007) Coordination of cell proliferation and differentiation: finding a GEM in the root? *Dev Cell*, **12**, 841-842.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. and Dutta, A. (2000) Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science*, **290**, 2309-2312.
- Wohlschlegel, J.A., Kutok, J.L., Weng, A.P. and Dutta, A. (2002) Expression of geminin as a marker of cell proliferation in normal tissues and malignancies. *Am J Pathol*, **161**, 267-273.
- Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E. and McMahon, M. (1997) Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**, 5598-5611.
- Wright, W.E. and Hayflick, L. (1975) Nuclear control of cellular aging demonstrated by hybridization of anucleate and whole cultured normal human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **96**, 113-121.
- Xouri, G., Dimaki, M., Bastiaens, P.I. and Lygerou, Z. (2007a) Cdt1 interactions in the licensing process: a model for dynamic spatiotemporal control of licensing. *Cell Cycle*, **6**, 1549-1552.
- Xouri, G., Lygerou, Z., Nishitani, H., Pachnis, V., Nurse, P. and Taraviras, S. (2004) Cdt1 and geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur J Biochem*, **271**, 3368-3378.
- Xouri, G., Squire, A., Dimaki, M., Geverts, B., Verveer, P.J., Taraviras, S., Nishitani, H., Houtsmuller, A.B., Bastiaens, P.I. and Lygerou, Z. (2007b) Cdt1 associates dynamically with chromatin throughout G1 and recruits Geminin onto chromatin. *Embo J*, **26**, 1303-1314.
- Yanagi, K., Mizuno, T., You, Z. and Hanaoka, F. (2002) Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J Biol Chem*, **277**, 40871-40880.
- Yang, J., Chang, E., Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C.P. and Herron, G.S. (1999) Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem*, **274**, 26141-26148.
- Yanow, S.K., Lygerou, Z. and Nurse, P. (2001) Expression of Cdc18/Cdc6 and Cdt1 during G2 phase induces initiation of DNA replication. *Embo J*, **20**, 4648-4656.
- Ye, X., Zerlanko, B., Zhang, R., Somaiah, N., Lipinski, M., Salomoni, P. and Adams, P.D. (2007) Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol*, **27**, 2452-2465.
- Yoshida, K., Oyaizu, N., Dutta, A. and Inoue, I. (2004) The destruction box of human Geminin is critical for proliferation and tumor growth in human colon cancer cells. *Oncogene*, **23**, 58-70.

