



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ-1 ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ
ΑΥΤΟΦΑΓΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ»

ΟΥΤΣΚΟΥΝΗ ΖΩΖΩ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας – Διευθύντρια Εργαστηρίου Βιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Μέλος)

Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ (Μέλος)

Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS
«THE ROLE OF CAVEOLIN-1 IN THE REGULATION OF AUTOPHAGY»**

OUTSKOUNI ZOZO

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Προτού ξεκινήσει η περιγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε ορισμένα πρόσωπα.

Πρώτα από όλους θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια αυτού του έργου, κυρία Τραχανά Βαρβάρα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου αυτό το πολύ ενδιαφέρον θέμα, αλλά και την έμπρακτη βοήθεια της από την πρώτη στιγμή και καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας η οποία αποδείχτηκε καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Εξίσου σημαντική ήταν η βοήθεια του υποψήφιου διδάκτορα του εργαστηρίου Γούτα Ανδρέα, ο οποίος παρείχε αμέριστη βοήθεια σε οποιαδήποτε δυσκολία διατηρώντας παράλληλα ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές αλλά και συντελεστές του μεταπτυχιακού αυτού προγράμματος που μου έδωσαν την δυνατότητα να αποκτήσω σημαντικές γνώσεις για τις πιο πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της γενετικής του ανθρώπου.

Σε αυτήν την προσπάθεια που ολοκληρώνεται με το πέρας της παρούσας εργασίας οι σημαντικότεροι αρωγοί ήταν η οικογένεια μου και σε αυτούς οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καβεολίνη-1 χαρακτηρίζεται ως μια δομική πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης με κεντρικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Μια από αυτές είναι και η κυτταρική γήρανση, ένα αυστηρά ελεγχόμενο πρόγραμμα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού το οποίο η καβεολίνη-1 ρυθμίζει ποικιλοτρόπως. Ένας ακόμα πλειοτροπικός ρυθμιστής της κυτταρικής γήρανσης είναι η αυτοφαγία, μια διαδικασία που επιτελείται από ειδικά οργανίδια που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα τα οποία έπειτα από σύντηξη με τα λυσοσώματα – και δημιουργία των αυτολυσοσωμάτων - εμπλέκονται στην αποικοδόμηση κυτταρικών συστατικών. Η σύγχρονη βιβλιογραφία παρέχει ενδείξεις για την αλληλεπίδραση μεταξύ καβεολίνης-1 και αυτοφαγίας. Ωστόσο, ορισμένα ερωτήματα της σχέσης της καβεολίνης-1 με την κυτταρική γήρανση παραμένουν αναπάντητα, ενώ και η σχέση της αυτοφαγίας με την κυτταρική γήρανση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Επομένως, με σκοπό την αποσαφήνιση των παραπάνω στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ρύθμιση της αυτοφαγικής απόκρισης στο πλαίσιο της κυτταρικής γήρανσης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs).

Αρχικά για να αποσαφηνίσουμε τον ρόλο της καβεολίνης-1 στην ρύθμιση της επαγόμενης από στρες πρόωρης κυτταρικής γήρανσης WJ-MSCs επιδράσαμε σε νεαρά κύτταρα με υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι οποίες είναι γνωστό ότι επάγουν πρόωρα την κυτταρική γήρανση, και αξιολογήθηκαν τα επίπεδα καβεολίνης-1. Ακολούθησε σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 σε νεαρά κύτταρα και αξιολόγηση της ικανότητας επιδιόρθωσης βλαβών έπειτα από εξωγενή οξειδωτική προσβολή (H_2O_2), με σκοπό την διερεύνηση συμμετοχής της καβεολίνης-1 στον μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA. Ακολούθως μελετήθηκε ο ρόλος της απορρύθμισης της καβεολίνης-1 στην επαγωγή πρόωρης γήρανσης λόγω συσσώρευσης βλαβών, μέσω αξιολόγησης του ποσοστού γηρασμένων κυττάρων μετά από σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 και εφαρμογής οξειδωτικού στρες σε νεαρά κύτταρα.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος της καβεολίνης-1 στην ρύθμιση της αυτοφαγικής απόκρισης στο πλαίσιο της γήρανσης α) μέσω σίγησης της έκφρασης του μορίου της αυτοφαγίας ATG5 σε συνδυασμό με την σίγηση της καβεολίνης-1 σε νεαρά κύτταρα και επακόλουθης αξιολόγησης του ποσοστού γηρασμένων κυττάρων, αλλά και β) μέσω αξιολόγησης της αυτοφαγικής απόκρισης υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπό

συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και υπό σίγηση της καβεολίνης-1 σε νεαρά και φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, αναλύοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα πολλών αυτοφαγικών μορίων.

Συνολικά, τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν τον πλειοτροπικό ρόλο της καβεολίνης-1 στην κυτταρική γήρανση καθώς σε πρόωρα γηρασμένα κύτταρα τα επίπεδα της είναι αυξημένα ενώ η μείωση των επιπέδων της οδηγεί σε επαγόμενη από στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση. Τα δύο αυτά φαινομενικά αντίθετα αποτελέσματα επεξηγούνται μέσω της συμμετοχής της καβεολίνης-1 στον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του DNA αλλά και μέσω ρύθμισης της αυτοφαγικής απόκρισης. Η μείωση των επιπέδων της καβεολίνης-1 οδηγεί σε αύξηση της αυτοφαγικής απόκρισης και πρόωρη κυτταρική γήρανση λόγω συσσώρευσης βλαβών στο γενετικό υλικό, ενώ σε φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα τα ήδη υψηλά επίπεδα καβεολίνης-1 αναστέλλουν την ικανότητα των κυττάρων να αυξάνουν την αυτοφαγία ως απόκριση σε στρεσογόνες καταστάσεις, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Συνεπώς, η μη σωστή έκφραση της καβεολίνης-1 οδηγεί σε απορρύθμιση της αυτοφαγικής απόκρισης κάτι που σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση.

Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά προσφέρουν νέα δεδομένα τόσο για την αυτοφαγία όσο και για την καβεολίνη-1 στο πλαίσιο της κυτταρικής γήρανσης των WJ-MSCs, τα οποία θεωρούνται πολύτιμο «εργαλείο» στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής.

Λέξεις- Κλειδιά: Καβεολίνη-1, Αυτοφαγία, Κυτταρική γήρανση, Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

ABSTRACT

Caveolin-1 is a protein that is part of the plasma membrane and is involved in a myriad of cellular processes. One such process is cellular senescence, a tightly regulated cellular program that results in stable cell cycle arrest. Caveolin-1 is considered to be a pleiotropic regulator of cellular senescence, given the fact that data supports both a contributing and an inhibitory role in the establishment of a senescent phenotype. Another major pleiotropic regulator of senescence is autophagy, a process characterized by the presence of double membraned vesicles termed autophagosomes, which merge with lysosomes to create autolysosomes and are involved in the degradation of cellular components. In recent years there has been an increase in studies suggesting an interaction between caveolin-1 and many autophagic molecules. However, questions regarding the precise role of caveolin-1 and autophagy in cellular senescence remain unanswered. Therefore, in an attempt to provide more information regarding these topics in the present thesis the role of caveolin-1 in the regulation of autophagy was studied, in the context of cellular senescence of mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly (WJ-MSCs).

In order to clarify the role caveolin-1 plays in the regulation of prematurely induced senescence of WJ-MSCs, young cells were treated with sub-lethal concentrations of hydrogen peroxide, which are known to induce premature senescence, and the protein levels of caveolin-1 were assessed. Since oxidative stress causes DNA damage, we next studied the possible involvement of caveolin-1 in the DNA Damage Response by silencing its expression in young WJ-MSCs and assessing the ability of these cells to repair oxidative stress induced DNA damage. Subsequently, in order to clarify whether the involvement of caveolin-1 in the DNA Damage Response is implicated in the premature senescence of WJ-MSCs we evaluated the percentage of senescent cells where silencing of caveolin-1 and treatment with hydrogen peroxide had occurred. Next, in order to investigate the role of caveolin-1 in the regulation of autophagy in the context of cellular senescence a) we assessed the percentage of senescent WJ-MSCs when silencing of caveolin-1 and of the key autophagic molecule ATG5 had been induced in young cells and b) we assessed the autophagic response under physiological conditions, nutrient starvation and silencing of caveolin-1 in young and senescent WJ-MSCs, by measuring the protein levels of several autophagic molecules.

Our results confirm the pleiotropic role of caveolin-1 in senescence, since its levels were elevated in prematurely senescent WJ-MSCs whereas its silencing lead to stress induced premature senescence. These seemingly contradictory results can be explained through the involvement of caveolin-1 in the DNA Damage Response and also through the regulation caveolin-1 exerts on autophagy. Specifically we show that downregulation of caveolin-1 results in induction of autophagy which is essential for the establishment of premature senescence, whereas in already senescent cells the elevated levels of caveolin-1 hinder the cells' ability to upregulate the autophagic response to stressful stimuli such as serum deprivation.

Importantly, the present results provide new information regarding the interaction of autophagy and caveolin-1 as well as their role in senescence of WJ-MSCs, which are considered a valuable “tool” in the field of regenerative medicine.

Key words: Caveolin-1, Autophagy, Cellular senescence, Mesenchymal stem cells

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A.1 Καβεολίνη-1.....	9
A.2 Κυτταρική γήρανση.....	22
A.3 Αυτοφαγία.....	36
A.4 Καβεολίνη-1 και αυτοφαγία.....	46
A.5 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs).....	47
A.6 Σκοπός.....	49
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
B.1 Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστοκυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton.....	50
B.2 Επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μέσω οξειδωτικού στρες.....	52
B.3 Πρόκληση οξειδωτικού στρες μικρής διάρκειας και ανάκαμψη κυττάρων.....	53
B.4 Μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal.....	54
B.5 Σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 και του ATG5 μέσω της τεχνολογίας παρεμβολής RNA (RNA interference-RNAi).....	55
B.6 Ανίχνευση καβεολίνης-1 και 53BP1 μέσω ανοσοφθορισμού σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες και σίγηση καβεολίνης-1.....	56
B.7 Αφαίρεση ορού (serum starvation) από το θρεπτικό μέσο με σκοπό την επαγωγή της αυτοφαγίας.....	58
B.8 Ανίχνευση πρωτεϊνικών επιπέδων καβεολίνης-1 και πρωτεϊνών της αυτοφαγίας μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.....	58
B.9 Στατιστική επεξεργασία.....	65
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
Γ.1 Αύξηση πρωτεϊνικών επιπέδων καβεολίνης-1 στην πρόωρα επαγόμενη γήρανση-SIPS.....	66
Γ.2 Η σίγηση της καβεολίνης-1 οδηγεί σε αδυναμία επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων στο DNA που προκαλεί το οξειδωτικό στρες.....	68
Γ.3 Η σίγηση της καβεολίνης-1 εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης.....	71
Γ.4 Η σίγηση της καβεολίνης-1 επάγει την πρόωρη γήρανση μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας.....	73
Γ.5 Η αύξηση των επιπέδων καβεολίνης-1 σε αναπτυξιαστικά γηρασμένα κύτταρα πιθανώς οφείλεται για την απορρύθμιση της αυτοφαγικής τους απόκριση.....	75
Δ.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καβεολίνη-1 (Caveolin-1)

Η καβεολίνη-1 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη βάρους 21-24 kDa, με χαρακτηριστική δομή φουρκέτας η οποία ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται καβεολίνες (1). Η οικογένεια των καβεολινών περιλαμβάνει την καβεολίνη-1, την καβεολίνη-2 και την καβεολίνη-3. Με εξαίρεση την καβεολίνη-3 η οποία εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα (2), τα υπόλοιπα δυο μέλη εκφράζονται σε πολλούς άλλους τύπους κυττάρων (3). Η καβεολίνη-1 διαθέτει δύο ισομορφές, τις καβεολίνη-1α και καβεολίνη-1β ως αποτέλεσμα εναλλακτικών θέσεων έναρξης της μετάφρασης που δημιουργούνται λόγω εσωτερικού κωδικονίου μεθειονίνης (4). Η καβεολίνη-1α ισομορφή έχει πλήρες μήκος (178 αμινοξέα) και μοριακό βάρος 24kDa, ενώ η καβεολίνη-1β ισομορφή έχει 31 αμινοξέα λιγότερα (147 αμινοξέα) στην αμινοτελική περιοχή και μοριακό βάρος 21kDa (1,4). Αποτελεί την κύρια δομική πρωτεΐνη των λεγόμενων μικροσπηλαίων (caveolae) τα οποία είναι εγκολπώσεις της πλασματικής μεμβράνης πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη που φτάνουν σε μέγεθος τα 50-100nm (5,6). Επιπλέον, η καβεολίνη-1 εντοπίζεται και ενδοκυτταρικά στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο, στο σύστημα Golgi, στα εκκρινόμενα από το Golgi κυστίδια και στα μιτοχόνδρια μεταξύ άλλων, ενώ υπάρχει και ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε εκκρινόμενη μορφή (7,8).

1.1 Δομή της πρωτεΐνης καβεολίνη-1

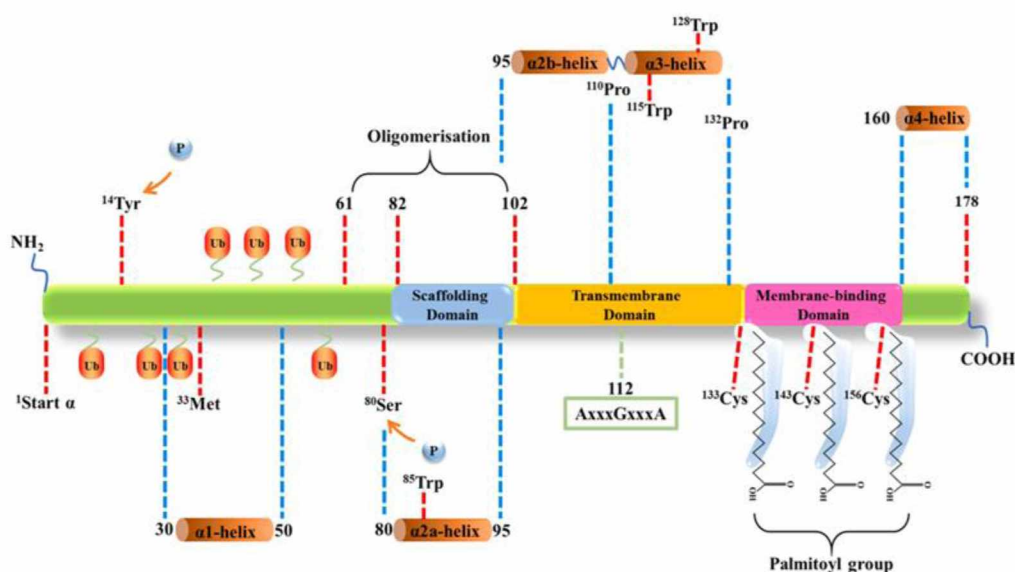
Το γονίδιο της καβεολίνης-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 στην θέση 7q31.2 και η μετάφραση του μεταγράφου με πλήρες μήκος που προκύπτει από αυτό, οδηγεί στην δημιουργία της πρωτεΐνης καβεολίνη-1 η οποία αποτελείται από δύο λειτουργικές επικράτειες και δύο επικράτειες που περιέχουν τα άκρα (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό) (5,7,9) (Εικόνα 1):

I. Επικράτεια που περιέχει το αμινοτελικό άκρο (NH₂ terminal): Σε αυτήν την επικράτεια βρίσκονται θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Συγκεκριμένα, εδώ εντοπίζεται η θέση φωσφορυλίωσης της καβεολίνης-1α από την κινάση Src στο κατάλοιπο τυροσίνης 14 (Y14) καθώς και θέσεις ουβικουιτίνωσης (5).

II. Επικράτεια που δρα ως ικρίωμα (Scaffolding Domain, CSD): Προσφέρει στην καβεολίνη-1 την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες και σηματοδοτικά μόρια (10,11).

III. Διαμεμβρανική επικράτεια (TMD): Προσφέρει πρόσδεση και αγκυροβόληση στην πλασματική μεμβράνη.

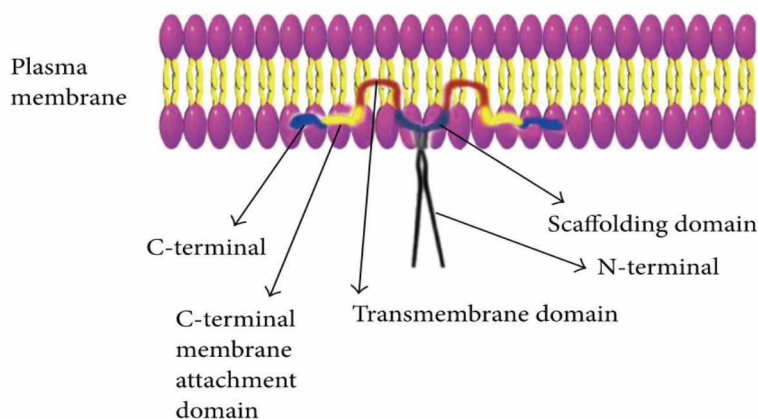
IV. Επικράτεια που περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο (COOH terminal): Περιέχει θέσεις παλμιτοϋλίωσης και θέσεις που βοηθούν την πρόσδεση στην μεμβράνη (12).



Εικόνα 1: Δομή και επικράτειες της καβεολίνης-1 (13)

Τα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης της προσδίδουν διαφορετικές και σημαντικές λειτουργίες. Η επικράτεια που δρα ως ικρίωμα (CSD) είναι καθοριστικής σημασίας για την ικανότητα της καβεολίνης-1 να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, πολλές πρωτεΐνες διαθέτουν αμινοξικά μοτίβα τα οποία τις βοηθούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με την επικράτεια CSD. Τα μοτίβα αυτά μπορούν να έχουν την μορφή ΦxΦxxxxΦ, ΦxxxxΦxxΦ ή ΦxΦxxxxΦxxΦ με το σύμβολο x να συμβολίζει οποιοδήποτε αμινοξύ ενώ στη θέση του Φ μπορεί να βρίσκεται μόνο κάποιο από τα αρωματικά αμινοξέα (14). Επιπλέον, η ισομορφή καβεολίνη-1α περιέχει μια αλληλουχία αμινοξέων (61-102) χρήσιμη για τον ομοολιγομερισμό που υφίσταται η καβεολίνη στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο, μια διαδικασία σημαντική για την σωστή μεταφορά της στα μικροσπήλαια της πλασματικής μεμβράνης όπως θα αναλυθεί και παρακάτω (7,15). Όσον αφορά την μορφολογία της καβεολίνης-1 στην

πλασματική μεμβράνη, τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό της άκρο είναι στραμμένα προς το κυτταρόπλασμα και στην μεμβράνη βρίσκεται μόνο η διαμεμβρανική περιοχή. Ολόκληρο το μόριο βρίσκεται εντός κυττάρου (12) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δομή της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη (16)

1.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της καβεολίνης-1

Η καβεολίνη-1 υφίσταται τριών ειδών μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις: φωσφορυλίωση, παλμυτουλίωση και ουβικουιτίνωση.

Η παλμυτουλίωση πραγματοποιείται σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Η καβεολίνη-1 διαθέτει μόνο τρία κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία βρίσκονται στην καρβοξυτελική της περιοχή και παλμυτουλιώνονται και τα τρία (Cys¹³³, Cys¹⁴³, Cys¹⁵⁶) (17). Αυτή η τροποποίηση είναι μη αναστρέψιμη (18) και απαραίτητη για την φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 από την κινάση c-SRC (19). Ωστόσο, η παλμυτουλίωση δεν είναι καθοριστικής σημασίας για την μεταφορά της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη (17).

Η σημαντικότερη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που υφίσταται η καβεολίνη-1 είναι η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Τυροσίνης 14 (Tyr¹⁴). Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται από την κινάση c-SRC και γίνεται μόνο στην ισομορφή με πλήρες μέγεθος, την καβεολίνη-1α, καθώς το κατάλοιπο Tyr¹⁴ εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή η οποία είναι συντεταγμένη στην καβεολίνη-1β ισομορφή (20). Η συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι καθοριστικής σημασίας για την εκπλήρωση των ρόλων της καβεολίνης-1 καθώς σχετίζεται άμεσα με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες (21–23), την κυτταρική σηματοδότηση (24,25), τον καρκίνο (26) αλλά και την ενδοκυττάρωση των μικροσπληαίων της πλασματικής μεμβράνης

(27). Επιπλέον, η καβεολίνη-1 υφίσταται φωσφορυλίωση και στο κατάλοιπο Σερίνης 80 (Ser⁸⁰) η οποία ρυθμίζει την πρόσδεση της καβεολίνης-1 στην μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου μετά την είσοδο της σε αυτό αλλά και την μετακίνηση της στο σύμπλεγμα Golgi. Επομένως η φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 στο κατάλοιπο Ser⁸⁰ είναι καθοριστικής σημασίας για την σωστή μεταφορά της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη (28).

Το τρίτο είδος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που υφίσταται η καβεολίνη-1 είναι η ουβικουιτίνωση η οποία δρα ως σήμα για την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης μέσω του πρωτεασώματος. Η ουβικουιτίνωση της καβεολίνης-1 πραγματοποιείται μόνο στα κατάλοιπα Λυσίνης της αμινοτελικής περιοχής και όχι σε αυτά των άλλων περιοχών (29). Μέχρι πρόσφατα οι λιγάσες που ουβικουιτινώνουν την καβεολίνη-1 παρέμεναν άγνωστες, ωστόσο βρέθηκε ότι σε αιμοποιητικά κύτταρα ποντικών η λιγάση ZNRF1 είναι υπεύθυνη για την ουβικουιτίνωση της καβεολίνης-1 (30).

1.3 Βιοσύνθεση και μεταφορά της καβεολίνης-1 στην μεμβράνη

Μετά την σύνθεση ενός μονομερούς καβεολίνης-1 από τα ριβοσώματα του Ενδοπλασματικού Δικτύου ακολουθεί η μεταφορά της καβεολίνης-1 στην μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου (31). Η διαδικασία αυτή καταλύεται από το Signal Recognition Particle, μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη η οποία αναγνωρίζει και συνδέεται σε ένα μοτίβο των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών προκαλώντας επιβράδυνση της μετάφρασης με σκοπό την μετατόπιση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου (32). Η μετατόπιση αυτή επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης του SRP με έναν SRP υποδοχέα κοντά σε ένα κανάλι του Ενδοπλασματικού Δικτύου που οδηγεί στην μεμβράνη (translocon) (33). Έτσι, επιτυγχάνεται «σύζευξη» της μετάφρασης μιας πρωτεΐνης με την μετατόπισή της. Αμέσως μετά την μετατόπιση στην μεμβράνη του Ενδοπλασματικού Δικτύου, η καβεολίνη-1 ολιγομερίζεται δημιουργώντας τα λεγόμενα 8S complexes μεγέθους 150-200 kDa (34). Ακολουθεί η μεταφορά των 8S complexes στο σύμπλεγμα Golgi όπου πραγματοποιείται ακόμα ένας ολιγομερισμός ο οποίος εξαρτάται από την χοληστερόλη (35) αλλά και από την αμινοτελική περιοχή της καβεολίνης-1, δημιουργώντας μεγαλύτερου μεγέθους και πιο σταθερά συμπλέγματα καβεολίνης-1 >400 kDa (70S complexes) (34). Τέλος, η καβεολίνη-1 μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη με τη μορφή ενός μεγάλου μεγέθους συμπλέγματος το οποίο θα δημιουργήσει τα μικροσπήλαια με τρόπο που θα αναλυθεί παρακάτω (34).

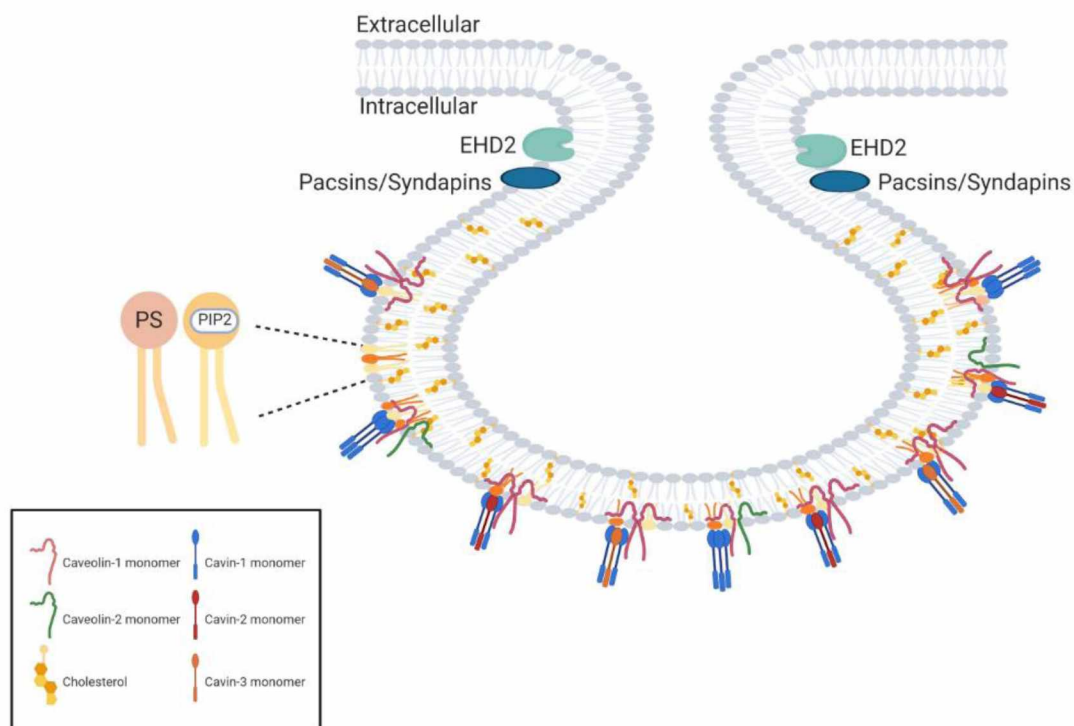
1.4 Βιολογικοί ρόλοι της καβεολίνης-1

Παρόλο που η καβεολίνη-1 είναι ευρέως γνωστή για τον ρόλο της ως βασική δομική πρωτεΐνη των μικροσπηλαίων της πλασματικής μεμβράνης, φαίνεται πως συμμετέχει σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών ανεξάρτητων από τα μικροσπύλαια. Όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, οι πολυπληθείς ρόλοι της καβεολίνης-1 μέσα στο κύτταρο είναι αποτέλεσμα και της υποκυτταρικής κατανομής της, καθώς εκτός από την πλασματική μεμβράνη εντοπίζεται και σε άλλες μεμβράνες όπως αυτές του Ενδοπλασματικού Δικτύου, του Συμπλέγματος Golgi, των μιτοχονδρίων, των λυσοσωμάτων και εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών κυστιδίων (36). Επιπλέον, κυριαρχεί πλέον η θεωρία δράσης της καβεολίνης-1 ως σηματοδοτικό μόριο (Caveolin signaling hypothesis) καθώς μέσω της επικράτειας ικρίωματος (CSD) που διαθέτει συνδέεται σε σηματοδοτικά μόρια και τα φέρνει σε επαφή με τους υποδοχείς της μεμβράνης μέσω των μικροσπηλαίων (36). Ωστόσο, η καβεολίνη-1 συμμετέχει στην μεταγωγή σήματος και ανεξάρτητα από τα μικροσπύλαια καθώς η σύνδεση της με σηματοδοτικά μόρια, μέσω της επικράτειας CSD, τείνει να τα καθιστά ανενεργά (36–38) (Εικόνα 4).

1.4.1 Δημιουργία Μικροσπηλαίων (Caveolae)

Ένας από τους βασικούς ρόλους της καβεολίνης-1 είναι η δημιουργία των μικροσπηλαίων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μικροσπύλαια αποτελούν δομές της πλασματικής μεμβράνης που προκύπτουν από εγκοιλώσεις αυτής, έχουν χαρακτηριστικό σχήμα που μοιάζει με το γράμμα ω και έχουν μέγεθος 50-100 nm (5,6). Το όνομά τους προκύπτει από την χαρακτηριστική δομή τους καθώς μοιάζουν με μικρά σπύλαια στην πλασματική μεμβράνη. Η τεχνολογία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ήταν καθοριστικής σημασίας για την ανακάλυψή τους αρχικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς (39) και στη συνέχεια σε μια πληθώρα κυττάρων (40–42). Η κύρια δομική τους πρωτεΐνη είναι η καβεολίνη-1 (42) η έκφραση της οποίας είναι ικανή να επάγει την de novo δημιουργία μικροσπηλαίων σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν παρατηρούνται μικροσπύλαια (43). Επιπλέον, τα μικροσπύλαια αποτελούνται από σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (44,45) και λόγω της σύστασής τους αυτής αποτελούν υπο-ομάδα των σχεδιών λιπιδίων (lipid rafts). Η διαδικασία δημιουργίας των μικροσπηλαίων ξεκινάει μετά τον εντοπισμό της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη. Η καβεολίνη-1 στην πλασματική μεμβράνη συνδέεται με χοληστερόλη και λιπίδια σχηματίζοντας σχεδίες λιπιδίων. Αυτή η διαδικασία έλκει

κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται cavinins (cavin1-PRPF, cavin2-SDPR, cavin3-SRBC, cavin4-MURC) οι οποίες αφού σχηματίσουν σύμπλοκα ετερο-ολιγομερών μεταξύ τους στο κυτταρόπλασμα συνδέονται με την καβεολίνη-1 και με τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης, σταθεροποιώντας την καβεολίνη-1 και οδηγώντας έτσι στην δημιουργία των εγκοιλώσεων που είναι τα μικροσπηλαία (46,47). Ιδιαίτερα η cavin1 αποδείχθηκε καίριας σημασίας για την δημιουργία των μικροσπηλαίων καθώς έλλειψη της οδήγησε σε μη δημιουργία μικροσπηλαίων ακόμα και παρουσία καβεολίνης-1 (48,49). Η δημιουργία των μικροσπηλαίων ολοκληρώνεται με τη βοήθεια και κάποιων πρωτεϊνών συνεργών όπως η PACSIN2 (Syndapin II), η ΑΤΡαση Eps-15 homology domain 2 (EHD2) και ο ορφανός υποδοχέας με δράση κινάσης τυροσίνης 1 (47) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της δομής των μικροσπηλαίων (caveolae) (50)

1.4.2 Ρύθμιση ομοιόστασης χοληστερόλης

Η σχέση της καβεολίνης-1 με την χοληστερόλη είναι στενή και πολυεπίπεδη. Φαίνεται πως η καβεολίνη-1 δρα ως εξαιρετικά ευαίσθητος αισθητήρας των επιπέδων χοληστερόλης του κυττάρου, αλλά με τη σειρά της και η ίδια η χοληστερόλη ρυθμίζει τα επίπεδα της καβεολίνης-1. Αρχικά η καβεολίνη-1 έχει την ικανότητα να δεσμεύει χοληστερόλη (51) μέσω ενός αμινοξικού μοτίβου που φέρει στην επικράτεια CSD (CRAAC) (52,53). Με τον τρόπο αυτό δεσμεύει την νεοσυντιθέμενη χοληστερόλη

από το Ενδοπλασματικό Δίκτυο και την μεταφέρει στην πλασματική μεμβράνη όπου θα χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία μικροσπλαιίων (54). Η μεταφορά αυτή διαταράχθηκε όταν ερευνητές εισήγαγαν μια μεταλλαγμένη μορφή της καβεολίνης-1 σε νεφρικά κύτταρα ποντικών (55), ενώ και σε μελέτες in vivo μετά από Knockout της καβεολίνης-1 παρατηρήθηκε μειωμένη χοληστερόλη σε λιπιδικά σωματίδια αδιποκυττάρων ποντικών (56) καθιστώντας ακόμα πιο ξεκάθαρο τον ρόλο της καβεολίνης-1 στην ενδοκυτταρική μεταφορά της χοληστερόλης. Εκτός όμως από την ενδοκυτταρική μεταφορά της χοληστερόλης, η καβεολίνη μέσω των μικροσπλαιίων ρυθμίζει και την εκκροή χοληστερόλης από το κύτταρο (57).

Από την μεριά της η χοληστερόλη ρυθμίζει τα επίπεδα καβεολίνης-1 στο κύτταρο δρώντας είτε σε μεταγραφικό επίπεδο είτε επηρεάζοντας την μεταφορά της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη μέσω του συμπλέγματος Golgi. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA της καβεολίνης-1 αυξήθηκαν μετά από χορήγηση Low Density Lipoprotein (LDL), ενώ στον υποκινητή της καβεολίνης-1 βρέθηκαν δύο αλληλουχίες που μοιάζουν με στοιχεία ρυθμιζόμενα από στερόλες (58). Αντίστοιχα μετά από μείωση των επιπέδων ελεύθερης χοληστερόλης μέσω οξείδωσής της παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA της καβεολίνης-1 (59). Αυτό δείχνει ότι αλλαγές στα επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης επηρεάζουν τα επίπεδα καβεολίνης-1 στο κύτταρο. Επιπλέον, η χοληστερόλη επηρεάζει και τον αριθμό των μορίων καβεολίνης-1 που φτάνουν στην πλασματική μεμβράνη από το σύμπλεγμα Golgi, καθώς η αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης επιτάχυνε την μεταφορά και εναπόθεση καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη ενώ η μείωση αυτών διατάραξε αυτή την διαδικασία (35). Συμπεραίνουμε τελικά ότι υπάρχει ένας αμφίδρομος μηχανισμός ρύθμισης των επιπέδων της καβεολίνης-1 από την χοληστερόλη η οποία χρησιμοποιεί την καβεολίνη για ρύθμιση των επιπέδων της στο κύτταρο. Πρόσφατα η άμεση και λειτουργική αυτή σύνδεση μεταξύ καβεολίνης-1 και χοληστερόλης επιβεβαιώθηκε και σε ενήλικα ανθρώπινα μεσεγχοματικά βλαστοκύτταρα (60).

1.4.3 Ρύθμιση μιτοχονδριακής λειτουργίας

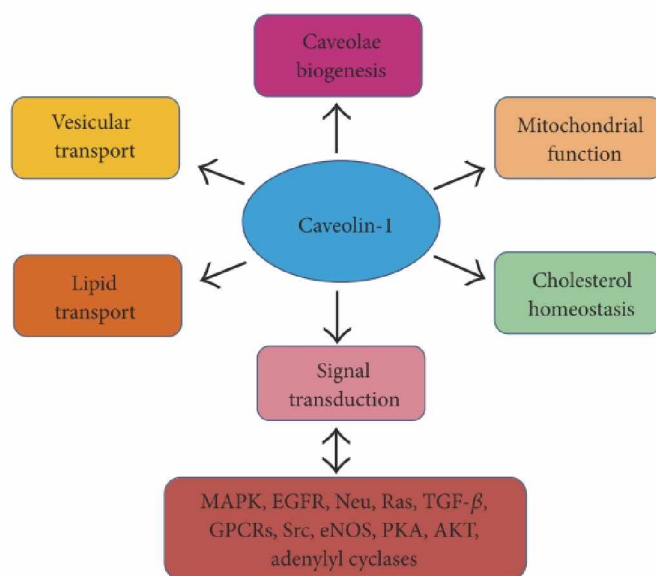
Όπως υποστηρίζουν τα δεδομένα πολλών μελετών η καβεολίνη-1 είναι καθοριστικής σημασίας για την σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Ένας τρόπος με τον οποίο η καβεολίνη-1 εμπλέκεται στην λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης, τα οποία είναι σημαντικά για την ρύθμιση της δράσης και της ευαισθησίας των μιτοχονδρίων σε απόπτωση (61). Η σίγηση της καβεολίνης-1 σε

εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) οδήγησε σε συσσώρευση χοληστερόλης στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων μειώνοντας την λειτουργικότητα τους λόγω αλλαγής στην σύσταση και στην ρευστότητα της μεμβράνης, οδηγώντας έτσι σε παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) μεταξύ άλλων (62). Αυξημένα επίπεδα H₂O₂ παρατηρήθηκαν και σε ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από σίγηση της καβεολίνης-1 (63), ενώ η σχέση της καβεολίνης-1 με τα μιτοχόνδρια δείχθηκε και *in vivo*, καθώς σε ποντίκια που είχε γίνει Knockout της καβεολίνης-1 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ROS και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων των αδιποκυττάρων (64). Πιο πρόσφατα παρατηρήθηκε ένας νέος τρόπος με τον οποίο η καβεολίνη-1 βοηθά στην σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Σύμφωνα με τους Volonte και συνεργάτες κατά την προσθήκη ελευθέρων ριζών σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs), η καβεολίνη-1 προωθεί τον εντοπισμό μιας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης τύπου m-AAA (AFG3L2) στα μιτοχόνδρια διασφαλίζοντας έτσι την σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες (65). Από τα παραπάνω δεδομένα γίνεται εμφανής η σημαντικότητα της ακέραιας έκφρασης της καβεολίνης-1 για την ευόδωση των μιτοχονδριακών λειτουργιών.

1.4.4 Συμμετοχή σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Όπως γίνεται κατανοητό από την πληθώρα κυτταρικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχει, η καβεολίνη-1 δεν είναι απλά μια δομική πρωτεΐνη των μικροσπηλαίων και των μεμβρανών αλλά μια πρωτεΐνη κλειδί για την μεταφορά πληροφοριών και σημάτων. Επιπλέον, η θέση της στην πλασματική μεμβράνη της επιτρέπει να αλληλεπιδρά και να ρυθμίζει την λειτουργία πολλών μορίων που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ρύθμισης αποτελεί η ενδοθηλιακή μορφή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS). Η καβεολίνη-1 είναι ένας ενδογενής αρνητικός ρυθμιστής (αναστολέας) της eNOS όπως υποστηρίζεται από μελέτες *in vitro* (38), ενώ και σε *in vivo* μελέτες (66,67) ποντίκια που δεν εκφράζουν καβεολίνη-1 έχουν αυξημένα επίπεδα eNOS. Η καβεολίνη-1 ασκεί αρνητική ρύθμιση και στην κινάση τυροσίνης (c-SRC) στην οποία συνδέεται και την καθιστά ανενεργή (20). Άλλωστε η ίδια η καβεολίνη-1 ανακαλύφθηκε αρχικά ως υπόστρωμα της κινάσης v-SRC του ιού Rous Sarcoma (68). Επίσης η καβεολίνη-1 ρυθμίζει και την οικογένεια υποδοχέων με δράση κινάσης και χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του επιδερμικού παράγοντα αύξησης, EGFR με τον οποίο η καβεολίνη-1 συνδέεται άμεσα, μέσω της επικράτειας ικριώματος, και αναστέλλει την

ιδιότητα κινάσης Τυροσίνης που διαθέτει (69). Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα υπερέκφραση καβεολίνης-1 αναστέλλει την σηματοδότηση του EGF και η ανασταλτική αυτή δράση αποδείχθηκε ότι γίνεται μέσω της επικράτειας CSD τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (70). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται έμμεσα και από άλλες μελέτες (71,72). Η καβεολίνη-1 επίσης εμπλέκεται στην αναστολή των ετεροτριμερών GPCRs δεσμεύοντας την α -υπομονάδα τους και καθιστώντας τους σε ανενεργή διαμόρφωση (73). Ωστόσο, η καβεολίνη-1 ασκεί και θετική ρύθμιση σε κάποια μόρια όπως είναι ο υποδοχέας ινσουλίνης (IR) και ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER). Βρέθηκε ότι η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της ινσουλίνης μέσω της επικράτειας CSD και η αλληλεπίδραση αυτή αυξάνει την δράση κινάσης του υποδοχέα (74). Όσον αφορά τον υποδοχέα των οιστρογόνων α (ER α) φαίνεται πως η καβεολίνη-1 αυξάνει την μεταφορά του υποδοχέα στον πυρήνα με τρόπο που δεν εξαρτάται από προσδέτη, ενισχύοντας έτσι την σηματοδότηση καθοδικά του ER α (75). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η καβεολίνη-1 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της μεταγωγής σήματος που ασκεί τόσο θετική όσο και αρνητική δράση και οι αλληλεπιδράσεις της με μια πληθώρα μορίων μεσολαβούνται από την επικράτεια ικρίώματος που διαθέτει.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων δράσεων της καβεολίνης-1 (16)

1.5 Καβεολίνη-1 και οξειδωτικό στρες

Η καβεολίνη-1 είναι μια πρωτεΐνη που έχει στενή σχέση με το οξειδωτικό στρες, καθώς τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στον οργανισμό επηρεάζουν τα επίπεδα καβεολίνης-1 αλλά και η ίδια η καβεολίνη-1 ρυθμίζει την απόκριση στο οξειδωτικό στρες (16).

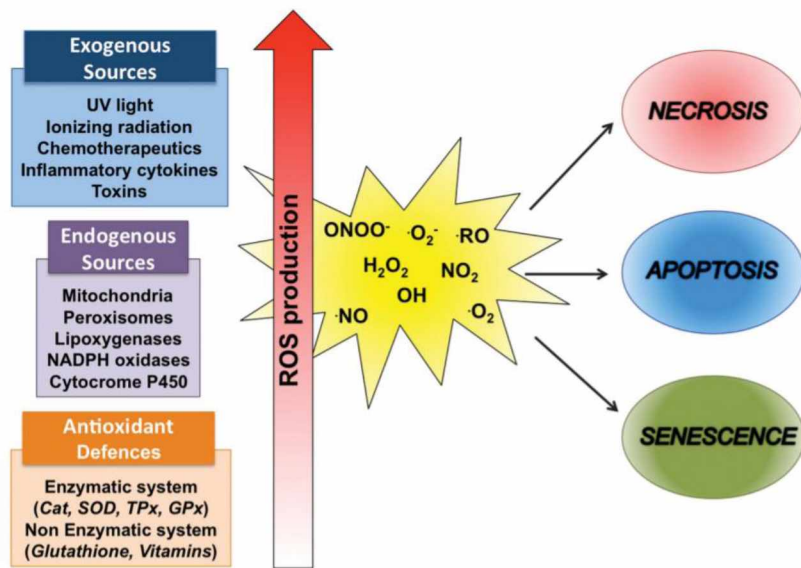
1.5.1 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) και της απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό μέσω της αντιοξειδωτικής άμυνας (76). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αποτελούνται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$) και άλλες λιγότερο δραστικές μορφές όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα μόρια που περιέχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα και ως εκ τούτου αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια προκειμένου να δεσμεύσουν ηλεκτρόνια και να αποκτήσουν πιο σταθερή δομή. Δεδομένης της αυξημένης αντιδραστικότητάς τους οι ελεύθερες ρίζες είναι οι πιο επικίνδυνες μορφές ROS, ωστόσο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (77,78).

Πολλοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε δημιουργία οξειδωτικού στρες τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς. Κύρια πηγή οξειδωτικού στρες αποτελούν οι ενδογενείς ενζυμικές διαδικασίες στα διάφορα οργανίδια του κυττάρου. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση των υπεροξειδισωμάτων στα οποία παράγεται ρίζα υπεροξειδίου (O_2^-) από το ένζυμο Οξειδάση της Ξανθίνης αλλά και υπεροξειδίο του υδρογόνου από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων (79). Άλλα ένζυμα, όπως οι οξειδάσες NADPH, είναι επίσης υπεύθυνα για την παραγωγή ROS ενδοκυτταρικά καθώς, όπως λέει και το όνομά τους, οξειδώνουν μόρια στόχους (80). Ωστόσο, η μεγαλύτερη πηγή ενδογενούς παραγωγής ROS είναι τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα η διαρροή μικρού ποσοστού ηλεκτρονίων (1-2%) κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (81). Τα μόρια φορείς ηλεκτρονίων NADH και FADH_2 μεταφέρουν ηλεκτρόνια στα σύμπλοκα I και II της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στη συνέχεια μέσω των συμπλόκων III και IV τα ηλεκτρόνια καταλήγουν στο μοριακό οξυγόνο προς σχηματισμό νερού. Όμως, η πρόωρη διαρροή ηλεκτρονίων από τα συμπλέγματα I και III οδηγεί στην δημιουργία υπεροξειδίου O_2^- το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο πολλών ελευθέρων

ρίζων οξυγόνου (79). Οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) αποτελούνται από το NO[•] και το ONOO⁻. Η σύνθεση του NO γίνεται από το αμινοξύ L-Αργινίνη μέσω του ενζύμου Συνθάση του Οξειδίου του Αζώτου (NOS) ενώ η παραγωγή του ONOO⁻ προκύπτει από την αντίδραση του NO με το O₂ στα μιτοχόνδρια (82,83). Στις εξωτερικές πηγές οξειδωτικού στρες συγκαταλέγονται η υπερϊώδης ακτινοβολία, το κάπνισμα, η περιβαλλοντική μόλυνση αλλά και η άσκηση (78).

Φυσιολογικά, χαμηλά επίπεδα ROS/RNS είναι ευεργετικά για τα κύτταρα καθώς δρουν ως δευτεροί διαβιβαστές σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου όπως η απόπτωση, η κυτταρική αύξηση και η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (82,84–86). Ωστόσο, σε μεγάλες συγκεντρώσεις τα ROS/RNS προκαλούν βλάβες στα διάφορα βιομόρια, όπως χαρακτηριστικά η δημιουργία 8-οξο-2-δεοξυγουανοσίνης κατά την οξείδωση του DNA, η οποία αυξάνει την αστάθεια του γενετικού υλικού και οδηγεί σε μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις στο DNA (87). Οι βλάβες που προκαλεί το οξειδωτικό στρες στα βιομόρια μπορούν να οδηγήσουν σε απόπτωση, νέκρωση ή κυτταρική γήρανση (88). Έτσι, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει συγκεκριμένους αμυντικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά ένζυμα ή μη ενζυμικούς μηχανισμούς. Τα τρία κύρια ενζυμικά συστήματα αντιοξειδωτικών μορίων περιλαμβάνουν το σύστημα των Δισμουτάσων Υπεροξειδίου το σύστημα της θειορεδοξίνης (TRx) και το σύστημα της γλουταθειόνης (GSH). Οι Δισμουτάσες Υπεροξειδίου καταλύουν την μετατροπή της ρίζας υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, η Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης αντιδρά με το H₂O₂ και το ανάγει σε H₂O και το σύστημα θειορεδοξίνης ανάγει οξειδωμένες κυστεΐνες (89). Επιπλέον, στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες βοηθούν και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες A, C και E κάποια μεταλλικά στοιχεία αλλά και ουσίες που ονομάζονται φλαβονοειδή (79) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και επιπτώσεις τους (90)

1.5.2 Ρύθμιση καβεολίνης-1 από το οξειδωτικό στρες

Η σχέση της καβεολίνης-1 με το οξειδωτικό στρες είναι εμφανής από μια πληθώρα δεδομένων. Όπως έδειξαν οι Dassari και συνεργάτες υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες αυξάνεται η μεταγραφή του γονιδίου της καβεολίνης-1 μέσω ενεργοποίησης της κινάσης p38/MAPK και του μονοπατιού στο οποίο αυτή συμμετέχει (91). Δεδομένα από άλλες μελέτες ωστόσο υποστηρίζουν την μείωση των επιπέδων καβεολίνης-1 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (92–94). Μελέτες που υποστηρίζουν την μείωση των επιπέδων της καβεολίνης-1 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες δείχνουν ότι η μείωση αυτή είναι αποτέλεσμα αποικοδόμησής της μέσω του συστήματος ουβικουιτίνη-πρωτεάσωμα (93,94). Η καβεολίνη-1 υφίσταται ρύθμιση και μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Όπως έδειξαν οι Volonte και συνεργάτες, το H_2O_2 οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης p38/MAPK η οποία είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 στο κατάλοιπο τυροσίνης 14 (Tyr14) από την κινάση Src, καθώς αναστολή του μονοπατιού της p38/MAPK αναστέλλει την φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 από την Src (95). Η φωσφορυλίωση του συγκεκριμένου καταλοίπου της καβεολίνης-1 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες υποστηρίζεται και από πιο πρόσφατες μελέτες (96). Παρατηρήθηκε επίσης αναστολή της παλμιτοϋλίωσης της καβεολίνης-1 από δραστικές μορφές οξυγόνου (97), ενώ το οξειδωτικό στρες επάγει

την φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 στο κατάλοιπο Tyr14 και αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη της αυτοφαγίας BECLIN-1 (23). Τέλος, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στη ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού της καβεολίνης-1 καθώς δραστικές μορφές οξυγόνου εμποδίζουν την μεταφορά νεοσυντιθέμενης καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη και αυτή η παρεμπόδιση είναι αποτέλεσμα αναστολής της παλμιτουλίωσης της πρωτεΐνης (97). Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου έδειξε ότι η έκθεση φυσιολογικών χονδροκυττάρων σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) προκαλεί την μετατόπιση της καβεολίνης-1 από την πλασματική μεμβράνη στον πυρήνα όπου φαίνεται να συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA (98).

1.5.3 Αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με μόρια της αντιοξειδωτικής άμυνας

Ένα από τα σημαντικότερα μόρια του μηχανισμού απόκρισης στο οξειδωτικό στρες με το οποίο αλληλεπιδρά η καβεολίνη-1 είναι ο Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, μεταξύ άλλων, και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων με προστατευτική δράση ενάντια στο οξειδωτικό στρες (99). Η καβεολίνη-1 αποτελεί ενδογενή αρνητικό ρυθμιστή (αναστολέα) του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, καθώς σε κατάσταση οξειδωτικού στρες εμποδίζει την μετακίνηση του από τα μικροσπύλαια στα οποία βρίσκεται φυσιολογικά στον πυρήνα και επομένως την ενεργοποίηση γονιδίων της αντιοξειδωτικής άμυνας (99). Επιπλέον, η καβεολίνη-1 σε επιθηλιακά κύτταρα επάγει την αλληλεπίδραση του Nrf2 με τον παράγοντα Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein) (100) ο οποίος αποτελεί τον κύριο αναστολέα του Nrf2 καθώς υπό φυσιολογικές συνθήκες συνδέεται με τον Nrf2 στο κυτταρόπλασμα οδηγώντας σε ουβικουτίνωση και αποικοδόμηση του (101).

Επίσης, η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά και με το ένζυμο Αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR1) το οποίο είναι σημαντικός ρυθμιστής της αντιοξειδωτικής άμυνας. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα μικροσπύλαια και η αλληλεπίδραση του με την καβεολίνη-1 το απενεργοποιεί (102,103).

Η καβεολίνη-1 ρυθμίζει και την δράση του ενζύμου MTH1 (MutT Homolog 1), το οποίο συμμετέχει στον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες που δημιουργούνται από το οξειδωτικό στρες αποτρέποντας την ενσωμάτωση οξειδωμένων βάσεων στο DNA (104). Το γκρουπ των Volonte και συνεργατών έδειξε ότι η έκφραση της KRAS σε

καρκινικά κύτταρα επάγει την αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με το MTH1 αναστέλλοντας την δράση του (105,106).

Από τα παραπάνω δεδομένα γίνεται κατανοητό ότι η καβεολίνη-1 είναι μια πρωτεΐνη «κλειδί» όσον αφορά την απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες, καθώς συμμετέχει ποικιλοτρόπως στην αντιοξειδωτική σηματοδότηση αφού μέσω αλληλεπίδρασής της με πολλά μόρια της αντιοξειδωτικής άμυνας οδηγεί σε αναστολή τους, ενώ η απορρύθμισή της μειώνει την ικανότητα των κυττάρων να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες.

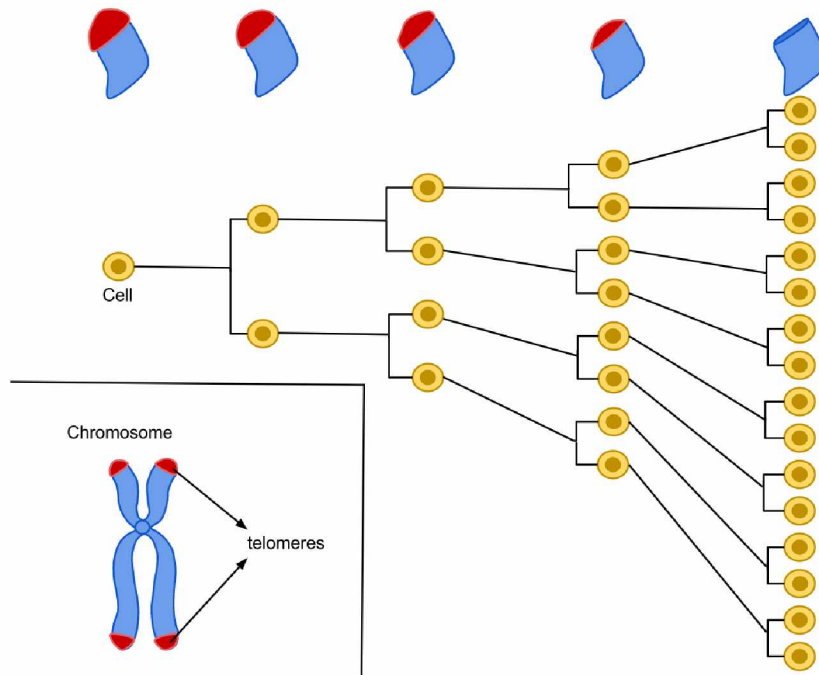
2. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση είναι ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε αρχικά σε καλλιέργεια ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (107) και χαρακτηρίζεται κυρίως από την μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Μεταγενέστερες μελέτες ωστόσο, έχουν αποδείξει την ύπαρξη γηρασμένων κυττάρων in vivo και σε διάφορους ιστούς (108,109), ενώ η συσσώρευση τους με την πάροδο του χρόνου έχει συσχετιστεί με την γήρανση του οργανισμού της οποίας μάλιστα θεωρείται ορόσημο (110,111), καθώς έχει διαπιστωθεί αιτιολογική σχέση μεταξύ τους (112,113). Η κυτταρική γήρανση βρίσκεται στο επίκεντρο ενός μεγάλου φάσματος διαδικασιών. Δρα προστατευτικά έναντι στην καρκινογένεση μέσω της αναστολής πολλαπλασιασμού κυττάρων που έχουν συσσωρεύσει βλάβες ενώ εμπλέκεται και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (110). Ωστόσο, η γήρανση των βλαστοκυττάρων ελαττώνει την ικανότητα του οργανισμού να επιδιορθώνει τραυματισμένους ιστούς ενώ συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων έχει συσχετιστεί με πολλές ασθένειες (110,114). Η κυτταρική γήρανση μπορεί να είναι αποτέλεσμα εκφυλισμού των τελομερών (αναδιπλασιαστική γήρανση) ή αποτέλεσμα απόκρισης σε μια σειρά από στρεσογόνους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες (Επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS).