- Yoshida, K., Takisawa, H. and Kubota, Y. (2005) Intrinsic nuclear import activity of geminin is essential to prevent re-initiation of DNA replication in *Xenopus* eggs. *Genes Cells*, **10**, 63-73.
- Yu, H., King, R.W., Peters, J.M. and Kirschner, M.W. (1996) Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr Biol*, **6**, 455-466.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zachariae, W., Shin, T.H., Galova, M., Obermaier, B. and Nasmyth, K. (1996) Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **274**, 1201-1204.
- Zegerman, P. and Diffley, J.F. (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*, **445**, 281-285.
- Zhang, R., Chen, W. and Adams, P.D. (2007) Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol*, **27**, 2343-2358.
- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F.E. and Kipreos, E.T. (2003) CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature*, **423**, 885-889.
- Zhu, W., Chen, Y. and Dutta, A. (2004) Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint. *Mol Cell Biol*, **24**, 7140-7150.
- Zou, L. and Stillman, B. (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 3086-3096.
- Γιαννοπούλου, Όλγα (2005), «Κλωνοποίηση τμήματος του cDNA της hGeminin στο ρετροϊκό φορέα Pmx-IRES-GFP», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.
- Δημάκη, Μ. (2008) «Μελέτη του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου Geminin και της συγγενικής πρωτεΐνης Geminin cc-like σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα», Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.
- Ηλιού, Μ. (2004) «Έκφραση δομικών περιοχών του παράγοντα αδειοδότησης hCdt1 σε βακτήρια και μελέτη της ειδικής πρωτεολυτικής ρύθμισής του κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε διαιρούμενα ανθρώπινα κύτταρα», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.
- Καραγεώργου, Ι., «Μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου της μετάδοσης του σήματος αυξητικής ορμόνης σε παιδιά με σοβαρή ανεπάρκεια στην αύξηση», Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.
- Κοταντάκη, Π., «Δημιουργία ζώων μοντέλων για τη μελέτη του *in vivo* ρόλου της Geminin: Αδρανοποίηση του γονιδίου της Geminin του ποντικού χρησιμοποιώντας ολοδύναμα κύτταρα και ιστοειδική υπερέκφρασή της», Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.
- Ξουρή, Γ. (2005), «*In vivo* χαρακτηρισμός του ανθρώπινου παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 και του αρνητικού ρυθμιστή αυτού, Geminin, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου», Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.
- Παπαπέτρου, ΕΠ. (2003), "Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου Orc1, MCM5, Cdc6, Cdt1 και Geminin σε νεοπλασίες με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR", Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μηχανισμοί οι οποίοι εξασφαλίζουν τη σωστή διαδοχή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου συμβάλλουν στη διασφάλιση της γονιδιωματικής σταθερότητας των κυττάρων. Η **αδειοδότηση της αντιγραφής του DNA**, η συγκρότηση επί των αφετηριών της αντιγραφής του DNA του προ-ανιγραφικού συμπλόκου, καθορίζει τη σωστή χρονικά και τοπικά έναρξη της αντιγραφής. Βασικό συστατικό αυτού του συμπλόκου είναι ο παράγοντας **Cdt1**. Η **Geminin** προσδένεται στο Cdt1, αναστέλοντας τη δράση του από την S μέχρι και την M φάση, παρεμποδίζοντας, έτσι, την αδειοδότηση της αντιγραφής. Παρά το ότι φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών έχειδειχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι έκφραση των Cdt1 και Geminin εντοπίζεται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα φυσιολογικά κύτταρα, ανάλογα με τα μηνύματα που δέχονται, είτε παραμένουν σε μιτωτικό κύκλο, είτε εξέρχονται από αυτόν προς φάση ηρεμίας (ή G0), διαφοροποίηση ή γήρανση. Αυστηρός συντονισμός των παραπάνω διαδικασιών είναι απαραίτητος προκειμένου να διασφαλιστεί η ομοιόσταση των πολύπλοκων δομών των ιστών των μεταζώων. Προηγούμενες μελέτες προτείνουν το σύστημα της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA ως έναν βασικό ρυθμιστή της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και της επανεισόδου στη G1. Οι παράγοντες Cdt1 και Geminin ρυθμίζονται αρνητικά κατά την έξοδο των κυττάρων σε G0, ενώ έκφρασή τους χαρακτηρίζει διαιρούμενα κύτταρα. Σε αντίθεση με τις άλλες καταστάσεις εκτός κυτταρικού κύκλου, λίγα είναι γνωστά αναφορικά με τη ρύθμιση των Cdt1 και Geminin κατά την **κυτταρική γήρανση**.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής εστιαστήκαμε στη μελέτη του προτύπου έκφρασης των Cdt1 και Geminin κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών, και στη σύγκρισή του με εκείνο των καρκινικών κυττάρων. Διαπιστώσαμε ότι τόσο η ενδοκυτταρική εντόπιση όσο και η ικανότητα των Cdt1 και Geminin να εκφράζονται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, δεν διαφοροποιούνται στους πρωτογενείς φυσιολογικούς ινοβλάστες σε σχέση με κύτταρα που προέρχονται από καρκινικό ιστό. Επιπλέον, δείξαμε ότι ο παράγοντας Cdt1 εκφράζεται αποκλειστικά σε BrdU-αρνητικά κύτταρα, σε αντίθεση με την Geminin, η οποία δείχνει να συσσωρεύεται σταδιακά μετά την έναρξη της S φάσης, ενώ δεν εντοπίστηκε συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών στο χρονικό παράθυρο της G1/S μετάβασης.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας εστιαστήκαμε στη μελέτη της έκφρασης του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 και του αρνητικού ρυθμιστή αυτού, Geminin, κατά την είσοδο των

κυττάρων σε κυτταρική γήρανση και εξετάσαμε την πιθανή λειτουργική εμπλοκή τους στην εξέλιξη του φαινομένου. Δείξαμε ότι, ενώ οι παράγοντες Cdt1 και Geminin διατηρούν τη σωστή ενδοκυτταρική εντόπιση και το σωστό πρότυπο έκφρασης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, υφίστανται αρνητική ρύθμιση σε κύτταρα που εισέρχονται σε κυτταρική γήρανση, τόσο αναπαραγωγική όσο και πρόωρη, επαγόμενη από οξειδωτικό στρες. Το γεγονός ότι η μείωση της έκφρασης της Geminin προηγήθηκε της εμφάνισης του γηρασμένου φαινοτύπου, μας ώθησε στην περαιτέρω διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της Geminin στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης.