2.1 Αναδιπλασιαστική γήρανση

Η αναδιπλασιαστική γήρανση περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Hayflick και Moorehead οι οποίοι κατά την καλλιέργεια φυσιολογικών ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών παρατήρησαν ότι τα κύτταρα είχαν πεπερασμένο όριο αναδιπλασιασμού, μετά το οποίο επέρχεται αναστολή του κυτταρικού κύκλου αλλά διατηρούνται η μεταβολική τους ενεργότητα (107,115). Το όριο αυτό ονομάζεται όριο του Hayflick.

Όπως ανακαλύφθηκε αργότερα η αναδιπλασιαστική γήρανση των κυττάρων σχετίζεται με την βράχυνση των τελομερών. Τα τελομερή είναι επαναλήψεις νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων οι οποίες τα προστατεύουν από αποικοδόμηση, ανασυνδυασμό και τυχαία σύντηξη με γειτονικά χρωμοσώματα (116). Στα σπονδυλωτά η αλληλουχία αυτών των επαναλήψεων είναι 5'-TTAGGG-3' με ένα μικρό κομμάτι μονόκλωνης προεξοχής στο 3' άκρο (117). Κατά την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων οι πολυμεράσες της αντιγραφής αδυνατούν να αντιγράψουν ολόκληρο το χρωμόσωμα μέχρι τις άκρες του και έτσι σε κάθε γύρο της αντιγραφής τα άκρα των χρωμοσωμάτων, που περιέχουν τα τελομερή, μικραίνουν (118). Το φαινόμενο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως *end replication problem* και είναι η αιτία για την απώλεια 50bp έως 200bp των τελομερών μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση (116). Όταν τα τελομερή φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος (4-7kb) (118) τότε αναγνωρίζονται από το κύτταρο ως βλάβες στο DNA και ενεργοποιούν τον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες (DDR) (119). Μάλιστα, για την ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR και την παύση του κυτταρικού κύκλου, αρκεί ένα τελομερές κάποιου χρωμοσώματος να φτάσει κάτω από το κρίσιμο μήκος (Εικόνα 6) (120). Ωστόσο υπάρχει ένα ένζυμο που επιμηκύνει τα τελομερή τοποθετώντας τελομερικές επαναλήψεις στο ασύζευκτο 3' άκρο των τελομερών και ονομάζεται τελομεράση (121). Η τελομεράση εκφράζεται στα γαμετικά κύτταρα και σε πολύ μικρές ποσότητες στα βλαστοκύτταρα, ενώ υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα. Τα σωματικά κύτταρα δεν διαθέτουν ενεργή τελομεράση λόγω έλλειψης της καταλυτικής επικράτειας του ενζύμου (122,123). Έτσι, τα τελομερή των σωματικών κυττάρων δεν επιμηκύνονται μετά την φθορά τους και αυτό οδηγεί σε μόνιμη παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αναδιπλασιαστική γήρανση. Τεχνητή έκφραση τελομεράσης σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα επιμήκυνε την διάρκεια ζωής τους στην καλλιέργεια (αριθμός αναδιπλασιασμών), μείωσε τον γηρασμένο φαινότυπο και τους προσέδωσε μεγάλο πολλαπλασιαστικό δυναμικό (124).



Εικόνα 6: Βράχυνση των τελομερών μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση [1]

2.2 Επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS

Εκτός από την φθορά των τελομερών πολλά εξωγενή και ενδογενή σήματα μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε γήρανση. Σημαντικότερα παραδείγματα στρεσογόνων παραγόντων είναι το οξειδωτικό στρες, η ακτινοβολία, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, το μηχανικό στρες, διάφοροι φαρμακολογικοί παράγοντες και βαρέα μέταλλα. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό ενεργοποιώντας έτσι τον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες αυτές (DDR). Αν οι βλάβες δεν επιδιορθωθούν το κύτταρο οδηγείται σε γήρανση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS καθώς η γήρανση προέρχεται άμεσα μετά την δράση αυτών των παραγόντων και πολύ γρηγορότερα από την αναδιπλασιαστική γήρανση. Κύρια διαφορά της πρόωρης γήρανσης από την αναδιπλασιαστική αποτελεί η μη εμπλοκή των τελομερών, καθώς η πρόωρη γήρανση συμβαίνει ανεξάρτητα από την φθορά των τελομερών παρόλο που και στις δύο περιπτώσεις ενεργοποιείται ο μηχανισμός DDR (123,125). Τα κύτταρα σε κατάσταση SIPS εμφανίζουν τα ίδια μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα σε αναδιπλασιαστική γήρανση, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω.

Από τους στρεσογόνους παράγοντες ιδιαίτερη σημασία έχει το οξειδωτικό στρες. Όπως προαναφέρθηκε τα κύτταρα εκτίθενται τόσο σε εσωτερικές όσο και σε εξωτερικές πηγές οξειδωτικού στρες. Τα μόρια του οξειδωτικού στρες, οι δραστικές

μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), δημιουργούν βλάβες στα περισσότερα μακρομόρια του κυττάρου συμπεριλαμβανομένου του DNA (87,126). Έτσι το οξειδωτικό στρες έχει δειχθεί ότι προκαλεί πρόωρη γήρανση σε πολλά είδη κυττάρων (127–130).

2.3 Χαρακτηριστικά-βιοδείκτες των γηρασμένων κυττάρων

- Το βασικότερο χαρακτηριστικό των κυττάρων που έχουν εισέλθει σε γήρανση είναι η έλλειψη πολλαπλασιαστικής δυνατότητας. Η εξακρίβωση της αναστολής της αντιγραφής των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους όπως η ενσωμάτωση νουκλεοτιδικών αναλόγων και η ανοσοαποτύπωση για συγκεκριμένες πρωτεΐνες χαρακτηριστικές της αναστολής του κυτταρικού κύκλου όπως η p21^{WAF1/CIP1} η p16^{INK4a} που θα αναλυθούν παρακάτω (131).
- Τα γηρασμένα κύτταρα ξεχωρίζουν και από το χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο και διογκωμένο σχήμα τους με ακανόνιστη μορφολογία (131). Το σχήμα αυτό οφείλεται σε αύξηση των επιπέδων της κινάσης FAK (Focal adhesion Kinase), της ιντεγκρίνης β1 και των μικρών GTPασών Rho Rac1 and Cdc42. Τα μόρια αυτά είναι καθοριστικά για την διαμόρφωση της κυτταρικής μορφολογίας, και η αύξηση τους στα γηρασμένα κύτταρα ρυθμίζεται από την καβεολίνη-1 (132). Επιπλέον, η απορρύθμιση του Ενδοπλασματικού Δικτύου φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία των μορφολογικών αλλαγών των γηρασμένων κυττάρων μέσω της απόκρισης στη μη ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response) που επάγει (133,134). Πρόσφατη μελέτη των Neurohr και συνεργατών υποστηρίζει ότι η αναλογία μεγέθους του κυτταροπλάσματος ως προς τον πυρήνα πρέπει να μην ξεπερνά ορισμένα όρια, καθώς πάνω από αυτά τα όρια τα κύτταρα αδυνατούν να ρυθμίσουν αποτελεσματικά την γονιδιακή έκφραση, την ενδο/διακυτταρική σηματοδότηση, αλλά και την εναλλαγή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες ανάγκες πρωτεϊνοσύνθεσης και η απορρύθμιση αυτή συνεισφέρει στην δημιουργία κυτταρικής γήρανσης (135).

- Μια από τις πιο χαρακτηριστικές διαφορές των γηρασμένων κυττάρων από τα φυσιολογικά κύτταρα είναι η συσσώρευση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση (131). Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα λυσοσωμικό ένζυμο το οποίο ανιχνεύεται σε pH:6 μόνο στα γηρασμένα κύτταρα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κύτταρα στα οποία ανιχνεύεται σε pH:4. Ως εκ τούτου αποτελεί πολύτιμο βιοδείκτη για την αναγνώριση γηρασμένων κυττάρων σε σχέση με νεαρά κύτταρα καθώς και κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας (Quiescent-G0). Η ανίχνευση δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιείται με την βοήθεια της χρωστικής X-gal η οποία μετά από διάσπαση από το ένζυμο σε pH:6 δίνει μπλε χρώμα (136). Αποτελεί τον πιο διαδεδομένο βιοδείκτη γηρασμένων κυττάρων αλλά και έναν από τους πρώτους που χρησιμοποιήθηκαν (131) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική μπλε χρώση γηρασμένων κυττάρων (από μελέτες του εργαστηρίου)

- Η αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που εμφανίζονται στα γηρασμένα κύτταρα με την πιο ενδιαφέρουσα μορφή αυτού του φαινομένου να είναι οι εστίες ετεροχρωματίνης σχετιζόμενες με την γήρανση (SAHF) (134). Οι εστίες ετεροχρωματίνης SAHF χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη κλασσικών δεικτών ετεροχρωματίνης, όπως η τριμεθυλωμένη Λυσίνη 9 στην Ιστόνη 3 (H3K9me3) και η πρωτεΐνη HP1 (Heterochromatin Protein 1). Οι εστίες SAHF περιέχουν γονίδια στόχους των μεταγραφικών παραγόντων E2F και στρατολογούν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος RB η οποία οδηγεί σε σταθερή καταστολή της έκφρασής τους, επάγοντας έτσι την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την γήρανση (137). Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στα γηρασμένα κύτταρα σε εστίες SAHF μεσολαβείται από την μείωση των επιπέδων της Λαμίνης B1 του ελάσματος του πυρηνικού φακέλου

(138), η οποία είναι αποτέλεσμα καταβολισμού της μέσω αυτοφαγίας (139,140) και αποσταθεροποίησης του mRNA της (132,141). Η αποικοδόμηση της Λαμίνης B1 με τη σειρά της οδηγεί στον εντοπισμό θραυσμάτων χρωματίνης στο κυτταρόπλασμα (CCFs) των γηρασμένων κυττάρων τα οποία είναι πλούσια σε τριμεθυλιωμένη Λυσίνη 9 στην Ιστόνη 3 (H3K9me3) και τα οποία αποικοδομούνται μέσω αυτοφαγίας (142). Επιπλέον, επειδή στα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζεται συσσώρευση βλαβών στο DNA, ως βιοδείκτης για την κυτταρική γήρανση χρησιμοποιείται και η φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2AX (γ -H2AX), εστίες της οποίας εντοπίζονται στα σημεία των βλαβών αμέσως μετά την δημιουργία της βλάβης και βοηθούν στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης τους (143), ωστόσο επειδή και άλλα είδη κυττάρων συσσωρεύουν βλάβες η ύπαρξή της δεν είναι αποκλειστική για τα γηρασμένα κύτταρα (132).

- Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα γηρασμένα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά καθώς εκκρίνουν μια πληθώρα παραγόντων που συνολικά αποτελούν τον εκκριτικό φαινότυπο σχετιζόμενο με την γήρανση (SASP) (110,144). Διάφορα διαλυτά και μη διαλυτά μόρια αποτελούν αυτόν τον φαινότυπο όπως φλεγμονώδεις κυτοκίνες, χημειοκίνες, αυξητικοί και αγγειογόνοι παράγοντες, καθώς και μεταλοπρωτεϊνάσες εξωκυτταρικής μήτρας (MMP) (110). Η σύνθεση του φαινοτύπου SASP ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη κυττάρων, αλλά και οι λειτουργίες αυτού του φαινοτύπου διαφέρουν ως προς τα αποτελέσματα που επάγουν, δρώντας έτσι ως «εργαλείο» μέσω του οποίου η κυτταρική γήρανση ασκεί την πλειοτροπική δράση της, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (131,134). Μόρια όπως ο αυξητικός παράγοντας TGF β εμπλέκονται στην παρακρινή δράση του SASP επηρεάζοντας το μικροπεριβάλλον και επάγοντας την κυτταρική γήρανση σε γειτονικά κύτταρα (145), ένα φαινόμενο που ονομάζεται senescence induced senescence (146). Αντίθετα, μόρια όπως η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8) δρουν αυτοκρινώς προάγοντας την κυτταρική γήρανση κυρίως μέσω ενίσχυσης της ενεργοποίησης του μονοπατιού απόκρισης στις βλάβες του DNA (147) ή μέσω αναστολής των κινασών MEK-ERK (148). Άλλες δυνατότητες του SASP αποτελούν η επαγωγή της ανοσολογική απόκρισης, και η επιδιόρθωση ιστών. Φαίνεται όμως πως έχει και διττό ρόλο

στην καρκινογένεση καθώς λόγω της ενεργοποίησης της ανοσολογικής απόκρισης διατηρεί την ομοιόσταση των ιστών μέσω της καταστροφής καρκινικών κυττάρων (149) αλλά μέσω μορίων του, όπως ο VEGF, προωθεί την αγγειογένεση και άρα επάγει την καρκινογένεση (150). Ενδιαφέρον είναι ότι η επαγωγή του SASP γίνεται μόνο σε καταστάσεις που δημιουργούνται βλάβες στο DNA και όχι από απλή αναστολή του κυτταρικού κύκλου (144). Η επαγωγή του εκκριτικού φαινοτύπου ρυθμίζεται συνδυαστικά από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κβ και CEBPβ (CCAAT/ enhancer-binding protein-β) και τα μόρια μέλη του SASP δημιουργούν θετική ανατροφοδότηση για την ενεργοποίηση αυτού του εκκριτικού φαινοτύπου (151,152). Πρόσφατα βρέθηκε ότι και η πρωτεΐνη ATM του μηχανισμού απόκρισης στις βλάβες του DNA συμμετέχει στην ρύθμιση της έκφρασης των μορίων του SASP απομακρύνοντας την ιστόνη macroH2A1 από τα γονίδια των μορίων αυτών ως απόκριση σε βλάβες που προκαλούνται από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων (131,153).

- Παρόλο που η κυτταρική γήρανση και η απόπτωση είναι δύο αντίθετες κατευθύνσεις που μπορεί να ακολουθήσει ένα κύτταρο υπό στρες, αν τελικά επικρατήσει η κυτταρική γήρανση, τα γηρασμένα κύτταρα αποκτούν αντίσταση σε αποπτωτικά σήματα (134). Γηρασμένα κύτταρα έδειξαν μεγαλύτερη αντίσταση σε απόπτωση παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (154) ή λόγω έλλειψης θρεπτικών σε σχέση με νεαρά κύτταρα (155). Πρόσφατα οι Yosef και συνεργάτες έδειξαν ότι σε γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-W και BCL-XL ,προσφέροντας έναν μηχανιστικό λόγο για την αντίσταση στην απόπτωση που είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες (156). Επιπλέον, τόσο οι ίδιοι ερευνητές όσο και άλλοι απέδειξαν ότι η φαρμακολογική αναστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων μέσω απόπτωσης (134,156–158).

2.5 Σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε κυτταρική γήρανση

Τόσο η βράχυνση των τελομερών όσο και οι διάφοροι ενδογενείς και εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο στην γήρανση (131). Η δράση αυτών των ερεθισμάτων συγκλίνει στην πρόκληση βλαβών στο DNA και ο λόγος επαγωγής κυτταρικής γήρανσης θεωρείται από πολλούς πως είναι η ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στις βλάβες αυτές. Στα θηλαστικά δύο είναι τα κύρια μονοπάτια που εμπλέκονται στον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες (DDR) τα οποία μπορούν να προκαλέσουν παύση του κυτταρικού κύκλου και κατά συνέπεια θεωρούνται ογκοκατασταλτικά μονοπάτια, το μονοπάτι p53/p21^{WAF1/CIP1} και το μονοπάτι p16INK4a /pRB (159)(Εικόνα 8).

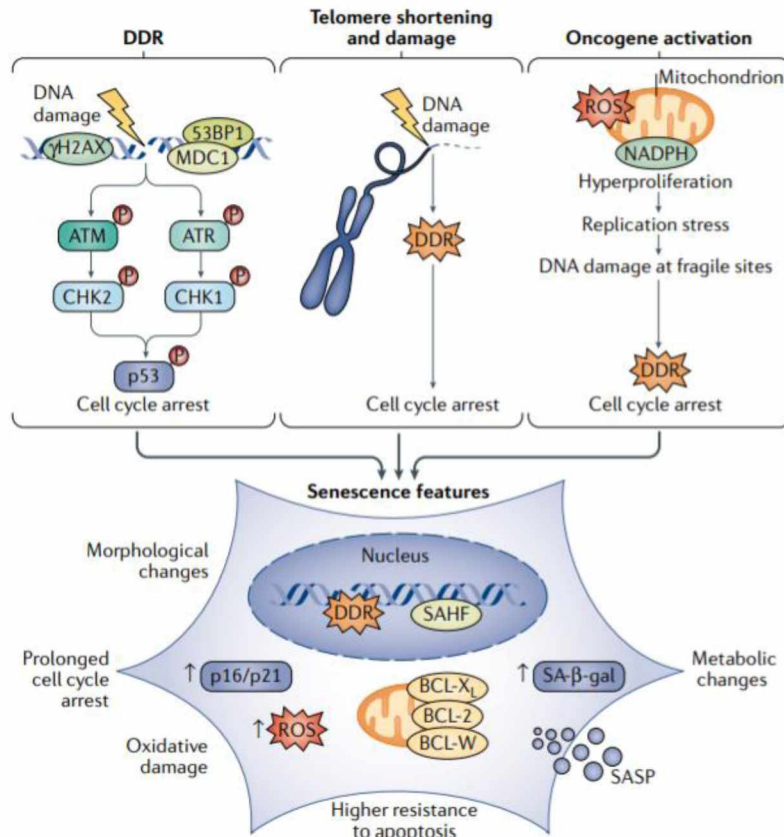
➤ **Μονοπάτι p53/p21^{WAF1/CIP1}**

Το μονοπάτι p53/p21^{WAF1/CIP1} μεσολαβείται από τις πρωτεΐνες p53 και p21^{WAF1/CIP1}. Η πρωτεΐνη p53 έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα και θεωρείται από τις πιο σημαντικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες λόγω της ικανότητας της να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που επάγουν την παύση του κυτταρικού κύκλου (90). Σε φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα της p53 διατηρούνται χαμηλά με τη βοήθεια της E3 λιγάσης ουβικουτίνης Mdm2 (160) η οποία συνδέεται στην p53 και επάγει την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος, αποτρέποντας έτσι την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (161,162). Σε περίπτωση δημιουργίας βλαβών στο DNA διάφορες πρωτεΐνες αισθητήρες αναγνωρίζουν τις βλάβες και ενεργοποιούν τις πρωτεϊνικές κινάσες ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related kinase) (110). Η αναγνώριση των μονόκλωνων ρήξεων στο DNA γίνεται από την πρωτεΐνη RPA (Replication Protein A) και το σύμπλοκο RAD9-RAD1-HUS1 ενώ ως αισθητήρες ρήξεων και στις δύο αλυσίδες DNA δρα η πρωτεΐνη 53BP1 και το σύμπλοκο MRE11-RAD50-NBS1 (110). Η ανίχνευση δίκλωνων ρήξεων οδηγεί σε ενεργοποίηση της ATM κινάσης ενώ οι μονόκλωνες ρήξεις ενεργοποιούν την κινάση ATR προσελκύοντας τις στο σημείο της βλάβης (163). Ακολούθως οι ATM και ATR φωσφορυλιώνουν την ιστόνη H2AX στο σημείο της βλάβης μετατρέποντας την σε γH2AX, ο εντοπισμός της οποίας σηματοδοτεί τις εστίες βλάβης (164) προσελκύοντας ως εκ τούτου περισσότερα μόρια ATM και ATR και ενισχύοντας τον μηχανισμό DDR (110,163). Η αύξηση των επιπέδων ATM και ATR οδηγεί καθοδικά στην φωσφορυλίωση των κινασών CHK1

και CHK2 αντίστοιχα οι οποίες στην συνέχεια θα φωσφορυλιώσουν την πρωτεΐνη p53 (110) αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή της με την mdm2 και επάγοντας την δράση της (165). Η ενεργοποιημένη πλέον p53 αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης p21^{WAF1/CIP1} η οποία αποτελεί άμεσο μεταγραφικό της στόχο (166). Η p21^{WAF1/CIP1} ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (CDKIs) έχοντας ως εκ τούτου την ικανότητα να αναστέλλει τα σύμπλοκα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών 1, 2 και 3 (CDK1/2/3) , τα οποία φυσιολογικά ρυθμίζουν την εναλλαγή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας έτσι σε παύση του κυτταρικού κύκλου (110,167).

➤ Μονοπάτι p16^{INK4a} /pRB

Η πρωτεΐνη p16^{INK4a} είναι ένα εκ των τριών προϊόντων του γενετικού τόπου INK4a/ARF με ογκοκατασταλτική δράση και κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2A (110,113). Όπως υποστηρίζεται από την βιβλιογραφία η έκφραση της p16^{INK4a} συντηρεί την κυτταρική γήρανση σε αντίθεση με την p21^{WAF1/CIP1} που είναι απαραίτητη για την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (159). Η p16^{INK4a} έχει δράση αναστολέα συμπλόκων κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) και συγκεκριμένα των CDK4 και CDK6 με τις οποίες συνδέεται και αναστέλλει την δημιουργία συμπλόκων τους με την κυκλίνη D (110,168). Η αναστολή αυτών των συμπλόκων έχει ως αποτέλεσμα την υποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRB. Η pRB είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος η οποία σε υποφωσφορυλιωμένη κατάσταση συνδέεται στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F αναστέλλοντας την δράση τους μέσω δημιουργίας συμπλόκων μαζί τους (110). Δεδομένου ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που προωθούν την G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή της δράσης τους από την υποφωσφορυλιωμένη pRB οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση αυτή (110,169). Επιπλέον, το δεύτερο προϊόν του γονιδίου CDKN2A, η πρωτεΐνη p14^{ARF}, αποτελεί κρίκο σύνδεσης των μονοπατιών p53/p21^{WAF1/CIP1} και p16^{INK4a} /pRB, καθώς η p14^{ARF} αλληλεπιδρά με την λιγάση Mdm2 αναστέλλοντας την αποικοδόμηση της p53 από αυτήν με έναν τρόπο που μεσολαβείται από την ίδια την p53 (110,170).



Εικόνα 8: Αναπαράσταση των μονοπατιών που οδηγούν σε γήρανση και των χαρακτηριστικών των γηρασμένων κυττάρων (131)

2.6 Καβεολίνη-1 και γήρανση

Η σχέση της καβεολίνης-1 με την κυτταρική γήρανση είναι περίπλοκη καθώς πολλές μελέτες συνδέουν την αύξηση των επιπέδων της με επαγωγή της αναδιπλασιαστικής και της πρόωρης γήρανσης, ενώ κάποιες άλλες μελέτες κάνουν λόγο για προστατευτική δράση της καβεολίνης-1 ενάντια στην γήρανση των κυττάρων κυρίως μέσω διατήρησης της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε ότι η καβεολίνη-1 ρυθμίζει ποικιλοτρόπως την κυτταρική γήρανση, άλλωστε είναι γνωστό ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει με πολλούς τρόπους στην κυτταρική σηματοδότηση όπως αναλύθηκε παραπάνω (5).

2.6.1 Ενδείξεις για επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης από την καβεολίνη-1

I. Αναδιπλασιαστική γήρανση και καβεολίνη-1

Η καβεολίνη-1 φαίνεται πως παίζει θετικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της αναδιπλασιαστικής κυτταρικής γήρανσης, καθώς αύξηση των επιπέδων της επιβεβαιώνεται σε πολλά είδη γηρασμένων κυττάρων από πολλές μελέτες (171–176). Ιδιαίτερο παράδειγμα αποτελούν τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση των οποίων παρατηρείται αύξηση των επιπέδων καβεολίνης-1, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της ικανότητας διαφοροποίησής τους προς αδιποκύτταρα (171). Η απώλεια της ικανότητας διαφοροποίησης αποτελεί χαρακτηριστικό της γήρανσης των βλαστοκυττάρων (131). Επιπλέον ενδείξεις για την θετική σχέση καβεολίνης-1 και αναδιπλασιαστικής γήρανσης προέρχονται από μελέτες σίγησης της έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Σε γηρασμένους ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες αναστολή της έκφρασης της καβεολίνης-1 οδήγησε σε αποκατάσταση της απόκρισης σε σήματα αυξητικών παραγόντων και συγκεκριμένα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) (177), η οποία προηγουμένως είχε παρατηρηθεί ότι αναστέλλεται λόγω αυξημένων επιπέδων καβεολίνης-1 (176). Ως αποτέλεσμα της αποκατάστασης της EGF σηματοδότησης παρατηρήθηκε επανέισοδος των γηρασμένων κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, η οποία συνοδευόταν με μείωση των επιπέδων των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και p16 και ενίσχυση της σύνθεσης DNA (177). Επιπλέον η σίγηση της καβεολίνης-1 σε γηρασμένους ινοβλάστες έχει και ακόμα μια απρόσμενη συνέπεια, την επιστροφή των κυττάρων στο αρχικό νεαρό χαρακτηριστικό σχήμα τους μέσω μείωσης των επιπέδων της κινάσης FAK (focal adhesion kinase) (178). Επομένως, κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση τα επίπεδα καβεολίνης-1 είναι αυξημένα και αυτό συμβάλλει στην υιοθέτηση του χαρακτηριστικού γηρασμένου σχήματος αλλά και στην αναστολή της απόκρισης σε αυξητικούς παράγοντες. Επιπλέον, μελέτες σε οργανισμούς μοντέλα αποδεικνύουν και *in vivo* την θετική σχέση της καβεολίνης-1 με την αναδιπλασιαστική γήρανση. Συγκεκριμένα, σε ποντίκια που έχουν τροποποιηθεί ώστε να μην εκφράζουν καβεολίνη-1 παρατηρήθηκε αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα σε διάφορους τύπους κυττάρων (66), ενώ αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 έχουν παρατηρηθεί σε εγκεφαλικούς ιστούς και νευρικά κύτταρα γηρασμένων ποντικών (179,180). Επιπλέον, σίγηση της καβεολίνης-1 στον νηματώδη σκώληκα *C. elegans* επιμηκύνει την διάρκεια ζωής του, μέσω μείωσης της σηματοδότησης της ινσουλίνης και των

ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων (181). Επίσης, αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 έχουν παρατηρηθεί και σε ανθρώπινους ιστούς όπως για παράδειγμα σε γηρασμένα κύτταρα του προστάτη (182).

Π. Επαγόμενη από στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS και καβεολίνη-1

Δεδομένης της σχέσης της καβεολίνης-1 με το οξειδωτικό στρες αλλά και με άλλες μορφές στρες, είναι λογικό το γεγονός ότι η καβεολίνη-1 εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης επαγόμενης από στρες. Πρώτες ενδείξεις για την συμμετοχή της καβεολίνης-1 στο SIPS προέκυψαν από την μελέτη των Volonte και συνεργατών (183), οι οποίοι χρησιμοποιώντας υποτοξικές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 παράλληλα με την εγκαθίδρυση πρόωρης γήρανσης. Επιπλέον, η μελέτη αυτή προσέφερε και τις πρώτες πληροφορίες για άμεση ρύθμιση της καβεολίνης-1 από το οξειδωτικό στρες, καθώς το υπεροξείδιο του υδρογόνου οδήγησε σε ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της καβεολίνης-1 και αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου. Αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 έχουν παρατηρηθεί και σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, τα οποία θεωρούνται πρόωρα γηρασμένα κύτταρα λόγω οξειδωτικού στρες, (184), ενώ πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε ότι τα ήδη αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα εμποδίζουν την αύξηση της καβεολίνης-1 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε απορρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού της και τελικά σε συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών στο DNA (98). Περαιτέρω ενδείξεις για τη σχέση της καβεολίνης-1 με την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση παρέχει και η μελέτη των Wang και συνεργατών, όπου η οξειδωμένη μορφή της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (oxLDL) επάγει την αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 αλλά και της υπομονάδας p47phox του ενζύμου NADPH οξειδάση το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ROS, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται στα μικροσπήλαια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πρόωρη γήρανση των μακροφάγων (185). Επιπλέον, η καβεολίνη-1 εμπλέκεται στην πρόωρη γήρανση κυττάρων από μεσοσπονδυλίους δίσκους μετά την εφαρμογή οξειδωτικού στρες *in vitro*, καθώς σίγηση της ανέστρεψε τον γηρασμένο φαινότυπο (186). Εφαρμογή και άλλων παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν πρόωρη κυτταρική γήρανση λόγω βλαβών στο DNA, όπως το χημειοθεραπευτικό φάρμακο μπλεομυκίνη, έχει διεχθεί ότι οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 (187).

2.6.2 Αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με μόρια σηματοδοτικών μονοπατιών της γήρανσης

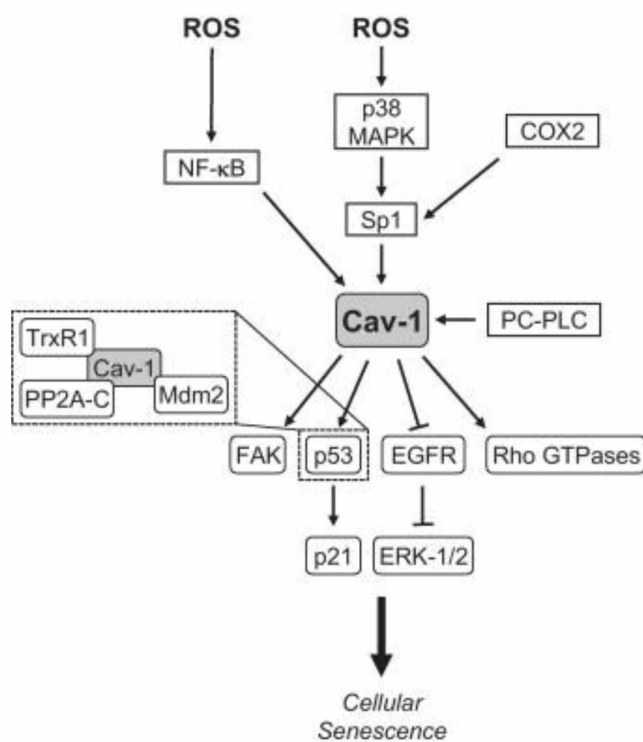
Η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με πολλά μόρια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη γήρανση και κυρίως με την απόκριση σε γενοτοξικές βλάβες (Εικόνα 9). Το κύριο μονοπάτι στο οποίο εντοπίζεται η δράση της καβεολίνης-1 είναι το μονοπάτι p53/p21^{Cip1/WAF1}. Το μονοπάτι αυτό το οποίο περιγράφηκε παραπάνω είναι το πιο σημαντικό ρυθμιστικό μονοπάτι της κυτταρικής γήρανσης αλλά και ο σημαντικότερος αισθητήρας βλαβών στο DNA. Μέσω αυτού του μονοπατιού η καβεολίνη-1 επάγει την πρόωρη γήρανση ως απόκριση στο στρες (SIPS) (10).

Ένα από τα σημαντικότερα μόρια που καθορίζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού είναι η λιγάση Mdm2. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η λιγάση Mdm2 συνδέεται με το p53 ουβικουιτινώνοντας το, επάγοντας έτσι την αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Είναι λοιπόν ένας αρνητικός ρυθμιστής του p53 (5). Η καβεολίνη-1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την mdm2 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και να την μεταφέρει στα μικροσπήλαια μακριά από το p53, σταθεροποιώντας έτσι το p53 και βοηθώντας στην επαγωγή κυτταρικής γήρανσης. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι εφικτή μέσω της επικράτειας ικριώματος (CSD) της καβεολίνης-1 την οποία αναγνωρίζει και συνδέεται η λιγάση mdm2 καθώς διαθέτει το χαρακτηριστικό μοτίβο σύνδεσης στην καβεολίνη-1 (CBM). Η σύνδεση της λιγάσης με την καβεολίνη-1 είναι ανταγωνιστική σε σχέση με το p53 καθώς η περιοχή αλληλεπίδρασης του p53 με την Mdm2 αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή πρόσδεσης της καβεολίνης-1 (188). Έτσι, όταν η καβεολίνη-1 συνδεθεί πρώτη με την mdm2 αποφεύγεται η αλληλεπίδραση της δεύτερης με το p53 και επάγεται η κυτταρική γήρανση. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση υποστηρίζεται από παρόμοια αποτελέσματα και σε άλλα είδη κυττάρων (189,190).

Το οξειδωτικό στρες μέσω των βλαβών που δημιουργεί στο DNA, επάγει την ενεργοποίηση της κινάσης ATM, η οποία στη συνέχεια θα φωσφορυλιώσει το p53 σταθεροποιώντας το και επάγοντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική γήρανση. Σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες οξειδωτικού στρες η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με την καταλυτική υπομονάδα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A-C), η οποία είναι ένα μόριο αναστολέας της ATM, και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε μεταφορά της PP2A-C στα μικροσπήλαια της πλασματικής μεμβράνης. Επομένως, η καβεολίνη-1 είναι ένας

ανοδικός ενεργοποιητής της ATM συμμετέχοντας και μέσω αυτού του τρόπου στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης (191).

Ακόμα ένα μόριο που ρυθμίζει τα επίπεδα του p53 είναι η αποακετυλάση ιστονών κλάσεως III Sirt1. Η δράση της Sirt1 ρυθμίζεται από τα επίπεδα NAD^+ στο κύτταρο και επομένως είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το οξειδωτικό στρες (192). Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες επάγεται η φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 στο κατάλοιπο Tyr14 μέσω ενεργοποίησης της κινάσης p38 MAPK (95). Αυτή η μετα-μεταφραστική φωσφορυλίωση δρα ως σήμα για την αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με την Sirt1, την μεταφορά της Sirt1 στα μικροσπύλαια και την αλληλεπίδρασή της με την καβεολίνη-1 η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της Sirt1. Η απενεργοποιημένη Sirt1 αδυνατεί να αποακετυλιώσει τον μεταγραφικό παράγοντα p53 και έτσι ο ακετυλιωμένος και ενεργός p53 ενεργοποιεί καθοδικά μόρια στόχους του όπως το p21, οδηγώντας στην εγκαθίδρυση κυτταρικής γήρανσης (5,192). Η αλληλεπίδραση καβεολίνης-1/Sirt1 γίνεται μέσω σύνδεσης της επικράτειας ικριώματος της καβεολίνης-1 με το μοτίβο Caveolin Binding Motif (CBM) που διαθέτει η Sirt1 (192).



Εικόνα 9: Σύνοψη των μονοπατιών μέσω των οποίων δρα η καβεολίνη-1 ρυθμίζει την κυτταρική γήρανση (193)

2.6.3 Ενδείξεις προστατευτικού ρόλου της καβεολίνης-1 έναντι στην κυτταρική γήρανση

Η ικανότητα της καβεολίνης να δρα προστατευτικά έναντι της εγκαθίδρυσης πρόωρης κυτταρικής γήρανσης οφείλεται κυρίως στην ιδιότητα της να ρυθμίζει την λειτουργία των μιτοχονδρίων (65). Σε πολλά είδη κυττάρων η απορρύθμιση της έκφρασης της καβεολίνης-1 οδήγησε σε εμφάνιση πρόωρης γήρανσης λόγω δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων (194), κάτι που πιθανώς οφείλεται στην συμμετοχή της καβεολίνης-1 στην διατήρηση της ρευστότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ρυθμίζοντας τα επίπεδα χοληστερόλης σε αυτή (62), αλλά και στον εντοπισμό μιας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης τύπου m-AAA (AFG3L2) στα μιτοχόνδρια η οποία είναι καίριας σημασίας για την λειτουργία τους (65). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη από τους Jeffries και συνεργάτες έδειξε ότι η σίγηση της καβεολίνης-1 σε ανθρώπινους ινοβλάστες προωθεί την αποικοδόμηση της κινάσης Aurora A (AURKA) μέσω του πρωτεασώματος η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε δημιουργία του primary cilium, το οποίο σηματοδοτεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και έτσι την επαγωγή της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης (195).

3. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αποτελεί έναν ενδοκυτταρικό μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει την αποικοδόμηση κατεστραμμένων κυτταρικών οργανιδίων, περιοχών του κυτταροπλάσματος και μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω των λυσοσωμάτων, με σκοπό την διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων (196). Είναι μια εξελικτικά διατηρημένη διαδικασία μεταξύ των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς η ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη (197). Τρεις τύποι αυτοφαγίας έχουν παρατηρηθεί σε κύτταρα θηλαστικών, η μικροαυτοφαγία, η αυτοφαγία μεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς και η μακροαυτοφαγία. Και τα τρία είδη αυτοφαγίας οδηγούν σε μεταφορά των υποστρωμάτων στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση ή ανακύκλωση (198). Η μακροαυτοφαγία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη των αυτοφαγοσωμάτων, οργανιδίων με διπλή μεμβράνη τα οποία δημιουργούνται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει αρκετές πρωτεΐνες και οδηγεί στην σύντηξη τους με τα λυσοσώματα, σχηματίζοντας έτσι τα αυτολυσοσώματα στα οποία θα γίνει και η αποικοδόμηση του φορτίου τους (197) (Εικόνα 12). Δεδομένου ότι από τις τρεις μορφές η μακροαυτοφαγία είναι αυτή μέσω

της οποίας αποικοδομούνται τα περισσότερα συστατικά η παρούσα διπλωματική εργασία αναφέρεται σε αυτήν και από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται απλά ως αυτοφαγία.

Η αυτοφαγία επάγεται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών με σκοπό την ανακύκλωση στοιχείων αδιάκριτα για παροχή ενέργειας στο κύτταρο. Ωστόσο, πλέον γνωρίζουμε ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας μπορεί και να εμφανίζει εξειδίκευση όσον αφορά το φορτίο που αποικοδομείται εν τέλει στα αυτολυσοσώματα μια διαδικασία που συμβαίνει και σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών και έχει ως στόχο την απομάκρυνση κατεστραμμένων ή περιττών οργανιδίων ή την απομάκρυνση επιβλαβών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Έτσι, η αυτοφαγία διακρίνεται σε γενική και εκλεκτική (199,200). Μέσω της εκλεκτικής αυτοφαγίας αποικοδομούνται συγκεκριμένα υποστρώματα μέσω ειδικών μηχανισμών αναγνώρισης και απομόνωσής τους από το αυτοφαγόσωμα. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά είδη εκλεκτικής αυτοφαγίας στα θηλαστικά με χαρακτηριστικά τα παραδείγματα της λιποφαγίας (lipophagy, εκλεκτική αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών λιπιδικών σταγόνων), ριβοφαγίας (ribophagy, εκλεκτική αποικοδόμηση ριβοσωμάτων), της εκλεκτικής αποικοδόμησης πρωτεϊνών και της μιτοφαγίας (mitophagy, εκλεκτική αποικοδόμηση μιτοχονδρίων) (201).

3.1 Πρωτεΐνες της αυτοφαγίας

Στη δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων της αυτοφαγίας συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες οι οποίες είναι προϊόντα εξελικτικά συντηρημένων γονιδίων (ATGs) και ανάλογα με την λειτουργία και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που επιτελούν χωρίζονται σε 5 γκρουπ. Το πρώτο γκρουπ (i) περιλαμβάνει την κινάση Σερίνης/Θρεονίνης ULK1 (Unc-51-like kinase 1) και τις πρωτεΐνες FIP200, ATG13 και ATG101. Στο δεύτερο γκρουπ (ii) ανήκει η πρωτεΐνη ATG9 ενώ το τρίτο γκρουπ (iii) αποτελείται από την Vps34 (vacuolar protein sorting 34), την PI3K, την BECLIN-1, την pg15, την AMBPA1 και την ATG14L ή την UVRAG (UV radiation resistance associated gene protein). Η καταλυτική υπομονάδα του συμπλέγματος αυτού είναι η Vps34 η οποία μετατρέπει την φωσφατυδιλοϊνοσιτόλη (PI) σε 3-φωσφορική φωσφατυδιλοϊνοσιτόλη (PI-3-phosphate) και το σύστημα χαρακτηρίζεται ως κινάση της 3-φωσφατυδιλοϊνοσιτόλης κλάσης III (PI3KIII). Στο σύμπλεγμα (iv) ανήκουν οι πρωτεΐνες WIPI (WD repeat domain phosphoinositide-interacting) και ATG2 ενώ το σύμπλεγμα (v) είναι ένα σύστημα πρωτεϊνών με δράση

παρόμοια με αυτή των λιγασών ουβικουιτίνης και αποτελείται από τις πρωτεΐνες ATG12-ATG5- ATG16L και την οικογένεια LC3 (microtubule associated proteins 1 A/1B, MAP1LC3): LC3A, LC3B, LC3C (200). Κάθε ένα από αυτά τα συστήματα παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία του αυτοφαγοσώματος όπως θα εξηγηθεί παρακάτω.

3.2 Δημιουργία αυτοφαγοσώματος

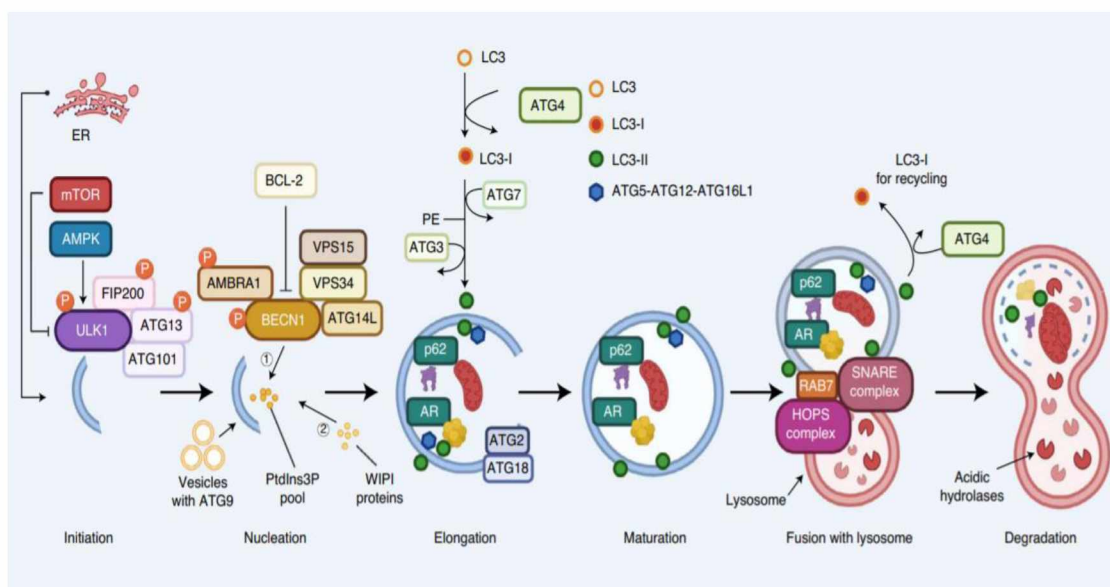
Για την δημιουργία ενός ώριμου και λειτουργικού αυτοφαγοσώματος πρέπει να ολοκληρωθούν 5 στάδια: Εκκίνηση, Εμπυρήνωση, Επέκταση, Ωρίμανση, Σύντηξη με το λυσόσωμα. Κατά την εκκίνηση της αυτοφαγίας, η δημιουργία του αυτοφαγοσώματος ξεκινάει από υποπεριοχές του Ενδοπλασματικού Δικτύου που αποτελούνται από λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε 3 φωσφορική-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη τα οποία ονομάζονται ωμεγασώματα (omegasomes) (202,203) αλλά και από άλλες μεμβρανικές πηγές (200,204,205). Από τις μεμβρανικές πηγές προκύπτει το φαγοφόρο, μία δομή διπλής μεμβράνης που αποτελεί την αρχική μορφή του αυτοφαγοσώματος (202). Τα διάφορα σήματα που οδηγούν σε εκκίνηση της αυτοφαγίας όπως η έλλειψη θρεπτικών, το οξειδωτικό στρες, η υποξία, το ενδοπλασματικό στρες μεταξύ άλλων έχουν ως κοινό στόχο την κινάση ULK1, η φωσφορυλίωση της οποίας θα επάγει την δημιουργία του φαγοφόρου σε συνεργασία με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του συμπλέγματος FIP200, ATG13 και ATG101 (200). Στη συνέχεια στο σημείο προσέρχονται κυστίδια που περιέχουν την πρωτεΐνη ATG9, η οποία αποτελεί άμεσο στόχο της ULK1 (206), τα οποία μεταφέρουν λιπίδια στο σημείο απαραίτητα για την συνέχιση της διαδικασίας. Σχεδόν ταυτόχρονα προσελκύεται στο σημείο το σύμπλοκο πρωτεϊνών PI3KC3 μετά από φωσφορυλίωση της BECLIN-1 από την ULK1 (207). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τοπικά PI3P το οποίο θα προσελκύσει με την σειρά του τις πρωτεΐνες WIPI ξεκινώντας την επιμήκυνση του φαγοφόρου. Η WIPI2 πρωτεΐνη έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την ATG16L του συμπλόκου πρωτεϊνών ATG12-ATG5-ATG16L (208). Στην επιμήκυνση του φαγοφόρου και την μετατροπή του σε αυτοφαγόσωμα συμμετέχουν δύο συστήματα πρωτεϊνών που καταλύουν αντιδράσεις παρόμοιες με την ουβικουιτίνωση. Το πρώτο σύστημα αποτελείται από τις πρωτεΐνες ATG12-ATG5-ATG16L (200). Αρχικά η πρωτεΐνη ATG12 συνδέεται στην ATG5 με την βοήθεια των ATG7 και ATG10, δύο ενζύμων με δράση παρόμοια με E1 ένζυμο ενεργοποιητή και E2 ένζυμο δέσμευσης ουβικουιτίνης αντίστοιχα (209,210).

Ακολουθεί η πρόσδεση του ATG16L στο σύμπλοκο το οποίο μέσω της σύνδεσης WIPI2-ATG16L προσελκύεται στην μεμβράνη του επιμηκνόμενου αυτοφαγοσώματος (208,211). Το δεύτερο σύστημα πρωτεϊνών που καταλύουν αντιδράσεις παρόμοιες με την ουβικουιτίνωση περιλαμβάνει την οικογένεια πρωτεϊνών LC3 (microtubule associated proteins 1 A/1B, MAP1LC3)(212). Το πρώτο βήμα καταλύεται από το την ATG4 πρωτεάση η οποία μετατρέπει την πρόιμη μορφή της LC3 (proLC3) στην κυτταροπλασματική μορφή της LC3-I (213,214). Στη συνέχεια η δράση των ATG7 και ATG3 ως E1 ένζυμο ενεργοποιητή και E2 ένζυμο δέσμευσης ουβικουιτίνης αντίστοιχα οδηγούν στην πρόσδεση της LC3-I σε μια ομάδα φωσφατιδυλεθνολαμίνης (PE) στην μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος μετατρέποντας την στην LC3-II μορφή η οποία ενσωματώνεται στην μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος και αποτελεί δείκτη δημιουργίας αυτοφαγοσωμάτων (215). Για την σωστή πρόσδεση της LC3-I στην φωσφατιδυλεθνολαμίνη του αυτοφαγοσώματος απαιτείται και η δράση του συμπλόκου ATG12-ATG5 που περιγράφηκε παραπάνω και το οποίο έχει δράση E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης (200). Με την σύνδεση της LC3-II στην μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος ολοκληρώνεται η επιμήκυνση του και έχει πλέον δημιουργηθεί το αυτοφαγόσωμα γύρω από ένα μέρος του κυτταροπλάσματος το οποίο στη συνέχεια θα αποικοδομηθεί (200) (Εικόνα 10). Αντίθετα, στην περίπτωση της εκλεκτικής αυτοφαγίας σε αυτό το σημείο συμμετέχουν και άλλα μόρια που δεν εμφανίζονται στην γενική αυτοφαγία (216). Τα μόρια αυτά ονομάζονται εκλεκτικοί υποδοχείς της αυτοφαγίας, όπως ο p62/SQSTM1 και η NBR1, και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να συνδέονται σε πολύ-ουβικουιτίνωμένα υποστρώματα αλλά και απευθείας στην LC3-II μέσω των μοτίβων LIR (LC3 Interacting Region) που διαθέτουν, οδηγώντας έτσι στην αυτοφαγική αποικοδόμηση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων που έχουν δεσμεύσει (217,218). Οι εκλεκτικοί υποδοχείς αποικοδομούνται επίσης μέσω αυτοφαγίας (216) (Εικόνα 11).

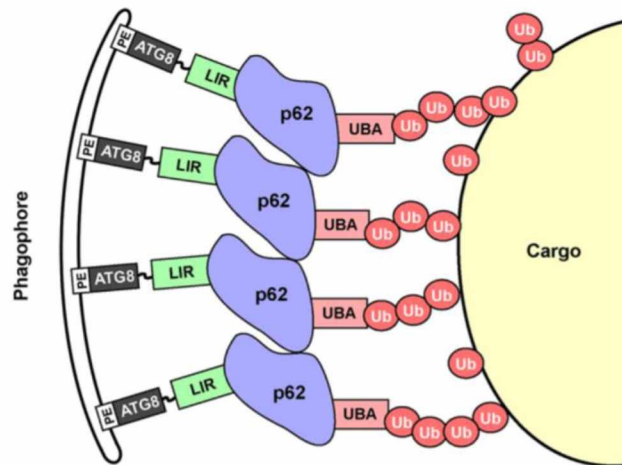
3.3 Δημιουργία αυτολυσοσώματος

Η περίπλοκη διαδικασία της αυτοφαγίας ολοκληρώνεται με την ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος, την σύντηξη του με το λυσόσωμα που δημιουργεί το αυτολυσόσωμα και την αποικοδόμηση του φορτίου (200). Η ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος μεσολαβείται από την LC3-II, η οποία συνδέεται με πρωτεΐνες όπως η FYCO1 (FYVE and coiled-coil protein 1) (219) και η JIP1 (220) μέσω των LIR

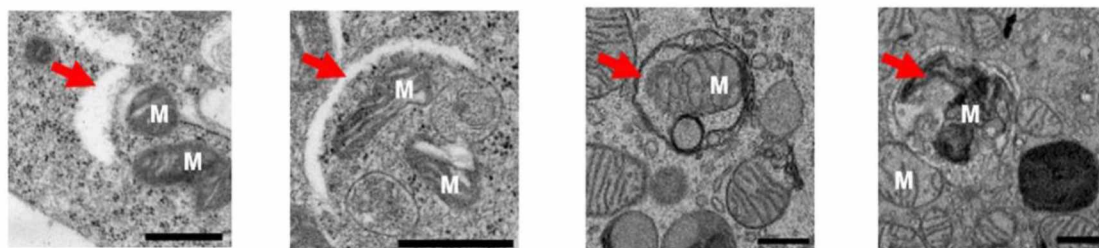
μοτίβων που περιέχουν (143). Η σύνδεση με αυτές τις πρωτεΐνες μεταφέρει τα αυτοφαγοσώματα μέσω των μικροσωληνίσκων σε περιοχές εντοπισμού των λυσοσωμάτων (200). Ακολουθεί η σύντηξη αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα η οποία διεκπεραιώνεται από τις πρωτεΐνες SNARE, οι οποίες συνδέονται τόσο με το αυτοφαγόσωμα όσο και με το λυσόσωμα και καταλύουν τις απαραίτητες αντιδράσεις για την σύντηξή τους (200). Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη SNARE υπεύθυνη για την σύντηξη αυτή είναι η STX17 (Syntaxin 17) η οποία εντοπίζεται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη των ώριμων αυτοφαγοσωμάτων και στα λυσοσώματα αλλά όχι στο φαγοφόρο, οδηγώντας έτσι σε σύντηξη του λυσοσώματος μόνο με τα ώριμα αυτοφαγοσώματα (221). Επιπλέον και η πρωτεΐνη ATG14L, σημαντικός ρυθμιστής του συστήματος PI3KII, εντοπίζεται στο ώριμο αυτοφαγόσωμα και προωθεί την σύνδεση της μεμβράνης του με το λυσόσωμα αλληλεπιδρώντας άμεσα με την STX17 (222). Επίσης πρόσφατη όπως έδειξαν οι Wilkinson και συνεργάτες η φωσφορυλίωση της LC3-II από τις κινάσες STK3/STK4 προωθεί την δημιουργία αυτολυσοσωμάτων (223), ενώ και η Rab7 μικρή GTPαση είναι απαραίτητη και για την σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα και την σωστή ολοκλήρωση του αυτοφαγικού μονοπατιού (224). Το περιεχόμενο του αυτολυσοσώματος αποικοδομείται από τις όξινες υδρολάσες του λυσοσώματος και τα θρεπτικά συστατικά που προκύπτουν επαναχρησιμοποιούνται από το κύτταρο (200) (Εικόνα 10)



Εικόνα 10: Στάδια δημιουργίας αυτοφαγοσώματος και αυτολυσοσώματος (225)



Εικόνα 11: Αλληλεπιδράσεις του p62 με τα υποστρώματά του και το φαγοφόρο (216).