Για το σκοπό αυτό, απορρυθμίσαμε τα επίπεδα έκφρασης της Geminin σε πρωτογενή φυσιολογικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού, αξιοποιώντας την τεχνολογία του RNAi και ρετροϊκά συστήματα υπερέκφρασης γονιδίων αντίστοιχα. Δείξαμε ότι η μείωση της έκφρασης της Geminin σε ανθρώπινους ινοβλάστες (χρησιμοποιώντας siRNAs αλλά και pSUPER πλασμιδιακούς φορείς αποσιώπησης γονιδίων που κατασκευάστηκαν ειδικά για την Geminin) επάγει αύξηση της κυτταρικής γήρανσης της καλλιέργειας. Επιπλέον, κύτταρα που στερούνταν της έκφρασης της Geminin ήταν πιο επιρρεπή σε γήρανση επαγόμενη από οξειδωτικό στρες, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Ετεροζυγώτες για το γονίδιο της Geminin εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού εμφάνιζαν μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής γήρανσης σε σχέση με τους αντίστοιχους ινοβλάστες αγρίου τύπου. Αντίθετα, αύξηση των επιπέδων της Geminin σε αγρίου τύπου εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού προκάλεσε μείωση της εμφανιζόμενης γήρανσης. Τέλος, η μείωση των επιπέδων έκφρασης του παράγοντα αδειοδότησης Cdt1 σε ανθρώπινα κύτταρα ήταν, επίσης, σε θέση να επάγει ισχυρό φαινότυπο κυτταρικής γήρανσης.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν την κρισιμότητα του ισοζυγίου Cdt1:Geminin στα κύτταρα, και προτείνουμε ότι η διατάραξη της ισορροπίας αυτής είναι ικανή να επάγει κυτταρική γήρανση, μέσω διαδικασιών όπως η υπεραδειοδότηση ή η υποαδειοδότηση της αντιγραφής του DNA.

8. ABSTRACT

Genome integrity relies on the strict alternation of S and M phases of the cell cycle, so that one and only round of DNA replication takes place per cell cycle. This is achieved through **replication licensing**, which involves the formation of a multi-protein complex, the pre-replicative complex, onto origins of replication. **Cdt1** is a crucial component of this complex and **Geminin**, a small protein shown to tightly bind Cdt1, inhibits its licensing function from S to M phase, when licensing is illegitimate. Although previous experimental evidence shows that Cdt1 and Geminin are expressed in different phases of the cell cycle, physical interaction between these two proteins has been demonstrated *in vitro* as well as *in vivo*. The fate of a normal cell is not perpetual division. Cells may exit the mitotic cell cycle to enter quiescence, to terminally differentiate or to senesce. These “out-of-cycle-states” must be strictly regulated in order to establish and maintain the hierarchical organization of complex tissues in metazoa. Replication licensing has been proposed to coordinate cell-cycle exit and re-entry *in vitro* and in metazoan tissues. Cdt1 and Geminin down-regulation during exit to quiescence supports the idea that their expression correlates with cell proliferation. In contrast to other out-of-cycle states, little is known about the regulation of Cdt1 and Geminin expression during **cellular senescence**. Senescence refers to the irreversible resting state of cells grown for succeeding passages in culture, as a response to DNA damage caused by telomeres erosion. Other stimuli, such as oxidative or oncogenic stress, may force mitotically competent cells to respond similarly, a phenomenon termed as Stress Induced Premature Senescence (SIPS).

The first part of this work focused on the study of the expression patterns of Cdt1 and Geminin during the unperturbed cell cycle of primary human fibroblasts and compared to that of tumor-derived cell lines. The cell cycle specific expression and the intracellular localization of both proteins, as assessed at a single-cell level using indirect immunofluorescence and a new monoclonal antibody against Geminin, appear similar in primary fibroblasts compared to the cancer cells examined. Cdt1 is strictly expressed in BrdU-negative cells, whereas Geminin starts accumulating after S phase onset. The two proteins are, therefore, not co-expressed at the “time-window” of G1/S transition of the cell cycle. We showed that Cdt1 levels, but not those of Geminin, are mainly regulated in a proteasome-dependent way during normal cell cycle of human primary and cancer cells.