Εικόνα 12: Τα διάφορα στάδια της αυτοφαγικής διαδικασίας υπό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Με το γράμμα M συμβολίζονται τα μιτοχόνδρια ενώ με το κόκκινο βέλος υποδεικνύονται τα στάδια της αυτοφαγίας (226).

3.4 Αυτοφαγία και οξειδωτικό στρες

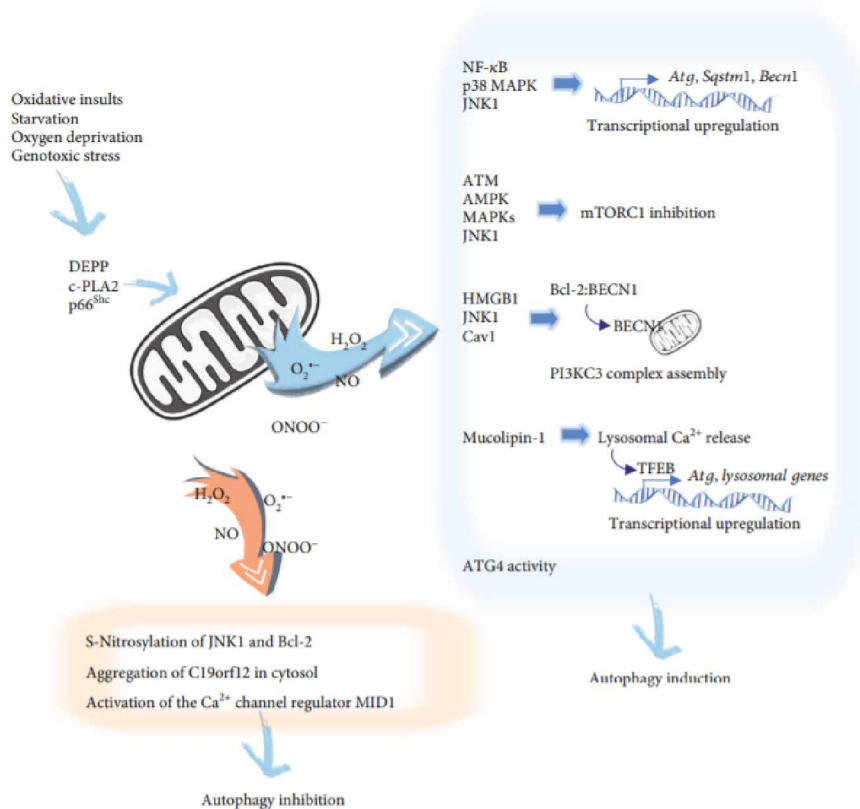
I. Επίδραση των ROS/RNS στην αυτοφαγία

Από τα δεδομένα πολλών μελετών είναι αδιαμφισβήτητη η σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και αυτοφαγίας. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας από τα ROS/RNS συμβαίνει μέσω πολλών μηχανισμών και σε πολλά στάδια της αυτοφαγικής διαδικασίας. Έκθεση επιθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς σε H_2O_2 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του εκλεκτικού υποδοχέα p62/SQSTM1 και του ATG10 η οποία μεσολαβείται από φωσφορυλίωση του NF- κ B (227). Επιπλέον, και άλλες πρωτεΐνες ATG της αυτοφαγίας υφίστανται αύξηση της έκφρασης τους ως συνέπεια της ενεργοποίησης του μονοπατιού p38/JNK από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (228,229), ενώ και η BECLIN-1 βρέθηκε αυξημένη μετά από φωσφορυλίωση της Bcl-2 από την JNK (141). Επιπλέον, η έκθεση σε H_2O_2 οδηγεί σε μετατόπιση της BECLIN-1 στα μιτοχόνδρια μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την καβεολίνη-1 και οδηγεί σε μιτοφαγία (23). Επίσης το οξειδωτικό

στρες ρυθμίζει και την δραστηριότητα του mTORC1 είτε μέσω απευθείας αναστολής του (230) είτε μέσω ενεργοποίησης της AMPK (231,232). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προωθούν επίσης την μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα TFEB στον πυρήνα όπου θα επάγει την μεταγραφή γονιδίων της αυτοφαγίας, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει σηματοδότηση μέσω Ca^{2+} (233). Όσον αφορά τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS), μελέτες υποστηρίζουν ότι αναστέλλουν την αυτοφαγία (234,235). Συγκεκριμένα το NO έχει ανασταλτικό ρόλο στην αυτοφαγία είτε μέσω ενός μηχανισμού που καταλήγει στην παρεμπόδιση δημιουργίας του συστήματος hVps34/Beclin 1 (236) είτε μέσω νιτροσυλίνωσης του TSC2 η οποία εμποδίζει την ανασταλτική δράση του TSC2 στην mTOR (237) (Εικόνα 13).

II. Αυτοφαγική αποικοδόμηση μορίων της αντιοξειδωτικής άμυνας

Η αυτοφαγία ρυθμίζει την απόκριση στο οξειδωτικό στρες μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει τον εκλεκτικό υποδοχέα της αυτοφαγίας p62/SQSTM1 και τον Nrf2 μεταγραφικό παράγοντα (238,239). Φυσιολογικά, ο Nrf2 συνδέεται με δύο μόρια του κυτταροπλασματικού παράγοντα Keap1 και αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε ουβικουιτίνωση και επομένως σε αποικοδόμηση του Nrf2 και άρα αναστέλλεται η επαγωγή της έκφρασης αντιοξειδωτικών γονιδίων. Μέσω του μοτίβου KIR που διαθέτει ο p62 συνδέεται άμεσα με τον Keap1, οδηγώντας έτσι στην αποικοδόμησή του μέσω αυτοφαγίας και στην άρση της ανασταλτικής του δράσης στον Nrf2 (240). Έτσι, ο Nrf2 εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται στα antioxidant-responsive elements των υποκινητών των γονιδίων αντιοξειδωτικών παραγόντων επάγοντας την έκφραση τους (238).



Εικόνα 13: Αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικού στρες παραγόμενο από μιτοχόνδρια και αυτοφαγίας (241)

3.5 Κυτταρική γήρανση και αυτοφαγία

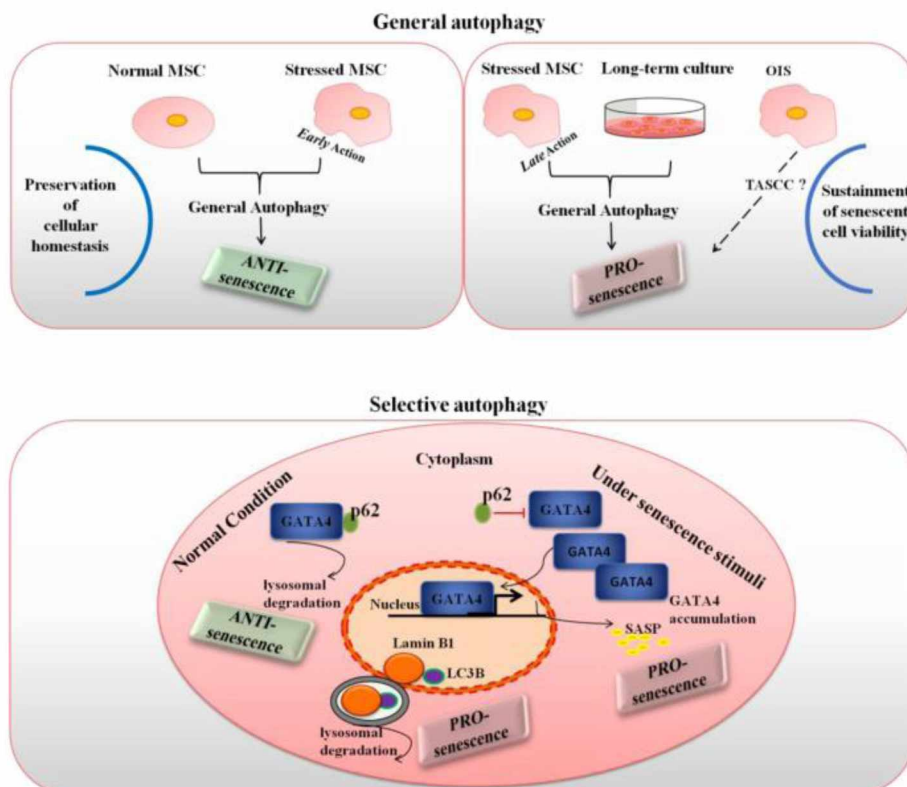
Η σχέση της αυτοφαγίας με την κυτταρική γήρανση παραμένει ασαφής μέχρι και σήμερα. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αυτοφαγία δρα προλαμβάνοντας την γήρανση και τις επιβλαβείς επιπτώσεις της ενώ υπό άλλες συνθήκες φαίνεται πως συμμετέχει στην εγκαθίδρυση ενός γηρασμένου φαινοτύπου. Ο πρωταρχικός ρόλος της αυτοφαγίας ως διαδικασία αποικοδόμησης κατεστραμμένων οργανιδίων ή βιομορίων δρα προστατευτικά έναντι στην γήρανση. Αυτού του είδους η αυτοφαγία που ονομάζεται και γενική αυτοφαγία καθυστερεί την εμφάνιση κυτταρικής γήρανσης καθώς φυσιολογικά τα μόρια αυτά θα συσσωρεύονταν και θα προκαλούσαν κυτταροτοξικότητα (242,243). Μελέτες *in vitro* αλλά και *in vivo* υποστηρίζουν αυτήν την θεωρία καθώς σίγηση των πρωτεϊνών της αυτοφαγίας ATG5 και ATG7 σε ανθρώπινους ινοβλάστες οδήγησε σε πρόωρη κυτταρική γήρανση (244), ενώ επαγωγή της αυτοφαγίας με διάφορους τρόπους σε γηρασμένα ποντίκια και μύγες *Drosophila* (245,246) αύξησε την διάρκεια ζωής τους, μέσω προστασίας από το

οξειδωτικό στρες (247). Ιδιαίτερα σημαντικός και ενδιαφέρον είναι ο ρόλος της γενικής αυτοφαγίας σε βλαστοκύτταρα, καθώς θεμελιώδη επίπεδα αυτοφαγίας διατηρούν τις ιδιότητες των βλαστοκυττάρων προστατεύοντάς τα από την κυτταρική γήρανση και την διαφοροποίηση (247–249). Ωστόσο, η γενική αυτοφαγία μπορεί να δρα και συντηρώντας την κυτταρική γήρανση καθώς σε ήδη γηρασμένα κύτταρα μειώνει το ποσοστό βλαβών που θα πρέπει να αντιμετωπίσουν αυτά τα κύτταρα και το οποίο θα οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο (242), ενώ πολλές μελέτες δείχνουν αύξηση των επιπέδων αυτοφαγίας κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση βλαστοκυττάρων (250,251). Επιπλέον, η αυτοφαγία επάγει την έκφραση των μορίων του SASP φαινοτύπου κατά την γήρανση επαγόμενη από ογκογονικό στρες (252), ενώ οι Narita και συνεργάτες έδειξαν ότι αυτό συμβαίνει λόγω συνεντοπισμού των αυτολυσοσωμάτων και της mTOR σε ειδικά κυτταρικά διαμερίσματα που ονομάζονται TASC (TOR-autophagy spatial coupling compartment) (253).

Η αυτοφαγική αποικοδόμηση συγκεκριμένων υποστρωμάτων, που ονομάζεται εκλεκτική αυτοφαγία, έχει επίσης διαφορούμενη σχέση με την γήρανση ανάλογα το υπόστρωμα που θα αποικοδομηθεί (247). Ο GATA4 είναι σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για την ενεργοποίηση της έκκρισης πολλών μορίων του SASP εκκριτικού φαινοτύπου σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κβ. Η αυτοφαγική αποικοδόμηση του GATA4 μέσω του p62/SQSTM1 δρα ανασταλτικά στην κυτταρική γήρανση, καθώς σε γηρασμένους ινοβλάστες βρέθηκε ότι η αποικοδόμηση του GATA4 μέσω αυτοφαγίας είχε ανασταλεί (254). Αντιθέτως, μέσω εκλεκτικής αυτοφαγίας αποικοδομούνται και συστατικά του πυρήνα, κάτι που σηματοδοτεί την εγκαθίδρυση της γήρανσης. Συγκεκριμένα, οι Dou και συνεργάτες έδειξαν ότι η LC3B εντοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρώντας με την Λαμίνη Β1 υπό συνθήκες ογκογονικού στρες οδηγεί στην αποικοδόμησή της. Παράλληλα όμως με την Λαμίνη Β1 αποικοδομούνται και επικράτειες χρωματίνης σχετιζόμενες με Λαμίνη (LADs) οδηγώντας έτσι σε εγκαθίδρυση της γήρανσης (255) (Εικόνα 14).

Η σχέση της αυτοφαγίας με την κυτταρική γήρανση και κυρίως την επαγόμενη από στρες μορφή της μεσολαβείται και από τον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες, καθώς οι βλάβες στο DNA ενεργοποιούν την αυτοφαγία αλλά και η ελαττωματική αυτοφαγία ενεργοποιεί τον DDR. Ο μεγαλύτερος ρυθμιστής του DDR, η πρωτεΐνη p53, ασκεί διαφορετική ρύθμιση στην αυτοφαγία ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Όταν βρίσκεται στον πυρήνα επάγει την έκφραση των Sestrin1 και Sestrin2, δύο πρωτεϊνών που βοηθούν στην ενεργοποίηση της AMPK, επιτρέποντάς

της έτσι να ενεργοποιήσει την αυτοφαγία με τον τρόπο που αναλύθηκε παραπάνω (256,257). Παράλληλα η p53 επάγει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες β της AMPK, οι οποίες είναι καθοριστικές για την σωστή λειτουργία της, ενώ επάγει και την έκφραση του tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) το οποίο μετά την φωσφορυλίωση του από την AMPK αναστέλλει την mTOR ενεργοποιώντας την αυτοφαγία (258). Από την άλλη όταν η p53 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, κυρίως σε κύτταρα που δεν είναι υπό στρες, φαίνεται πως δρα ανασταλτικά στην αυτοφαγία (259,260). Επιπλέον, μια μελέτη από τους Morselli και συνεργάτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα έδειξε ότι η p53 συνδέεται απευθείας με την FIP200 πρωτεΐνη και αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην αναστολή της αυτοφαγίας (261). Ένας ακόμα ρυθμιστής της αυτοφαγίας με καίρια συμμετοχή στο μηχανισμό DDR είναι η κινάση ATM. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (ROS/RNS) η ATM ενεργοποιεί το TSC2 το οποίο οδηγεί στην αναστολή της mTOR και στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας (262,263). Επιπλέον, σε υποξικές συνθήκες η ATM φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α κάτι που οδηγεί σε αναστολή του mTORC1 και ενεργοποίηση της αυτοφαγίας (264).



Εικόνα 14: Ο διττός ρόλος της αυτοφαγίας στην κυτταρική γήρανση (265)

4. Αυτοφαγία και Καβεολίνη-1

Τα δεδομένα για την σχέση της καβεολίνης-1 με την αυτοφαγία μέχρι και σήμερα δεν έχουν καταλήξει σε μια ξεκάθαρη εικόνα, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η καβεολίνη-1 είναι αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας και άλλες που θεωρούν ότι η καβεολίνη-1 έχει θετικό αποτέλεσμα στην επαγωγή της αυτοφαγίας. Ωστόσο, αυτό που είναι ξεκάθαρο είναι το γεγονός ότι η καβεολίνη-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγικής απόκρισης σε συνθήκες στρες, ενώ διαταραχές στην σχέση αυτή εμπλέκονται στην εμφάνιση πολλών ασθενειών (13,266,267).

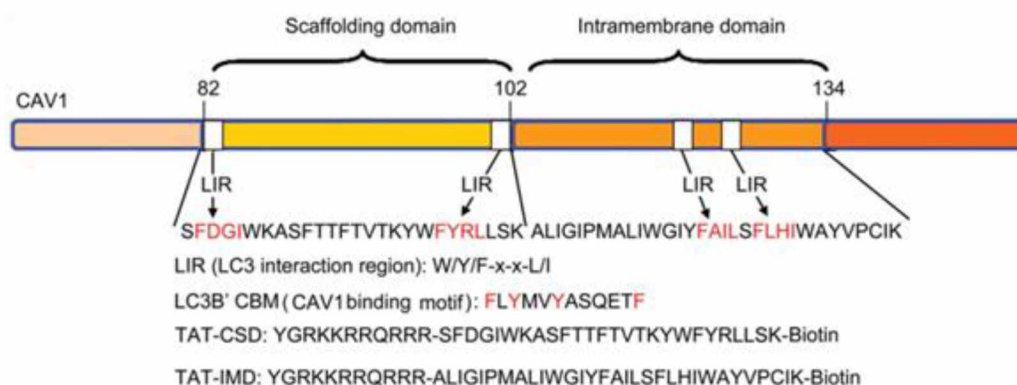
Αρχικά, έχει δειχθεί ότι η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με πολλά μόρια της αυτοφαγίας μέσω της επιφάνειας ικρίωματος CSD. Αρκετά από τα πρωτεϊνικά μόρια του μηχανισμού της αυτοφαγίας διαθέτουν τα χαρακτηριστικά μοτίβα αναγνώρισης και πρόσδεσης (CBM) στην επικράτεια ικρίωματος της καβεολίνης-1. Η πρωτεΐνη LC3 είναι ένα τέτοιο μόριο (141), όπως και το ATG12 (268). Επιπλέον, η ίδια η καβεολίνη-1 διαθέτει μοτίβα αναγνώρισης και πρόσδεσης στην LC3-II (LIR) τόσο στην επικράτεια ικρίωματος όσο και στην διαμεμβρανική της επικράτεια (141). Ωστόσο, η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά και με μόρια της αυτοφαγίας που δεν διαθέτουν μοτίβο CBM όπως το ATG5 (268). Επιπλέον, η καβεολίνη-1 μεταφέρει μια πληθώρα μορίων στα αυτοφαγοσώματα και λόγω της σύνδεσης της με τις πρωτεΐνες των αυτοφαγοσωμάτων αποικοδομείται και αυτή μέσω αυτοφαγίας (269,270).

Η ανασταλτική δράση της καβεολίνης-1 στην αυτοφαγία υποστηρίζεται από πολλές μελέτες όπου η σίγηση της καβεολίνης-1 οδήγησε σε επαγωγή της αυτοφαγίας (63,268,271). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και *in vivo* (271). Αντίθετα, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η καβεολίνη-1 δρα ως θετικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας βελτιώνοντας την λειτουργία των λυσοσωμάτων και επάγοντας την σύντηξη αυτοφαγοσώματος με λυσόσωμα (23,272).

Ωστόσο, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και καβεολίνης-1 μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να ανακαλύπτονται. Κάποιες πρόσφατες μελέτες παρέχουν μερικές μηχανιστικές εξηγήσεις. Σε καρκινικά κύτταρα η καβεολίνη-1 ασκεί την ανασταλτική της δράση στην αυτοφαγία μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT/JNK συμβάλλοντας στην επανευαισθητοποίηση τους στην ταξόλη (273). Επιπλέον, όπως έδειξαν οι Chen και συνεργάτες (268), σε επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά άμεσα και ανταγωνιστικά με το ATG5, το ATG12 αλλά και το σύμπλοκο τους οδηγώντας σε αναστολή των βασικών

επιπέδων της αυτοφαγίας, ενώ η αλληλεπίδραση αυτή διαταράσσεται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και έτσι τα μόρια αυτά αποδεσμεύονται από την καβεολίνη-1 και μπορούν να επάγουν την αυτοφαγία ως απόκριση στο στρες. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι η καβεολίνη-1 μπορεί να ρυθμίζει θετικά την αυτοφαγική διαδικασία μέσω των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίσταται. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες επάγεται η φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 στο κατάλοιπο Tyr14 και η φωσφορυλιωμένη καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με την BECLIN-1, οδηγώντας στην μετατόπιση της BECLIN-1 στα μιτοχόνδρια και ενεργοποίηση της μιτοφαγίας (23).

Από τα παραπάνω δεδομένα είναι ξεκάθαρο ότι η καβεολίνη-1 έχει διττό ρόλο στην ρύθμιση της αυτοφαγίας. Οι Bai και συνεργάτες παρατήρησαν ότι όταν η καβεολίνη-1 συνδέεται στην LC3-II μέσω του LIR μοτίβου που βρίσκεται στην διαμεμβρανική περιοχή της η αυτοφαγία ενεργοποιείται, ενώ όταν η σύνδεση γίνεται μέσω του LIR μοτίβου στην CSD περιοχή προκύπτει αναστολή της αυτοφαγίας (274)(Εικόνα 15). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις γίνεται περισσότερο κατανοητή η αιτία του διττού τρόπου ρύθμισης της αυτοφαγίας από την καβεολίνη-1.

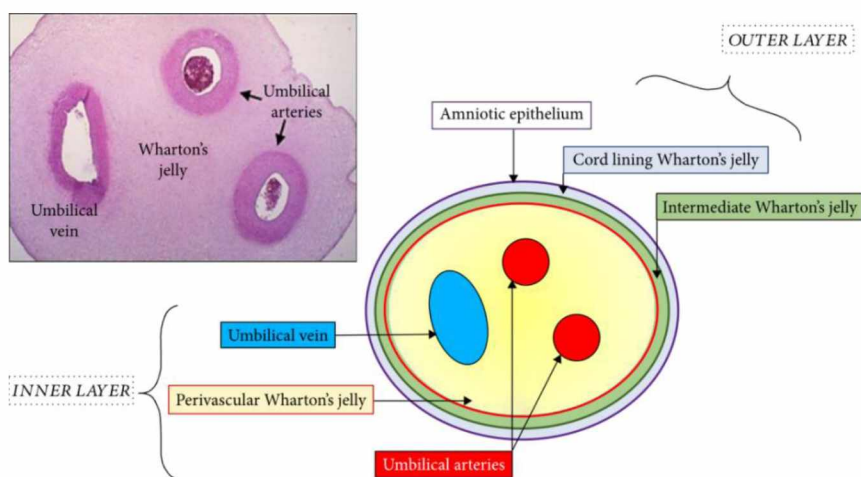


Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των μοτίβων LIR στις επικράτειες της καβεολίνης-1 (274)

5. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από την γέλη του Wharton (WJ- MSCs)

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα κύτταρα με ικανότητα αυτοανανέωσης, τα οποία αποτελούν ελπιδοφόρα «εργαλεία» για τον τομέα της κυτταρικής θεραπείας λόγω της ικανότητας διαφοροποίησης προς πολλούς κυτταρικούς τύπους (multipotent) και της ικανότητας ανάπλασης ιστών που διαθέτουν. Συγκεκριμένα μπορούν να διαφοροποιηθούν προς αδιποκύτταρα,

χονδροκύτταρα, ινοβλάστες και οστεοκύτταρα μεταξύ άλλων και απομονώνονται τόσο από ενήλικους όσο και από περιγεννητικούς/βρεφικούς ιστούς (275). Στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που απομονώνονται από περιγεννητικούς ιστούς ανήκουν και τα βλαστοκύτταρα από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs), ενός συνδετικού ιστού μεταξύ του αμνιακού επιθηλίου και των αγγείων του ομφάλιου λώρου τα οποία είναι επίσης πολυδύναμα και διαφοροποιούνται προς αδιποκύτταρα, χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα (275). Τα WJ-MSCs εμφανίζουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα τα οποία τα καθιστούν δημοφιλέστερους υποψηφίους στην αναγεννητική ιατρική. Το κυριότερο πλεονέκτημά τους είναι η εμφάνιση χαρακτηριστικών εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, όπως η έκφραση γονιδίων ολοδυναμικότητας, χωρίς όμως την δυνατότητα δημιουργίας τερατωμάτων. Επιπλέον, εμφανίζουν χαμηλή ανοσογονικότητα, ενώ η συλλογή τους θεωρείται αρκετά εύκολη και κυρίως ηθική (275,276). Μερικά χαρακτηριστικά των WJ-MSCs κατά την καλλιέργεια είναι η μορφολογία ινοβλαστών, η ανάπτυξη σε μονοστοιβάδα (277), η προσκόλληση στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειάς τους και ο μικρότερος χρόνος αναδιπλασιασμού του πληθυσμού τους (Population Doubling) σε σχέση με άλλα κύτταρα (278). Ωστόσο, γενικά τα επίπεδα των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στον οργανισμό είναι πολύ χαμηλά και έτσι για την χρήση τους σε κυτταρικές θεραπείες είναι απαραίτητη η *in vitro* καλλιέργεια τους μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων. Σημαντική τροχοπέδη στην χρήση τους σε τέτοιου είδους θεραπείες αποτελεί η κυτταρική γήρανση την οποία εμφανίζουν μετά από μεγάλο διάστημα *in vitro* καλλιέργειας (275) (Εικόνα 16).



Σχηματική αναπαράσταση της ανατομίας της γέλης του Wharton (279)

6. Σκοπός εργασίας

Τόσο η καβεολίνη-1 όσο και η αυτοφαγία θεωρούνται πλειοτροπικοί ρυθμιστές της κυτταρικής γήρανσης. Όσον αφορά την καβεολίνη-1 αυξημένα επίπεδα της έχουν παρατηρηθεί σε πολλά είδη γηρασμένων κυττάρων (193), ενώ θεωρείται και δείκτης της κυτταρικής γήρανσης (280). Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου έδειξε ότι πρόκληση βλαβών στο DNA λόγω εξωγενούς οξειδωτικού στρες σε φυσιολογικά χονδροκύτταρα οδηγεί σε επιδιόρθωση των βλαβών αυτών μέσω αύξησης και μετακίνησης της καβεολίνης-1 στον πυρήνα η οποία δεν παρατηρείται σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα, γεγονός που σχετίζεται με την ανικανότητα τους να επιδιορθώσουν τις βλάβες (98) και πιθανώς οφείλεται για τον γηρασμένο φαινότυπο που εμφανίζουν (281). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δειχθεί και για WJ-MSCs στα πλαίσια προηγούμενων διπλωματικών εργασιών του εργαστηρίου, καθώς παρατηρείται αύξηση των επιπέδων καβεολίνης-1 κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση, και αλλαγές στον υποκυτταρικό εντοπισμό της μετά από εφαρμογή εξωγενούς οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, σε νεαρά WJ-MSCs παρατηρείται αύξηση της καβεολίνης-1, φωσφορυλίωση της και μετακίνηση στον πυρήνα ως απόκριση σε οξειδωτικό στρες, ενώ το σύνολο αυτών των αλλαγών δεν παρατηρείται σε γηρασμένα WJ-MSCs τα οποία αδυνατούν να επιδιορθώσουν τις βλάβες (μελέτη υπό κρίση, under review). Είναι εμφανές λοιπόν, ότι η απορρύθμιση των επιπέδων καβεολίνης-1 εμπλέκεται τόσο στην αναδιπλασιαστική γήρανση των WJ-MSCs όσο και στην αδυναμία των γηρασμένων αυτών κυττάρων να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες. Όσον αφορά την αυτοφαγία προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου έδειξε ότι η αυτοφαγική απόκριση σε οξειδωτικό στρες είναι απορρυθμισμένη σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα (282) κάτι που πιθανά σχετίζεται με τον γηρασμένο φαινότυπο τους (281). Ωστόσο αντιφατικά δεδομένα υπάρχουν τόσο για την σχέση της καβεολίνης-1 με την γήρανση(93,195,283) όσο και της αυτοφαγίας με αυτή (242,247). Επομένως, στην παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρήσαμε να ερευνήσουμε τα προαναφερθέντα ζητήματα αποσαφηνίζοντας αρχικά τον ρόλο της καβεολίνης-1 στην γήρανση των WJ-MSCs και διερευνώντας στην συνέχεια την συσχέτισή της με την αυτοφαγική διαδικασία.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs)

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Τα δείγματα WJ-MSCs ελήφθησαν από τον ομφάλιο λώρο τριών νεογέννητων βρεφών μετά από γονεϊκή συγκατάθεση και καλλιεργήθηκαν για τη δημιουργία νεαρών και αναδιπλασιαστικά γηρασμένων κυττάρων για χρήση σε συγκεκριμένα πειράματα.