The second part of this work focused on the investigation of Cdt1 and Geminin during cellular senescence and their possible role in the establishment of the senescence phenotype. To this end, primary human fibroblasts were maintained in culture for succeeding passages in order to induce them to undergo *replicative senescence*. Alternatively, an H₂O₂-induced senescence protocol was applied to force cells to undergo premature senescence (*Stress-Induced Premature Senescence/SIPS*). We show that, although Cdt1 and Geminin retain their nuclear localization and are correctly expressed during specific phases of the cell cycle during both replicative and H₂O₂-induced premature senescence, their expression levels are down-regulated. In SIPS-experiments, Geminin down-regulation is an early event during the establishment of the senescent-phenotype, as assessed by senescence-associated β -Galactosidase and BrdU incorporation assays. This prompted us to further examine Geminin's functional significance in the establishment of cellular senescence.

To achieve this, we interfered with Geminin expression levels in human and mouse cells. Using RNA interference techniques, we were able to show that Geminin depletion from human cells is able to induce a senescent-phenotype in a fraction of the treated culture. Similarly, Geminin-depleted human cells were more susceptible to H₂O₂-induced premature senescence, compared to control cells. Heterozygotes for Geminin mouse embryonic fibroblasts were more prone to senescence compared to their control counterparts. In contrast, when Geminin was over-expressed in control mouse embryonic fibroblasts cultures, senescent phenotype was reduced. Finally, a strong senescent-phenotype was induced when the licensing regulator, Cdt1, was silenced within human cells.

Taken together, we conclude that Cdt1:Geminin balance within cells is crucial, and when disturbed, is able to promote a senescent phenotype, possibly through a mechanism that involves over- or under-licensing of DNA replication.

*9. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ
ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ-
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ
ΣΥΝΕΔΡΙΑ*

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Iliou, M.S., Taraviras, S., Lygerou, Z., “Reduced levels of the cell cycle inhibitor Geminin can promote cellular senescence” (*manuscript in preparation*).

Roukos, V., **Iliou, M.S.**, Nishitani, H., Gentzel, M., Wilm, M., Taraviras, S. & Lygerou, Z. (2007) Geminin Cleavage during Apoptosis by Caspase-3 Alters Its Binding Ability to the SWI/SNF Subunit Brahma, *J Biol Chem.* 282, 9346-57.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

Iliou Maria, Taraviras Stavros, Lygerou Zoi, “Studying the cell cycle regulators Cdt1 and Geminin during oxidative induced senescence”, 5th Panhellenc Conference of Free Radicals and oxidative stress”, Kardamili Messinias, 28th September-1st October 2006 (1st oral presentation award).

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

M. Iliou, M. Dimaki, P. Kotantaki, S. Taraviras, Z. Lygerou, «Evidence on the involvement of the cell cycle inhibitor Geminin in the establishment of cellular senescence». 59th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, volume 54, December 7-9, Athens 2007.

M.Iliou, S.Taraviras, Z.Lygerou, «Evidence on the involvement of the cell cycle inhibitor Geminin in the establishment of cellular senescence». *Nature*-CNIO Conference on «Oncogenes and Human Cancer: The next 25 years», October 3-6, 2007, Madrid, Spain.

M.Iliou, S.Taraviras, Z.Lygerou, «Silencing the DNA replication inhibitor Geminin can lead to senescence». Cold Spring Harbor Laboratory Meeting «Eukaryotic DNA replication and genome maintenance», September 5-9, 2007, Cold Spring Harbor, New York, USA.

M.Iliou, M.Dimaki, A.Tsoutsanis, S.Taraviras, Z.Lygerou, «Depletion of the cell cycle inhibitor Geminin can promote senescence in young primary human fibroblasts». 2nd Conference on biosciences of the University of Patras, March 19-20, Patras 2005, April 23-24, Patras 2007.

M. Iliou, E. Symeonidou, V. Roukos, H. Sirinian, S. Taraviras, Z. Lygerou, «Studying the cell cycle regulators Cdt1 and Geminin during replicative and H₂O₂-induced senescence». 58th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, volume 53, November 7-10, Patras 2006.

Iliou M., Dimaki M., Kotantaki P., Roukos V., Xouri G., Taraviras S., Lygerou Z., «Study of the cell cycle regulators Cdt1 and Geminin in human primary cells that undergo senescence». 56th Meeting of Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, volume 50, Larissa 2004.