Υλικά καλλιέργειας

A. Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας: Κατά την καλλιέργεια των WJ-MSCs χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, BioWest), το οποίο εμπλουτίζεται με αναπτυξιακούς παράγοντες με προσθήκη ορού εμβρύου βοός σε αναλογία 10%v/v (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco). Προστίθενται επίσης πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε αναλογία 1% v/v για αποφυγή μολύνσεων.

B. Διάλυμα Hank's Balanced Solution: Πρόκειται για το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Solution (PBS, Lonza), ένα υδατικό διάλυμα αλάτων που ωφελεί την καλλιέργεια των κυττάρων διατηρώντας σταθερό το PH. Συντηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (25° C).

C. Θρυψίνη: Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών. Η προσθήκη του ενζύμου αυτού στην καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων είναι καθοριστικής σημασίας καθώς βοηθά στην αποκόλλησή τους από την επιφάνεια του μέσου καλλιέργειάς τους. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της θρυψίνης είναι 37°C ενώ η αποθήκευσή της γίνεται στους 4°C.

Συνθήκες καλλιέργειας

Όλες οι διαδικασίες διαχείρισης των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής τάξης II ο οποίος διασφαλίζει την ύπαρξη στείρων συνθηκών με σκοπό την προστασία των κυττάρων από εξωτερικές μολύνσεις. Ως μέσο ανάπτυξης των κυττάρων επιλέχθηκαν φλάσκες πολυστυρενίου με κατάλληλο φίλτρο για την οξυγόνωση των κυττάρων και την αποφυγή επιμόλυνσής τους. Τα

κύτταρα αναπτύχθηκαν μέσα σε κλίβανο επώασης υπό σταθερή θερμοκρασία 37° C, επαρκή υγρασία και σταθερή συγκέντρωση 5% CO₂ στην εσωτερική ατμόσφαιρα, συνθήκες πρότυπες για την ορθή ανάπτυξη των βλαστοκυττάρων. Η πορεία ανάπτυξης των κυττάρων παρατηρήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

Διαχείριση δειγμάτων κυττάρων

Η απομόνωση ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων από τη γέλη του Wharton, γίνεται από τον ομφάλιο λώρο δοτών και ακολουθεί αποθήκευσή τους σε τράπεζες υγρού αζώτου στους 150°C με σκοπό την μακρόχρονη συντήρησή τους. Για την κατάψυξη των WJ-MSCs είναι απαραίτητη η μεταφορά τους σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) σε συγκέντρωση 4x10⁶ κύτταρα/ml θρεπτικού DMEM. Σε κάθε φιαλίδιο προστίθεται επίσης FBS σε αναλογία 30%v/v καθώς και Dimethyl Sulfoxide (DMSO) σε αναλογία 10% v/v. Το DMSO είναι ένας οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται με σκοπό την σταδιακή ψύξη των κυττάρων για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων πάγου. Στα φιαλίδια δεν προστίθενται αντιβιοτικά. Επομένως, μετά την παραλαβή των κυττάρων από την τράπεζα αζώτου ακολουθεί η απόψυξη τους με σκοπό την άμεση χρήση τους σε καλλιέργεια.

Πρωτόκολλο απόψυξης κυττάρων

- Μεταφορά του cryovial που περιέχει τα βλαστοκύτταρα στο υδατόλουτρο (37° C) για 10 έως 15 δευτερόλεπτα
- Απόχυση του περιεχομένου του cryovial σε falcon των 15ml που περιέχει πλήρες θρεπτικό
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25° C)
- Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml FBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25° C)
- Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM και επαναδιάλυση ιζήματος
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκες από πολυστυρένιο
- Προσθήκη νέου πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM για επίτευξη τελικού όγκου 10ml
- Επώαση στον επωαστικό κλίβανο

Όταν η καλλιέργεια φτάσει να καλύπτει το 60-80% της φλάσκας πολυστυρενίου πρέπει να πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια (passage) των κυττάρων σε δύο νέες

φλάσκες για να συνεχιστεί η ομαλή ανάπτυξή τους και να αποφευχθούν οι αρνητικές συνέπειες του contact inhibition.

Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας κυττάρων

- Αφαίρεση παλαιού θρεπτικού υλικού
- Διπλή πλύση των κυττάρων με 5ml διαλύματος PBS
- Προσθήκη 1,5ml θρυψίνης και επακόλουθη επώαση στον κλίβανο για 3,5 λεπτά
- Παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης με σκοπό τη διαπίστωση της αποκολλητικής δράσης της θρυψίνης
- Προσθήκη 5ml από το νέο πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο απενεργοποιεί την θρυψίνη
- Μεταφορά των 5ml που περιέχει η φλάσκα σε falcon tube των 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25° C)
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml διαλύματος PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25° C)
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Επανεναίωρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 10ml από το νέο πλήρες θρεπτικό μέσο
- Μεταφορά από 5ml των κυττάρων σε δύο νέες φλάσκες
- Συμπλήρωση με νέο πλήρες θρεπτικό μέσο μέχρι επίτευξη τελικού όγκου 10ml
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο

B.2 Επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μέσω οξειδωτικού στρες

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε νεαρά κύτταρα (passage p6) που έχουν καλύψει περίπου το 70% του διαθέσιμου όγκου της φλάσκας (70% confluency) και ως οξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιείται το H₂O₂.

Υλικά

- Αρχικό διάλυμα H₂O₂
- Θρεπτικό μέσο DIMEM χωρίς ορό FBS και αντιβιοτικά (σκέτο) για την δημιουργία διαλύματος H₂O₂ συγκέντρωσης C=400 μM

Διαδικασία

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από την φλάσκα που περιέχει τα νεαρά κύτταρα
- Πλύση των κυττάρων με 5ml διαλύματος PBS
- Προσθήκη 10ml του διαλύματος H₂O₂ συγκέντρωσης 400 μM στις φλάσκες με τα κύτταρα

- Επώαση των κυττάρων με το διάλυμα H₂O₂ στον επωαστικό κλίβανο για 2 ώρες (37°C, 5% CO₂)
- Αφαίρεση του διαλύματος H₂O₂ από τις φλάσκες
- Διπλή πλύση των κυττάρων με 5mL διαλύματος PBS
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο επώασης (37°C, 5% CO₂)
- Ανακαλλιέργεια κυττάρων σε confluency 80% μετά από 1-3 μέρες (SIPS p1)
- Ανακαλλιέργεια κυττάρων σε confluency 80% μετά από 3-7 μέρες (SIPS p2) και μεταφορά σε 6well plates για ανοσοφθορισμό ή για απομόνωση πρωτεϊνών όπως περιγράφεται στις ενότητες B.6 και B.8 αντίστοιχα

B.3 Πρόκληση οξειδωτικού στρες μικρής διάρκειας και ανάκαμψη κυττάρων

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε νεαρά κύτταρα (passage 6) που έχουν καλύψει περίπου το 70% του διαθέσιμου όγκου της φλάσκας (70% confluency)

Υλικά:

- Αρχικό διάλυμα H₂O₂
- Θρεπτικό μέσο DIMEM χωρίς ορό FBS για την δημιουργία διαλύματος H₂O₂ συγκέντρωσης C=300 μM

Διαδικασία

- Μεταφορά 200.000 νεαρών κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι ενός 6 well plate
- Επώαση στον κλίβανο επώασης σε πρότυπες συνθήκες (37°C, 5% CO₂) σε πλήρες θρεπτικό μέσο DIMEM μέχρι την επίτευξη περίπου 70% confluency
- Αφαίρεση πλήρους θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια
- Πλύση των κυττάρων με 1ml PBS
- Έκθεση σε διάλυμα H₂O₂ συγκέντρωσης 300 μM για 30 λεπτά
- Αφαίρεση H₂O₂
- Διπλή πλύση κυττάρων με 1ml PBS
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου DIMEM
- Ανάκαμψη των κυττάρων για 1 ώρα και 24 ώρες
- Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού ή απομόνωσης πρωτεϊνών όπως περιγράφεται στις παραγράφους B.6 και B.7
- Ως κόντρολ χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε H₂O₂ (No Treatment-NT)

B.4 Μέθοδος προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal

Στην συνέχεια για να προσδιοριστεί αν πράγματι έχει επαχθεί η κυτταρική γήρανση καθώς και σε τι ποσοστό των κυττάρων εμφανίζεται, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή προσδιορισμού δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) στα κύτταρα που επιδράσαμε με υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και σε κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει επίδραση τα οποία θα αποτελέσουν και το control. Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο με αυξημένη δράση σε γηρασμένα κύτταρα. Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης κυτταρικής γήρανσης και βασίζεται στη χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος 5-βρόμο-3ινδολλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal) το οποίο όταν διασπαστεί από την β-γαλακτοσιδάση σε pH:6 δίνει μπλε χρώμα (136). Ο προσδιορισμός δραστηριότητας αυτού του ενζύμου αποτελεί τον πιο διαδεδομένο δείκτη κυτταρικής γήρανσης καθώς είναι αρκετά αξιόπιστος.

Υλικά μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal

A. Διάλυμα μονιμοποίησης: 0,2% φορμαλδεΰδη/ 0,2% γλουταραλδεΰδη διαλυμένα σε PBS

B. Διάλυμα χρώσης: περιέχει τα εξής άλατα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM Κιτρικό οξύ/ Φωσφορικό Νάτριο
- 5mM C₆N₆FeK₄
- 5mM C₆N₆FeK₃
- 150 mM NaCl
- 2 mM MgCl₂
- 1mg/ml 5-βρόμο-3ινδολλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal, SigmaAldrich: B4252 250MG)

Πρωτόκολλο προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal

- Καλλιέργεια 0,3 – 2 x 10⁵ κυττάρων σε 6 well plate
- Απομάκρυνση θρεπτικού μέσου
- Διπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4° C)
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με το διάλυμα A
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25° C) για 5 λεπτά
- Διπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4° C)
- Χρώση των κυττάρων με 1-2 ml από το διάλυμα B
- Επώαση σε κλίβανο επώασης απουσία CO₂ για 6-24 ώρες
- Απομάκρυνση διαλύματος χρώσης
- Τριπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Λήψη φωτογραφιών με οπτικό μικροσκόπιο

B.5 Σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 και του ATG5 μέσω της τεχνολογίας παρεμβολής RNA (RNA interference-RNAi)

Η παρεμβολή RNA είναι μια βιολογική διαδικασία που πραγματοποιείται από μη κωδικά μόρια RNA (siRNAs, miRNAs) και οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης γονιδίων μέσω αναστολής της μεταγραφής ή της μετάφρασής τους. Έτοιμα siRNA συμπληρωματικά προς συγκεκριμένο mRNA μπορούν να εισαχθούν εξωγενώς στα κύτταρα, μια διαδικασία που ονομάζεται transfection, και να επάγουν το μονοπάτι της παρεμβολής RNA οδηγώντας επιτυχώς σε σίγηση της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου. Η εισαγωγή siRNA σε κύτταρα πραγματοποιείται με την βοήθεια λιπιδιακών φορέων (λιποφαικταμίνη) και νανοσωματιδίων μεταξύ άλλων (284,285). Για την σίγηση της έκφρασης του γονιδίου της καβεολίνης-1 και του ATG5 χρησιμοποιήθηκαν siRNA ειδικά για τα συγκεκριμένα μόρια καθώς και σωματίδια λιποφαικταμίνης.

A. Υλικά

- Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- Θρεπτικό υλικό Opti-MEM με χαμηλή συγκέντρωση ορού (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
- siRNA εναντίον της Καβεολίνης-1 (Qiagen, Maryland, USA)
- siRNA εναντίον του ATG5 (#SC-41445, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, USA)
- siCTRL (#SC-37007, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, USA)

B. Διαδικασία

- Μία μέρα πριν την διαμόλυνση (transfection) με siRNA, νεαρά ή αναδιπλασιαστικά γηρασμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά 6well plate
- Επώαση σε κλίβανο επώασης για μια ημέρα σε πλήρες θρεπτικό DIMEM, χωρίς αντιβιοτικά σε πρότυπες συνθήκες (37° C, 5% CO₂), μέχρι να φτάσουν σε confluency 60-80%
- Διάλυση της λιποφαικταμίνης σε θρεπτικό μέσο Opti-MEM
- Διάλυση των μορίων siRNA σε θρεπτικό μέσο Opti-MEM (Cτελ siCav-1=50 pmol και Cτελ siATG5= 25 pmol)
- Μίξη των διαλυμένων σωματιδίων λιποφαικταμίνης με τα διαλυμένα μόρια siRNA σε αναλογία 1:1 και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον θάλαμο νηματικής ροής.
- Προσθήκη των συμπλόκων siRNA-λιποφαικταμίνης στα κύτταρα και του συμπλόκου siCTRL-λιποφαικταμίνης ως κοντρόλ για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης.
- Επώαση 72 ωρών και αξιολόγηση αποτελεσμάτων

B.6 Ανίχνευση καβεολίνης-1 και 53BP1 μέσω ανοσοφθορισμού σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε οξειδωτικό στρες και σίγηση καβεολίνης-1

I. Διαδικασία πριν τον ανοσοφθορισμό

- Τοποθέτηση καλυπτρίδων στο 6 well plate για την ανάπτυξη των κυττάρων πάνω σε αυτές
- Αποστείρωση του 6 well plate με τις καλυπτρίδες υπό ακτινοβολία UV για 20 λεπτά τουλάχιστον
- Σήμανση του 6 well plate
- Προσθήκη 2 mL νέου πλήρους θρεπτικού σε κάθε πηγαδάκι που θα χρησιμοποιηθεί
- Μεταφορά 100.000 κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι
- Τοποθέτηση του 6well plate στον κλίβανο επώασης έως ότου επιτευχθεί confluency 80%.

II. Μονιμοποίηση κυττάρων

A. Υλικά

- i. Παγωμένο διάλυμα Μεθανόλης (-20° C)
- ii. Κρύο διάλυμα PBS (4° C)

B. Πρωτόκολλο μονιμοποίησης κυττάρων

- Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από όλα τα πηγαδάκια
- Προσθήκη 300μl παγωμένης Μεθανόλης
- Τοποθέτηση του 6 well plate στους -20° C για τουλάχιστον 10 λεπτά
- Μετά το πέρας του χρόνου αφαιρείται το διάλυμα μεθανόλης από τα πηγαδάκια
- Πλύση με 1mL διαλύματος PBS, σε αυτή την περίπτωση η απομάκρυνσή του γίνεται με πιπέτα για ακρίβεια με σκοπό να παραμείνουν τελείως στεγνά τα πηγαδάκια

III. Ανοσοφθορισμός

Μετά την μονιμοποίηση ακολουθεί η διαδικασία του ανοσοφθορισμού

A. Υλικά Ανοσοφθορισμού

- 1% Triton-X-100 σε PBS
- 0,02% Tween²⁰ σε PBS
- Blocking buffer: 0,02% Tween²⁰ σε PBS και 1% BSA για την δέσμευση οποιονδήποτε μη ειδικών θέσεων σύνδεσης των αντισωμάτων
- 4,6-diamidino-2-183 phenylindole (DAPI) για την ανίχνευση των πυρήνων

B. Πρωτόκολλο Ανοσοφθορισμού

- Τριπλή πλύση των κυττάρων στα πηγαδάκια με 1 mL διαλύματος PBS για 5 λεπτά
- Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 50μL διαλύματος 1% Triton-X-100 σε PBS και γίνεται επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25° C)
- Πλύση των κυττάρων με 1 mL διαλύματος 0,02% Tween²⁰ σε PBS για 5 λεπτά
- Προσθήκη 1mL Blocking buffer σε κάθε πηγαδάκι για 10 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου το διάλυμα απομακρύνεται
- Προσθήκη 50μL του πρωτοταγούς αντισώματος σε κάθε πηγαδάκι για 60 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου το πρωτοταγές αντίσωμα απομακρύνεται
- Πλύση των κυττάρων με 1 mL διαλύματος 0,02% Tween²⁰ σε PBS για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση
- Προσθήκη 50μL του δευτεροταγούς αντισώματος και τοποθέτηση του 6 well plate σε σκοτεινό μέρος για 45 έως 60 λεπτά.
- Πλύση των κυττάρων με 1 mL διαλύματος 0,02% Tween²⁰ σε PBS για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση
- Πλύση των κυττάρων με 1 mL διαλύματος PBS για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση
- Προσεκτική αφαίρεση καλυπτρίδων από τα πηγαδάκια και στέγνωμα τους
- Σε κάθε καλυπτρίδα προστίθενται 10 μL της ειδικής χρωστικής DAPI με σκοπό τον χρωματισμό των πυρήνων των κυττάρων
- Οι καλυπτρίδες γυρίζονται ανάποδα και τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Τα άκρα σφραγίζονται με ειδική κόλλα
- Λήψη φωτογραφιών με το μικροσκόπιο 184 ZEISS Axio Imager.Z2 fluorescent microscope και ανάλυση με το ImageJ λογισμικό

Πρωτοταγή αντισώματα	Δευτεροταγή αντισώματα
Cav-1, 1:500 (#A1915, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc)	1:500 dilution, Alexa Fluor 594, Molecular Probes
53BP1, 1:500, (clone BP13, mouse monoclonal, Millipore, MA, USA)	1:500 dilution, Alexa Fluor 488, Molecular Probes

B.7 Αφαίρεση ορού (serum starvation) από το θρεπτικό μέσο με σκοπό την επαγωγή της αυτοφαγίας

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε νεαρά και αναδιπλασιαστικά γηρασμένα κύτταρα τα οποία είτε είχαν υποστεί προηγουμένως σίγηση της έκφρασης της Καβεολίνης-1 όπως περιγράφεται στην ενότητα B.5 (siCav-1+starvation) είτε εκφράζουν κανονικά την καβεολίνη-1 (starvation). Ως κόντρολ χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα νεαρά και γηρασμένα που είχε γίνει μόνο σίγηση της καβεολίνης-1 (siCav-1) καθώς και κύτταρα χωρίς καμία τροποποίηση (NT).

Υλικά

- Θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς FBS (θρεπτικούς και αυξητικούς παράγοντες) και αντιβιοτικά (σκέτο)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM

Διαδικασία

- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου στα 6 well plate
- Μεταφορά 300.000 κυττάρων από πρώιμα (νεαρά) και μεταγενέστερα (γηρασμένα) στάδια καλλιέργειας σε 6 well plate
- Επώαση στον επωαστικό κλίβανο μέχρι επίτευξη confluency 70-80%
- Σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 όπως περιγράφεται στην ενότητα B.5 όπου είναι απαραίτητο
- Αφαίρεση παλαιού θρεπτικού και διπλή πλύση με διάλυμα PBS
- Προσθήκη σκέτου θρεπτικού μέσου και επώαση στον επωαστικό κλίβανο για 2 ώρες
- Απομόνωση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western όπως περιγράφεται στην ενότητα B.8

B.8 Ανίχνευση πρωτεϊνικών επιπέδων καβεολίνης-1 και πρωτεϊνών της αυτοφαγίας μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western περιλαμβάνει τα στάδια της I) απομόνωσης των πρωτεϊνών, II) ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, III) μεταφοράς των πρωτεϊνών σε ειδική μεμβράνη, IV) μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης των αντισωμάτων για τις εκάστοτε πρωτεΐνες, V) την προσθήκη πρωτοταγούς και δευτεροταγούς αντισώματος και την VI) ανίχνευση του σήματος.

I. Απομόνωση πρωτεϊνών

Το πρώτο βήμα πριν την ανίχνευση των εκάστοτε πρωτεϊνών είναι η απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος από τα κύτταρα στα οποία έχουν γίνει οι επιδράσεις και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους. Η απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη λύση των κυττάρων και τη δημιουργία των λεγόμενων κυτταρικών λυμάτων. Η απομόνωση μπορεί να γίνει και από τμήματα ιστών σε άλλες περιπτώσεις με διαδικασία που περιλαμβάνει μεγαλύτερη μηχανική πίεση για την ομογενοποίηση τους λόγω της συμπαγέστερης δομής τους (286). Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν λύματα κυττάρων μιας και όλες οι επιδράσεις έγιναν σε κύτταρα WJ-MCs.

Υλικά απομόνωσης πρωτεϊνών

A. Διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer)

- 30 mM Tris (Invitrogen)
- 10% Γλυκερόλη (Invitrogen)
- 150 mM NaCl (Sharlau)
- 1% NP40 (Ambion)

B. Αναστολείς πρωτεασών

Γ. Διαδικασία

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια
- Διπλή πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS
- Τοποθέτηση του 6 well plate σε πάγο
- Προσθήκη 100μl από το Lysis Buffer ανά 10^6 κύτταρα
- Ανάδευση των κυττάρων του 6 well plate στη συσκευή Vortex
- Τα κύτταρα διατηρούνται στον πάγο για 5 λεπτά
- Η ανάδευση επαναλαμβάνεται κάθε 5 λεπτά για σύνολο 40 λεπτών
- Το περιεχόμενο των πηγαδακίων μεταφέρεται σε eppendorf tubes
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα eppendorf tubes (1300 rpm, 15 λεπτά, 4°C)
- Προσεκτική συλλογή υπερκειμένου και μεταφορά του σε νέο eppendorf tube

Προσδιορισμός απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνών στα κυτταρικά λύματα

Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων των άγνωστων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στην χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία σε όξινες συνθήκες εμφανίζει κόκκινο χρώμα και είναι σε κατιονική μορφή, ενώ η ανιονική μορφή της εμφανίζει μπλέ χρώμα. Το αντιδραστήριο Bradford είναι όξινο αντιδραστήριο και

έτσι η χρωστική έχει αρχικά κόκκινο χρώμα. Ωστόσο, μετά την σύνδεση της χρωστικής με βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών μετατρέπεται σε ανιονική μορφή και επομένως σε μπλέ χρώμα. Έτσι, η μέγιστη απορρόφηση όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm όταν παρατηρηθεί αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Η ποσότητα της μπλε ανιονικής μορφής είναι ανάλογη με την ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα, επιτρέποντας έτσι τον απευθείας προσδιορισμό της ποσότητας μιας πρωτεΐνης σε ένα δείγμα μετρώντας την απορρόφηση στα 595 nm. Στην μέθοδο Bradford χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες γνωστής συγκέντρωσης, συχνότερα η αλβουμίνη ορού βοός (BSA), για κατασκευή πρότυπης καμπύλης που θα οδηγήσει στον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης (287,288). Η διαδικασία που ακολουθείται με σκοπό την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία κατασκευής πρότυπης καμπύλης

- Διάλυση ποσοτήτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumine, BSA) από 1μg έως 20μg σε 800 μl ddH₂O
- Προσθήκη 200 μl χρωστικής Coomassie Brilliant BlueG-250 σε κάθε δείγμα
- Επώση μείγματος (5 λεπτά, 25°C)
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
- Μεταφορά των δειγμάτων σε 96 well plate
- Φωτομέτρηση δειγμάτων στα 595 nm
- Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

II. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου- SDSPAGE

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιείται με σκοπό τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, με βάση το μοριακό τους βάρος και αποτελεί το δεύτερο βήμα για την ανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, καθώς το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερο τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Επιπλέον, καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Το μείγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα

μόριο ανά 2 αμινοξέα, δημιουργώντας σύμπλοκο με φορτίο ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης (289,290). Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται γρηγορότερα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους μετακινούνται με πιο αργό ρυθμό. Ωστόσο, μία από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική η LC3 παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα και ξεφεύγει από αυτόν τον κανόνα. Η LC3 μετά τη δημιουργία της παρουσιάζει δύο μορφές, την μη λιπιδιωμένη μορφή της LC3-I και την λιπιδιωμένη μορφή της LC3-II (συνδεδεμένη με PE). Η LC3-II μορφή παρόλο που έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος λόγω της λιπιδίωσής της, μετακινείται γρηγορότερα από την LC3-I μορφή και η ιδιαιτερότητα αυτή πιθανώς οφείλεται στην αύξηση της υδροφοβικότητας του μορίου (291)

Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Για να είναι επιτυχής ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος μέσω ηλεκτροφόρησης, πρέπει προηγουμένως να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη της πολύπλοκης δομής τους (τριτοταγής, τεταρτοταγής δομή). Με την αποδιάταξη τους οι πρωτεΐνες επιστρέφουν στην πρωτοταγή γραμμική τους διαμόρφωση. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 15 μg ενώ για την αποδιάταξη τους δημιουργήθηκε διάλυμα που περιείχε:

- A. 4 μL Sample Buffer 6X: περιέχει Reducing buffer και Loading buffer
- B. X μL πρωτεΐνης για να επιτευχθεί συγκέντρωσή 15μg
- Γ. Y μL dd H₂O για τελικό όγκο V_{τελ}=20μL

Αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95° C για 5 λεπτά με την βοήθεια θερμικού κυκλοποιητή.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι ασυνεχής διαδικασία. Επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται οι αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες και το οποίο «συμπυκνώνει» τις πρωτεΐνες σε μία μικρή ζώνη έτσι ώστε οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος να φθάσουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού, και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος και σε αυτό θα γίνει ο διαχωρισμός με βάση το μοριακό βάρος.

A. Υλικά για την ηλεκτροφόρηση

- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS (NuPage NovexTris – Acetate MiniGels, Invitrogen)
- Διάλυμα χρωστικής μπλέ της βρωμοφαινόλης (SampleBuffer, Invitrogen)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer Scientific)
- Δις απεσταγμένο H₂O (ddH₂O)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x : Μίξη 100mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x (NuPageMES Running buffer) με 900 mL ddH₂O

B. Διαδικασία

- Στήσιμο της ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης της εταιρίας BioRad
- Προσθήκη 600 mL Running buffer 1X τόσο στο μπροστινό όσο και στο οπίσθιο μέρος της συσκευής
- Τοποθέτηση του gel πολυακρυλαμιδίου στο μεσαίο μέρος της συσκευής
- Προσθήκη 200 mL Running buffer 1X στο μεσαίο τμήμα της συσκευής
- Τα δείγματα όπως και ο ladder με τα γνωστά μοριακά βάρη φορτώνονται στο gel πολυακρυλαμιδίου. Για ευκολία στο πρώτο πηγαδάκι του gel πολυακρυλαμιδίου φορτώνεται ο ladder
- Ρύθμιση της έντασης του ρεύματος στα 70 Volt για 15 λεπτά. Έναρξη της ηλεκτροφόρησης.
- Μετά το πέρας των 15 λεπτών τα Volt ρυθμίζονται στα 180 για 40 λεπτά.

III. Μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF

Υλικά μεταφοράς πρωτεϊνών (transfer)

A. Διαλύματα

(TransferBuffer) 1L:

- a. 100 ml Transfer Buffer 10X (NuPage, Invitrogen)
- b. 200 ml Μεθανόλη 1% (Applichem)
- c. 700 ml ddH₂O

B. Υλικά

- a. Μεμβράνη PVDF
- b. Χαρτί τύπου Whitman
- c. Ειδικά σφουγγαράκια
- d. Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, ThermoScientific)

Γ. Διαδικασία

- Στήνεται η ειδική συσκευή Trans-blot Wet Transfer Cell (BioRad)
- Η μεμβράνη PVDF στην οποία θα μεταφερθούν οι πρωτεΐνες πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί μέσω επώασης για 15 λεπτά σε Μεθανόλη
- Αφού έχει ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, ακολουθεί επώαση του gel πολυακρυλαμίδης, της μεμβράνης PVDF αλλά και των χαρτακίων Whittman σε Transfer Buffer για 20 λεπτά.
- Στο ειδικό καλούπι που διαθέτει η συσκευή τοποθετούνται τα παραπάνω υλικά με συγκεκριμένη σειρά: Πρώτα τοποθετούνται τα σφουγγαράκια, μετά ένα χαρτάκι Whittman, ακολουθεί η ενεργοποιημένη μεμβράνη PVDF, το gel πολυακρυλαμίδιου, ακόμα ένα χαρτάκι Whittman και τέλος ένα ακόμα σφουγγαράκι. Η δομή αυτή προσομοιάζει τη δομή ενός sandwich.
- Το sandwich τοποθετείται στην ειδική συσκευή που έχουμε στήσει και κουμπώνεται προσεκτικά
- Ενεργοποίηση της συσκευής και ορισμός της στα 100V για 60 λεπτά με σκοπό την μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel πολυακρυλαμίδης στην μεμβράνη PVDF
- Μετά το πέρας του χρόνου η συσκευή ανοίγεται το sandwich αποσυναρμολογείται και παραλαμβάνεται προσεκτικά η μεμβράνη PVDF στην οποία περιμένουμε να έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες
- Για να σιγουρευτούμε ότι έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες στην μεμβράνη κάνουμε χρώση με Ponceau, μια κόκκινη χρωστική που θα εμφανίσει τις «μπάντες» των πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Επιπλέον συστήνεται και χρώση του gel με την χρωστική Coomassie για την επιβεβαίωση ότι έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες.
- Ακολουθεί τριπλή πλύση της μεμβράνης με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση

IV. Blocking της μεμβράνης PVDF για κάλυψη μη ειδικών θέσεων σύνδεσης του αντισωμάτων

A. Υλικά για το blocking της μεμβράνης

Διάλυμα πλύσης TBS -T (Tris-buffered Saline, Tween) 1L:

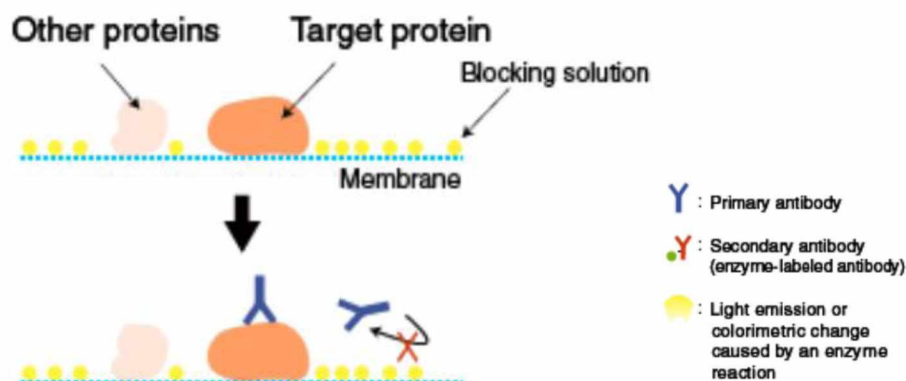
- 100 ml TBS 10X
- 900 ml H₂O
- 1ml Tween²⁰

Διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων σύνδεσης αντισωμάτων 5% (Blocking buffer)

- 2,5 gr non fat dry milk powder
- 50 ml TBS-T

B. Διαδικασία

- Προσθήκη Blocking buffer 5% στην μεμβράνη για 60 λεπτά για κάλυψη μη ειδικών θέσεων σύνδεσης του αντισώματος. Μετά το πέρας των 60 λεπτών το Blocking buffer αφαιρείται



Μπλοκάρισμα της μεμβράνης για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης του αντισώματος.
Εικόνα τροποποιημένη (292)

V. Επώαση της μεμβράνης με το σετ πρωτοτοταγών-δευτεροταγών αντισωμάτων

A. Αντισώματα

Πρωτοταγή αντισώματα	Δευτεροταγή αντισώματα
Caveolin-1 Rabbit #3251, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, 1:10000, [Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK]
LC3A/B Rabbit #4108, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, 1:10000, [Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK]
Beclin-1 Rabbit #3495, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology, Beclin-1]	Anti-rabbit, 1:10000, [Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK]
PI3K-CIII Rabbit #4263, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, 1:10000, [Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK]
ATG5 Rabbit #12994, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, 1:10000, [Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK]
ATG13 Rabbit #13468, 1:1000 dilution, [Cell Signaling Technology]	Anti-rabbit, 1:10000, [Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK]
β-actin Mouse, 1:3000 dilution, [Santa Cruz Biotechnology Inc]	Anti-mouse #BA1050-1, 1:10000 dilution [Boster, CA, USA]

B. Διάλυμα διάλυσης του εκάστοτε αντισώματος

Τα αντισώματα για τις πρωτεΐνες LC3-I/II, Cav-1, β-ακτίνη, PI3K, ATG13, ULK1, ATG5, BECLIN-1 διαλύθηκαν (το καθένα ξεχωριστά) σε blocking buffer 5% non fat dry milk powder-TBS-T.

Γ. Διαδικασία

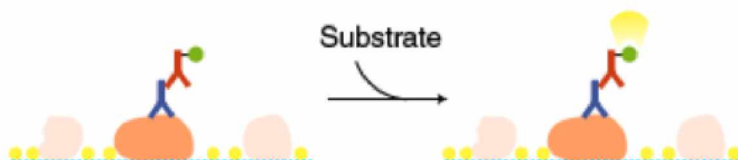
- Επώαση της μεμβράνης με το πρωτοταγές αντίσωμα το οποίο έχει προηγουμένως διαλυθεί στο κατάλληλο blocking buffer, στους 4°C, ολονύκτια υπό ανάδευση
- Τριπλή πλύση της μεμβράνης με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση
- Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα για 60 λεπτά, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου
- Τριπλή πλύση της μεμβράνης με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση



Δέσμευση πρωτοταγούς και δευτεροταγούς αντισώματος (292)

VI. Αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων

Το τελικό βήμα αποτελεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων μέσω αυτοραδιογραφίας. Για τον σκοπό αυτό η μεμβράνη επωάζεται σε ενισχυτικό σήματος (ECL) για 3 λεπτά, το οποίο απομακρύνεται στη συνέχεια με διηθητικό χαρτί. Ακολούθως η μεμβράνη μεταφέρεται σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance) το οποίο μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή θα μας δώσει το σήμα των αντισωμάτων.



Προσθήκη διαλύματος που περιέχει το υπόστρωμα στο οποίο θα δράσει το ένζυμο που είναι συζευγμένο με το δευτεροταγές αντίσωμα. Η αντίδραση αυτή παράγει φως το οποίο ανιχνεύεται με ειδικό μηχάνημα (292)

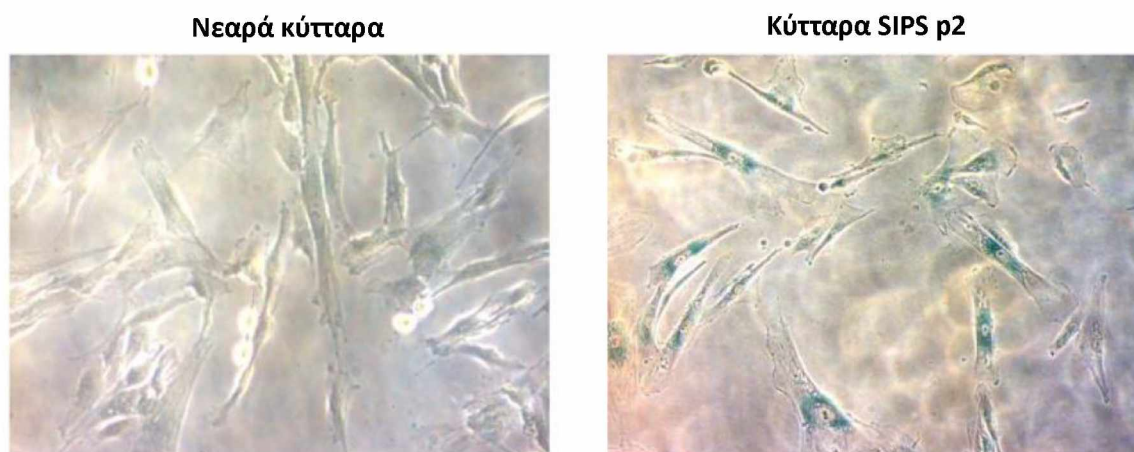
B.9 Στατιστική επεξεργασία

Για την ανάλυση των δεδομένων έγινε χρήση του λογισμικού SPSS 24. Η στατιστική σημασία προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την δοκιμασία Student-t-test. Για όλες τις συγκρίσεις, οι τιμές p μικρότερες από 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές και η σημαντικότητα στα γραφήματα επισημαίνεται με το σύμβολο # (#=p < 0.05; ##=p < 0.01; ###=p < 0.001, ####=p<0.0001) όταν η σύγκριση έγινε μεταξύ νεαρών και γηρασμένων κυττάρων ή με αστερίσκους (*=p < 0.05; **=p < 0.01; ***=p < 0.001, ****=p<0.0001), όταν η σύγκριση έγινε μεταξύ κάθε χρονικού σημείου έναντι της συνθήκης NT. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα (μέσος όρος ± S.E).

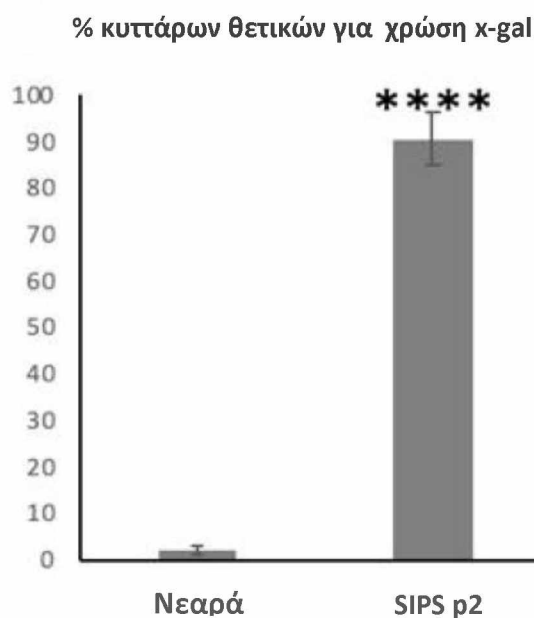
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 Αύξηση πρωτεϊνικών επιπέδων καβεολίνης-1 στην πρόωρα επαγόμενη γήρανση SIPS

Αρχικά, προκειμένου να διαπιστωθεί αν όντως έχει επαχθεί πρόωρα η κυτταρική γήρανση σε νεαρά κύτταρα (p6) στα οποία έγινε επίδραση με H_2O_2 για δύο ώρες και έχουν αναδιπλασιαστεί δύο φορές (δεξιά εικόνα), πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με νεαρά κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει κάποια επίδραση (αριστερή εικόνα).



Εικόνα 1: Χρώση SA-b-Gal σε νεαρά (αριστερή εικόνα) και πρόωρα γηρασμένα κύτταρα μετά από δύο ανακαλλιέργειες (δεξιά εικόνα).

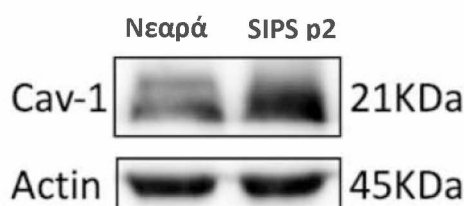


Διάγραμμα 1: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε νεαρά κύτταρα και κύτταρα που έχει επέλθει γήρανση SIPS μετά τον δεύτερο αναδιπλασιασμό (p2). Οι τιμές p value που εμφανίζονται είναι οι μέσοι όροι \pm S.E. ****p < 0.0001 σε σχέση με νεαρά κύτταρα.

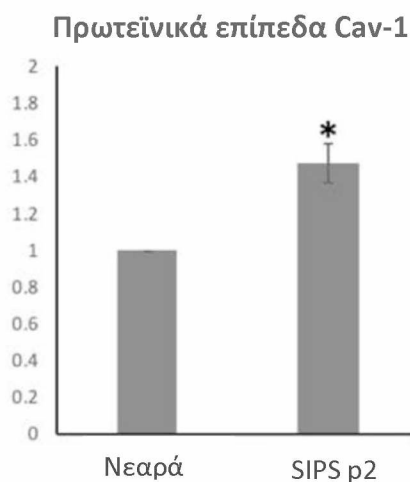
Παρατηρούμε ότι:

- Στην πλειοψηφία των νεαρών κυττάρων δεν ανιχνεύεται δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης και επομένως ο πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως μη γηρασμένος (εικόνα 1)
- Αντίθετα σε κύτταρα που εφαρμόστηκε H₂O₂ παρατηρείται αυξημένο ποσοστό κυττάρων θετικών σε χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Παρατηρείται επίσης η χαρακτηριστική πεπλατυσμένη μορφολογία και το ακανόνιστο σχήμα που έχουν λάβει τα θετικά σε χρώση β-γαλακτοσιδάσης κύτταρα. Επομένως έχει επαχθεί επιτυχώς η γήρανση.
- Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στο Διάγραμμα 1 όπου το ποσοστό των θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης, και επομένως γηρασμένων κυττάρων, είναι της τάξης του $90,66 \pm 5,5 \%$, στα κύτταρα που εφαρμόστηκε οξειδωτικό στρες.

Ακολούθησε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της καβεολίνης-1 στα νεαρά και στα πρόωρα γηρασμένα κύτταρα που είχαν αναδιπλασιαστεί δύο φορές.



Εικόνα 2: Ανοσοαποτύπωση κατά Western που απεικονίζει τα επίπεδα καβεολίνης-1 (21KDa) σε νεαρά και γηρασμένα (SIPS p2) κύτταρα. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (45KDa)



Διάγραμμα 2: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα (SIPS p2). Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως Loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Οι τιμές αποτελούν μέσο όρο \pm S.E. * $p < 0.05$ σε σχέση με τα νεαρά WJ-MSCs.

Παρατηρούμε ότι:

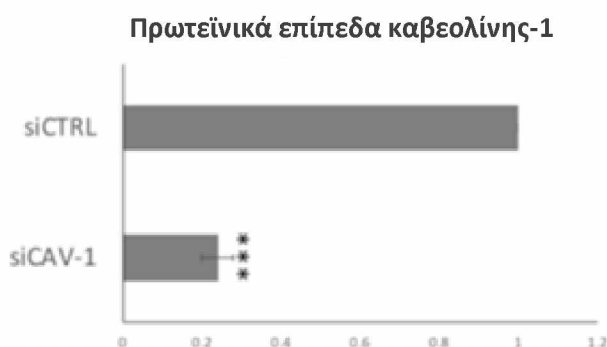
- Τα πρωτεϊνικά επίπεδα καβεολίνης-1 αυξάνονται σημαντικά στα γηρασμένα SIPS p2 κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά (Εικόνα 2, Διάγραμμα 2).
- ➔ Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη της σημασίας της αύξησης των επιπέδων της καβεολίνης-1 για την εγκαθίδρυση της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης SIPS.

Γ.2 Η σίγηση της καβεολίνης-1 οδηγεί σε αδυναμία επιδιόρθωσης των δίκλωνων ρήξεων στο DNA που προκαλεί το οξειδωτικό στρες

Αρχικά έγινε αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της σίγησης της καβεολίνης-1. Η σύγκριση γίνεται με το siCTRL.



Εικόνα 3: Ανοσοαποτύπωση Western για την πρωτεΐνη καβεολίνη-1 (21KDa) σε κύτταρα που χρησιμοποιήθηκε siRNA για την σίγηση της έκφρασης της (siCAV-1) και σε κύτταρα που χρησιμοποιήθηκε control siRNA (siCTRL). Χρησιμοποιήθηκε β-ακτίνη ως loading control.

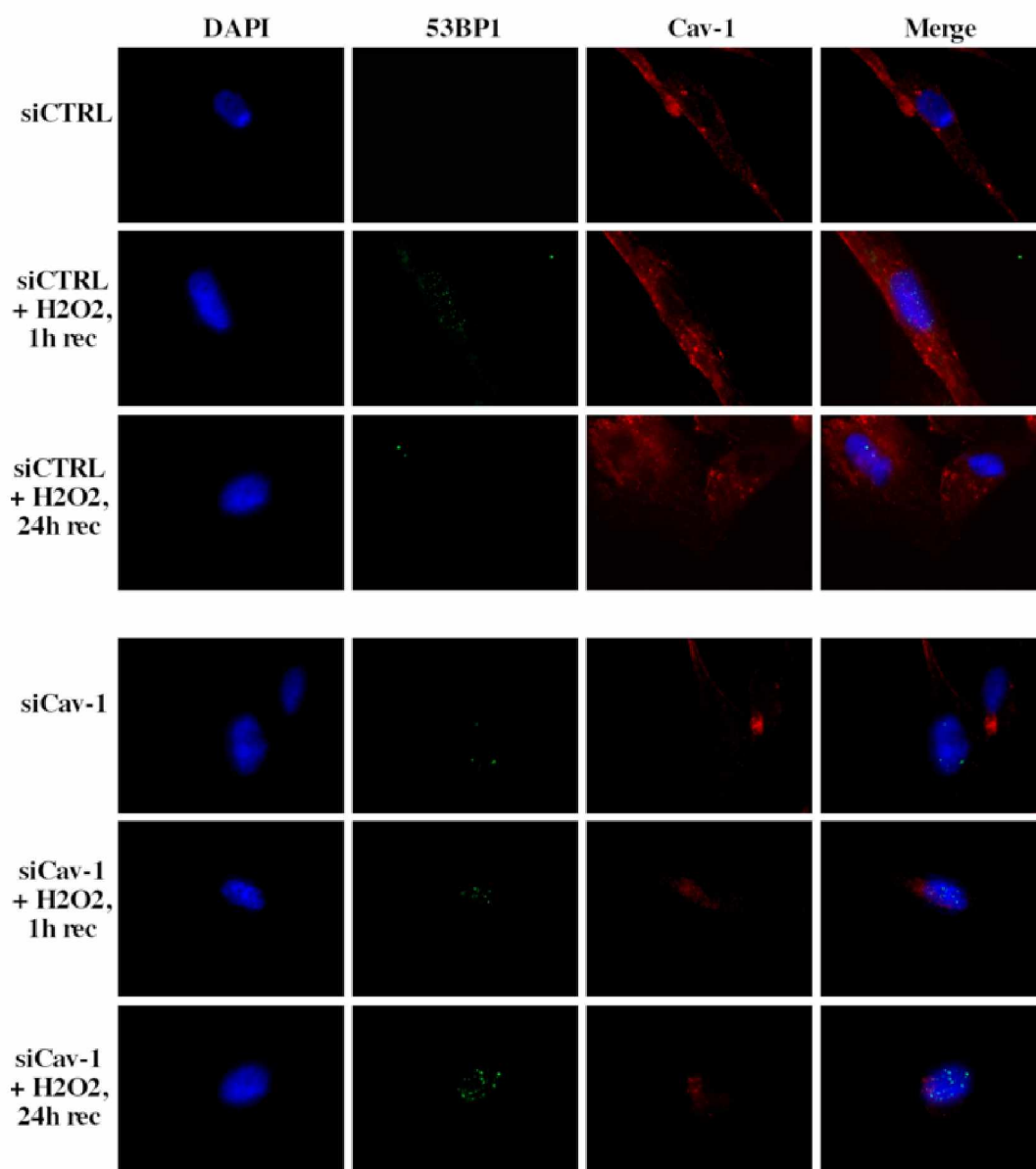


Διάγραμμα 3: Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών επιπέδων καβεολίνης-1 κυττάρων με επίδραση siRNA για την σίγηση της έκφρασης της (siCAV-1) σε σχέση με κύτταρα υπό επίδραση control siRNA (siCTRL). Οι τιμές αποτελούν μέσο όρο \pm S.E. *** $p < 0.001$ σε σχέση με νεαρά WJ-MSCs που έγινε επίδραση με siCTRL. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Image J.

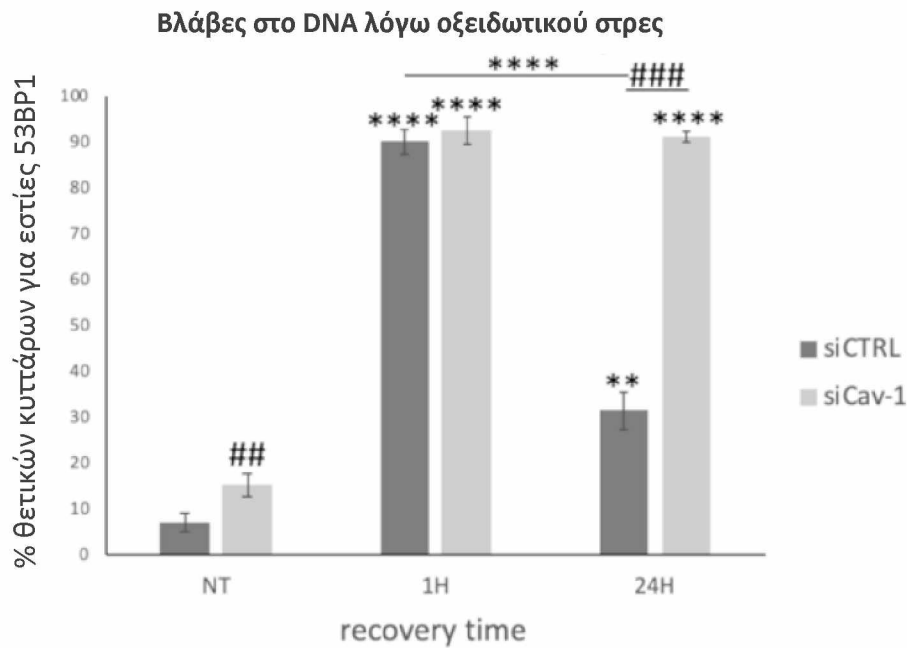
Παρατηρούμε ότι:

- Τα επίπεδα καβεολίνης-1 μειώθηκαν επιτυχώς μετά από σίγηση της μέσω siRNA για τρεις ημέρες και αυτή η μείωση είναι της τάξης του 80% (Διάγραμμα 3)

Αφού επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα της σίγησης της έκφρασης της καβεολίνης-1, ακολούθησε η αξιολόγηση της ικανότητας επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA μετά από επίδραση H₂O₂ σε νεαρά κύτταρα χωρίς καβεολίνη-1. Η ανίχνευση δίκλωνων ρήξεων στο DNA αξιολογήθηκε μέσω ανοσοφθορισμού με χρήση πρωτοταγούς (και κατάλληλου δευτεροταγούς) αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης 53BP1 η οποία εντοπίζεται στην περιοχή των δίκλωνων ρήξεων στο DNA.



Εικόνα 4: Χαρακτηριστικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού. Απεικονίζεται η έκφραση καβεολίνης-1 (κόκκινο χρώμα) σε νεαρά κύτταρα στα οποία είτε είχε επαχθεί σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 (siCav-1) είτε όχι (siCTRL) και η ικανότητα επιδιόρθωσης βλαβών μετά από 1ώρα (1h Rec) ή 24 ώρες (24h Rec) από την επίδραση με H₂O₂. Οι δίκλωνες ρήξεις στην αλυσίδα του DNA απεικονίζονται ως εστίες της πρωτεΐνης 53BP1 (πράσινο χρώμα) ενώ οι πυρήνες έχουν βαρφαίμε την πρωτεΐνη DAPI (μπλε χρώμα).



Διάγραμμα 4: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων με εστίες 53BP1 σε φυσιολογικές συνθήκες (NT), μετά από 1 ώρα (1H) και μετά από 24 ώρες από την επίδραση με H₂O₂ (24H). Στα κύτταρα έχει γίνει επίδραση με siRNA για την καβεολίνη-1 (siRNA) είτε με control siRNA (siCTRL). Οι τιμές που απεικονίζονται είναι οι μέσοι όροι ± S.E. ## p < 0.01 και ### p < 0.001 ως προς τα siCTRL νεαρά κύτταρα και ** p < 0.01 and **** p < 0.0001 ως προς την NT κατάσταση. Οι τιμές p-value υπολογίστηκαν με χρήση της δοκιμασίας Student t-test.

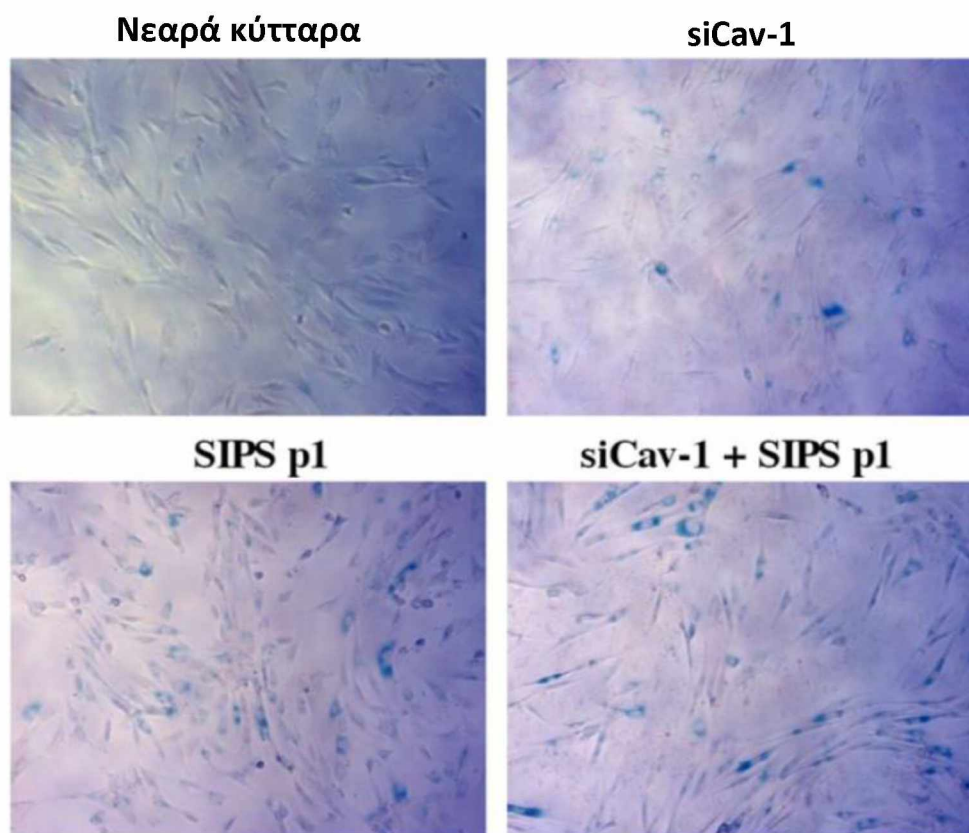
Παρατηρούμε ότι:

- Στα κύτταρα που εφαρμόστηκε siCTRL τα επίπεδα 53BP1 εστιών αυξάνονται δραματικά 1 ώρα μετά την επίδραση με H₂O₂ και επανέρχονται σε χαμηλά σχετικά επίπεδα 24 ώρες μετά από την επίδραση H₂O₂ (Εικόνα 4), (Διάγραμμα 4)
 - Αντίθετα, στα κύτταρα που δεν εκφράζουν την καβεολίνη-1 (siCav-1) τα επίπεδα εστιών 53BP1 είναι υψηλότερα ακόμα και πριν την επίδραση με H₂O₂, αυξάνονται 1 ώρα μετά (92,33 ± 3,05 %) και παραμένουν πολύ υψηλά ακόμα και 24 ώρες μετά την επίδραση H₂O₂ (91 ± 1 %). (Εικόνα 4), (Διάγραμμα 4)
- ➔ Φαίνεται πως η καβεολίνη-1 είναι υψηλής σημασίας πρωτεΐνη για την απόκριση των WJ-MSCs στο οξειδωτικό στρες, και συγκεκριμένα στο H₂O₂. Επιπλέον, καταλαβαίνουμε ότι η δράση της καβεολίνης-1 στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες εντοπίζεται στον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) καθώς η απορρύθμιση της έκφρασης της μειώνει δραματικά την

ικανότητα των κυττάρων WJ-MSCs να επιδιορθώνουν τις δίκλωνες ρήξεις στην αλυσίδα του DNA που προκαλεί σε αυτά το οξειδωτικό στρες.

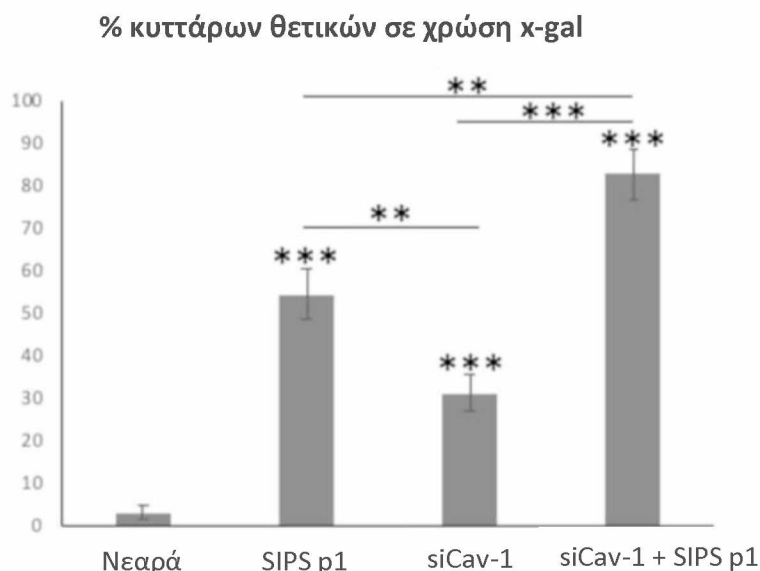
Γ.3 Η σίγηση της καβεολίνης-1 εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση πρόωρης κυτταρικής γήρανσης

Έχοντας διαπιστώσει ότι η καβεολίνη-1 είναι απαραίτητη για την απόκριση στο οξειδωτικό στρες μέσω της συμμετοχής της στον μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, στη συνέχεια μελετήσαμε αν η απορρύθμιση της έκφρασής της συμβάλλει στην εγκαθίδρυση της πρόωρης γήρανσης επαγόμενης από οξειδωτικό στρες λόγω συσσώρευσης βλαβών. Για τον λόγο αυτό, νεαρά κύτταρα στα οποία έγινε σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 υποβλήθηκαν σε παρατεταμένη επίδραση με H₂O₂ με σκοπό την αξιολόγηση επαγωγής SIPS. Η αξιολόγηση έγινε με την ανίχνευση δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση όπως περιγράφηκε και παραπάνω και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με νεαρά κύτταρα, με κύτταρα που είχαν υποστεί μόνο σίγηση καβεολίνης-1 και με κύτταρα που είχαν υποστεί μόνο πρόωρη γήρανση μέσω οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 5: Αξιολόγηση της δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάση με προσθήκη X-gal σε νεαρά κύτταρα (νεαρά), σε κύτταρα που έχει επαχθεί πρόωρα η γήρανση μέσω H₂O₂ και έχουν

αναδιπλασιαστεί μία φορά (SIPS p1), σε κύτταρα με σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 (siCav-1) και σε κύτταρα με πρόωρα επαγόμενη γήρανση και ταυτόχρονη σίγηση της καβεολίνης-1 (siCav-1+ SIPS p1).



Διάγραμμα 5: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση SA-β-gal σε νεαρά, SIPS p1, siCav-1 και siCav-1+SIPS p1 WJ-MSCs. Οι P values που απεικονίζονται έχουν προκύψει από τον μέσο όρο ± S.E. ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Ο υπολογισμός έγινε με χρήση του Student t-test.

Παρατηρήσεις:

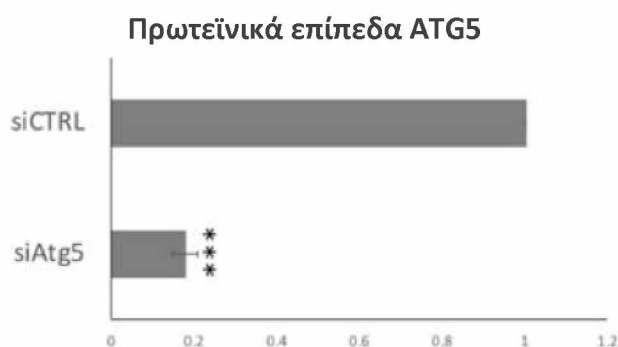
- Το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά στη χρώση με SA-β-gal στα κύτταρα SIPS p1 είναι 54,3 ± 5,95%, πολύ παραπάνω σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα, επομένως έχει επαχθεί επιτυχώς η γήρανση.
 - Το ποσοστό των θετικών σε χρώση με SA-β-gal κυττάρων στις περιπτώσεις που έγινε σίγηση της καβεολίνης-1 είναι 31 ± 4,39 %, αυξημένο δηλαδή σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Παρατηρούμε δηλαδή ότι η σίγηση της καβεολίνης-1 είναι ικανή να επάγει την πρόωρη γήρανση στα κύτταρα.
 - Σε κύτταρα που έγινε σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 και επαγωγή πρόωρης γήρανσης με H₂O₂ το ποσοστό θετικών σε χρώση με SA-β-gal κυττάρων εκτινάσσεται στο 82,5 ± 6,08 %.
- ➔ Είναι εμφανές ότι η σίγηση της καβεολίνης-1 οδηγεί σε ενίσχυση της εγκαθίδρυσης πρόωρης γήρανσης, πιθανώς μέσω του ρόλου που παίζει στην απόκριση στις βλάβες στο DNA που προκαλεί το οξειδωτικό στρες που παρατηρήσαμε νωρίτερα.

Γ.4 Η σίγηση της καβεολίνης-1 επάγει την πρόωρη γήρανση μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας

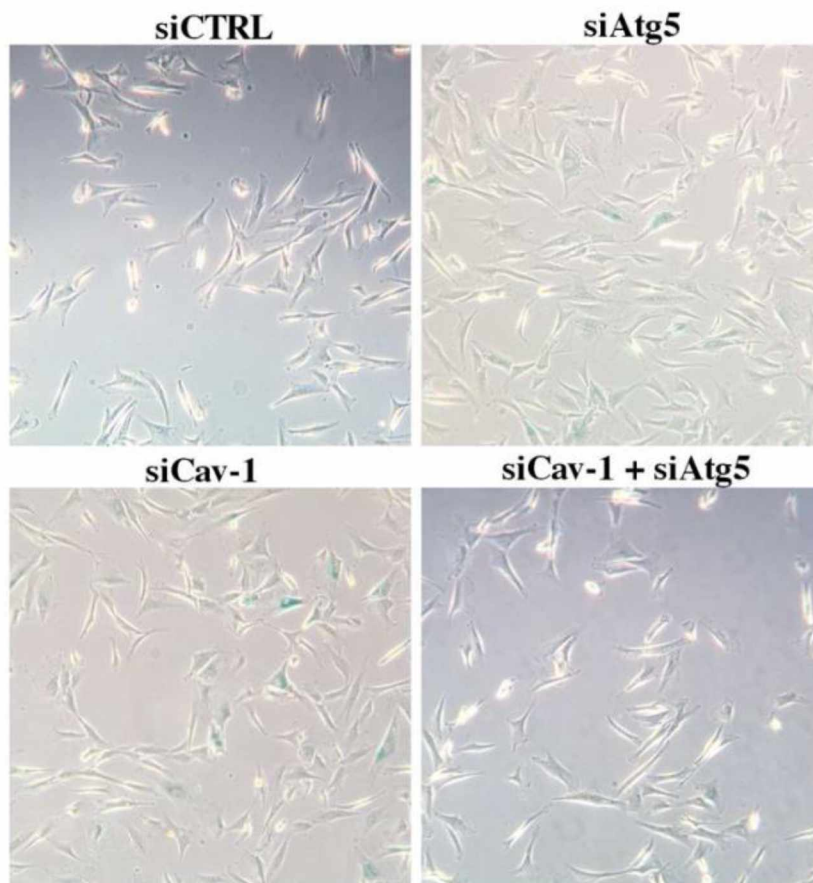
Δεδομένης της σχέσης της αυτοφαγικής διαδικασίας με την κυτταρική γήρανση αλλά και της σχέσης της καβεολίνης-1 με την αυτοφαγία στην συνέχεια επιχειρήσαμε να δούμε αν υπάρχει κάποια συνεργασία αυτών των δύο στο πλαίσιο της πρόωρα επαγόμενης γήρανσης. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά έγινε σίγηση της έκφρασης του μορίου της αυτοφαγίας ATG5 αλλά και της καβεολίνης-1 σε νεαρά κύτταρα στα οποία στην συνέχεια αξιολογήσαμε την δραστηριότητα της SA-β-gal για να μελετήσουμε την σχέση της αυτοφαγίας και της καβεολίνης-1 στο πλαίσιο της γήρανσης. Ο λόγος που επιλέχθηκε το ATG5 είναι λόγω της άμεσης αλληλεπίδρασης με την καβεολίνη-1 που φαίνεται από την βιβλιογραφία πως έχει (268).



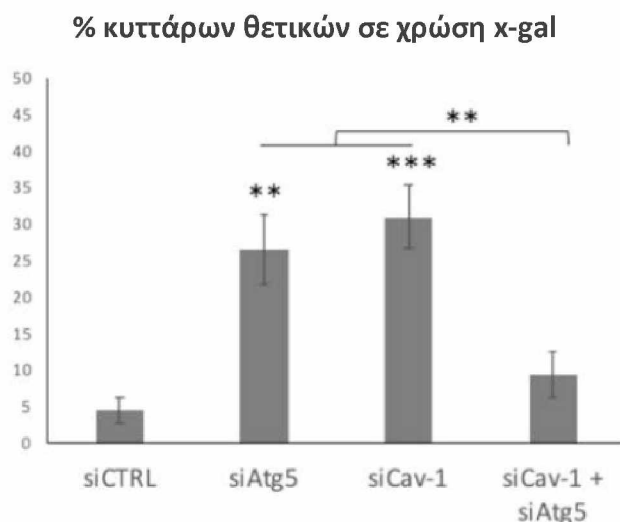
Εικόνα 7: Ανοσοαποτύπωμα κατά Western των πρωτεϊνικών επιπέδων του ATG5 (55KDa) μετά από σίγηση της έκφρασης του (siAtg5) και σε συνθήκες control (siCTRL). Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (45KDa).



Διάγραμμα 7: Απεικόνιση πρωτεϊνικών επιπέδων του Atg5 σε νεαρά WJ-MSCs μετά από σίγηση της έκφρασης του (siAtg5) και σε συνθήκες κοντρόλ (siCTRL). Η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση την πυκνότητα των μπαντών στην ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση του λογισμικού Image j. Οι p values που απεικονίζονται έχουν προκύψει από τον μέσο όρο \pm S.E. *** $p < 0.001$ σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα υπό συνθήκες κοντρόλ (siCTRL).



Εικόνα 8: Αξιολόγηση της δραστηριότητας SA-β-gal σε νεαρά κύτταρα στα οποία έγινε σίγηση της καβεολίνης-1 (siCav-1), σίγηση του ATG5 και σίγηση της καβεολίνης-1 ταυτόχρονα με το ATG5 (siCav-1+ siAtg5).

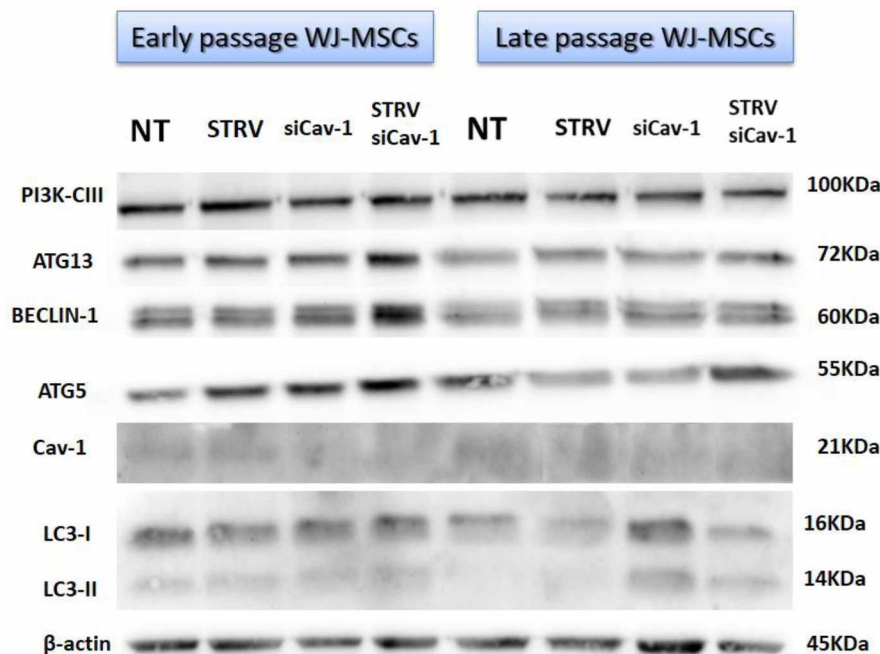


Διάγραμμα 8: Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση SA-β-gal σε νεαρά κύτταρα υπό σίγηση έκφρασης της καβεολίνης-1 (siCav-1), σίγηση έκφρασης του Atg5 και υπό σίγηση έκφρασης της καβεολίνης-1 ταυτόχρονα με το ATG5 (siCav-1+siAtg5). Οι p values που απεικονίζονται έχουν προκύψει από τον μέσο όρο \pm S.E. ** p < 0.01, *** p < 0.001 σε σχέση με την συνθήκη siCav-1.

- Η σίγηση του ATG5 είναι επιτυχής καθώς η έκφραση της πρωτεΐνης έχει μειωθεί (Εικόνα 7) και η μείωση αυτή είναι της τάξεως του 80%. (Διάγραμμα 7)
- Υπάρχει σημαντική μείωση στα επίπεδα γηρασμένων κυττάρων στα κύτταρα με διπλή σίγηση και των δύο μορίων (καβεολίνη-1 και ATG5) σε σχέση με τα κύτταρα που έγινε μόνο σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 ή μόνο σίγηση της έκφρασης του ATG5. (Εικόνα 8), (Διάγραμμα 8)
- ➔ Επομένως, η σίγηση της καβεολίνης-1 οδηγεί σε επαγόμενη από στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση με έναν τρόπο που εξαρτάται από την αυτοφαγία.

Γ.5 Η αύξηση των επιπέδων καβεολίνης-1 σε αναδιπλασιαστικά γηρασμένα κύτταρα πιθανώς οφείλεται για την απορρύθμιση της αυτοφαγικής τους απόκρισης

Με σκοπό μια πιο γενική εικόνα για τον ρόλο της αυτοφαγίας και της καβεολίνης-1 στην κυτταρική γήρανση ακολούθησε διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων πολλών αυτοφαγικών μορίων σε νεαρά (early passage) και αναδιπλασιαστικά γηρασμένα κύτταρα (late passage) υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπό σίγηση καβεολίνης-1, υπό έλλειψη θρεπτικών συστατικών αλλά και σε συνδυασμό αυτών των δύο συνθηκών.



Εικόνα 9: Ανοσοαποτύπωμα κατά Western στο οποίο φαίνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων ATG13, PI3K-CIII, BECLIN-1, ATG5, LC3-I/II, Cav-1 σε early και late passage βλαστοκύτταρα WJ-MSCs σε φυσιολογικές συνθήκες (NT), υπό έλλειψη θρεπτικών συστατικών (STRV), υπό σίγηση καβεολίνης-1 (siCav-1) και υπό συνδυασμό σίγησης καβεολίνης-1 και έλλειψης θρεπτικών συστατικών (STRV+siCav-1). Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. [75]

Παρατηρήσεις:

- Σε νεαρά κύτταρα (early passage) η έλλειψη θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας (Starvation) οδήγησε σε αύξηση της αυτοφαγικής ροής σε σχέση με την κατάσταση No Treatment (NT). Αυτό είναι εμφανές από την αύξηση στα επίπεδα των πρωτεϊνών ATG13, PI3K-CIII, BECLIN-1, ATG5, οι οποίες εμπλέκονται στην δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων αλλά και στην αύξηση τόσο της LC3-I όσο και της LC3-II μορφής. Η τελευταία αποτελεί άλλωστε και δείκτη δημιουργίας ώριμων αυτοφαγοσωμάτων (213). Η σίγηση της καβεολίνης-1 (siCav-1) στα νεαρά κύτταρα οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση της αυτοφαγικής ροής όπως αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα των περισσότερων πρωτεϊνών της αυτοφαγίας σε σχέση με την NT κατάσταση αλλά και σε σχέση με την έλλειψη θρεπτικών. Ο συνδυασμός της σίγησης της έκφρασης καβεολίνης-1 και της έλλειψης θρεπτικών συστατικών οδήγησε σε αθροιστική αύξηση της αυτοφαγικής ροής στα νεαρά κύτταρα σε σχέση τόσο με την σκέτη σίγηση της καβεολίνης-1 όσο και με την σκέτη έλλειψη θρεπτικών (Εικόνα 9).
- Στα αναδιπλασιαστικά γηρασμένα κύτταρα (late passage) σε κατάσταση NT παρατηρούμε αρχικά αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε οριακή αύξηση της αυτοφαγικής ροής σε σχέση με την NT κατάσταση, ενώ παρατηρούνται και πάλι αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1. Η σίγηση της καβεολίνης-1 επάγει οριακή αύξηση της αυτοφαγίας η οποία είναι λίγο μεγαλύτερη όταν συνδυάζεται και με την έλλειψη θρεπτικών (Εικόνα 9).
- Ωστόσο, στα γηρασμένα κύτταρα συνολικά παρατηρείται μια απορρύθμιση της αυτοφαγικής απόκρισης σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Αυτό είναι εμφανές από τα μειωμένα αυτοφαγικά επίπεδα που παρατηρούνται σε γηρασμένα κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα, αλλά και από την αδυναμία ισχυρής ενεργοποίησης της αυτοφαγικής ροής υπό το στρες της στέρησης θρεπτικών συστατικών σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Η απορρύθμιση αυτή πιθανώς σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 που παρατηρούνται στα γηρασμένα κύτταρα (Εικόνα 9).

Δ. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Με σκοπό την αποσαφήνιση των βιολογικών μορίων και διεργασιών που ρυθμίζουν την κυτταρική γήρανση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, στην παρούσα διπλωματική εργασία εστίασαμε στην πρωτεΐνη καβεολίνη-1 και στην αυτοφαγική διαδικασία. Τόσο η καβεολίνη-1 όσο και η αυτοφαγία χαρακτηρίζονται ως πλειοτροπικοί ρυθμιστές της κυτταρικής γήρανσης λόγω της δράσης του ως επαγωγείς αλλά και ως αναστολείς της (5,242,247). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες δείχνουν μια ξεκάθαρη αλληλεπίδραση μεταξύ της καβεολίνης-1 και πολλών μορίων της αυτοφαγίας (23,268,274). Τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στην διερεύνηση της σχέσης μεταξύ καβεολίνης-1 και της αυτοφαγικής διαδικασίας στο πλαίσιο της κυτταρικής γήρανσης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προερχόμενων από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs).

Η σχέση της καβεολίνης-1 με την κυτταρική γήρανση έχει διερευνηθεί τόσο από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου όσο και από άλλους ερευνητές. Στο πλαίσιο πρόσφατης μελέτη του εργαστηρίου (98), διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα καβεολίνης-1 είναι υψηλά σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα τα οποία θεωρούνται από την βιβλιογραφία και από εμάς ως γηρασμένα λόγω στρες κύτταρα (281,293). Στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι η σωστή ρύθμιση της αύξησης και του υποκυτταρικού εντοπισμού της καβεολίνης-1 σε χονδροκύτταρα, είναι καίριας σημασίας για την αντιμετώπιση των δίκλωνων ρήξεων στο DNA που προκαλεί το οξειδωτικό στρες (98), ενώ άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα καβεολίνης-1 μειώνονται ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (93).

Επομένως, αρχικά επιχειρήσαμε να αποσαφηνίσουμε τον ρόλο της καβεολίνης-1 στην ρύθμιση της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης βλαστοκυττάρων WJ-MSCs. Έτσι, σε early passage κύτταρα εφαρμόστηκαν υπο-θανατηφόρες συγκεντρώσεις οξειδωτικού στρες, οι οποίες είναι γνωστό ότι επάγουν πρόωρα την κυτταρική γήρανση τόσο σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (294) όσο και σε άλλα είδη κυττάρων (295), και αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα καβεολίνης-1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 σε πρόωρα γηρασμένα λόγω οξειδωτικού στρες WJ-MSCs σε σχέση με τα control (νεαρά) WJ-MSCs. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αποτελούν ενδείξεις ότι η αύξηση της καβεολίνης-1 εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση ενός πρόωρα γηρασμένου φαινοτύπου σε WJ-MSCs, γεγονός που συμφωνεί με αποτελέσματα μελετών σε άλλα είδη κυττάρων (295). Το οξειδωτικό στρες δρα προκαλώντας βλάβες στο DNA τις οποίες όταν το κύτταρο

αδυνατεί να επιδιορθώσει οδηγείται σε πρόωρη γήρανση (87,294). Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου σε χονδροκύτταρα έδειξε ότι υπό έκθεση σε οξειδωτικό στρες η έκφραση της καβεολίνης-1 αυξάνεται και ακολουθεί μετατόπιση της στον πυρήνα, η οποία συμπίπτει με την επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA που προκαλεί το οξειδωτικό στρες, ενώ σε οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα η ικανότητα αύξησης της καβεολίνης-1 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες χάνεται ενώ εντοπίζεται στον πυρήνα ακόμα και σε φυσιολογική κατάσταση. Ως αποτέλεσμα, οι δίκλωνες ρήξεις στην αλυσίδα του DNA παραμένουν σε μεγάλο βαθμό χωρίς επιδιόρθωση οδηγώντας έτσι στην εγκαθίδρυση του πρόωρα γηρασμένου φαινοτύπου τους (98). Επομένως, υπάρχουν ενδείξεις για την συμμετοχή της καβεολίνης-1 στον μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA σε χονδροκύτταρα (98). Έτσι, σε επόμενο στάδιο επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε αν η καβεολίνη-1 εμπλέκεται στον μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών και σε WJ-MSCs. Πραγματοποιήθηκε σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 σε νεαρά κύτταρα με την τεχνολογία της RNA παρεμβολής, εφαρμογή οξειδωτικού στρες για σύντομο χρονικό διάστημα και αξιολόγηση της ικανότητας επιδιόρθωσης δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA στα κύτταρα αυτά σε σχέση με κύτταρα με φυσιολογική έκφραση καβεολίνης-1. Παρατηρήσαμε ότι υπό σίγηση της καβεολίνης-1 δεν ήταν δυνατή η επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων στην αλυσίδα του DNA, καθώς στον πυρήνα των κυττάρων αυτών εντοπίστηκαν εστίες της p53 συνδεόμενης πρωτεΐνης (53BP1) ακόμα και 24 ώρες μετά την επίδραση με υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αντίθετα, στα κύτταρα με φυσιολογική έκφραση καβεολίνης-1 παρατηρήθηκε αύξηση των βλαβών στο DNA 1 ώρα μετά την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου αλλά 24 ώρες μετά την επίδραση η πλειοψηφία είχε επιδιορθωθεί. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την συμμετοχή της καβεολίνης-1 στον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες στο DNA σε WJ-MSCs, και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μείωση της έκφρασής της οδηγεί σε συσσώρευση βλαβών. Έχοντας αποσαφηνίσει την αύξηση των επιπέδων καβεολίνης-1 σε πρόωρα γηρασμένα WJ-MSCs αλλά και την σημασία της καβεολίνης-1 για την απόκριση του κυττάρου σε γενοτοξικές βλάβες, στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η απορρύθμιση της καβεολίνης-1 εμπλέκεται στην επαγωγή πρόωρης γήρανσης λόγω συσσώρευσης βλαβών. Έτσι, πραγματοποιήθηκε σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 σε νεαρά WJ-MSCs και παρατεταμένη εφαρμογή υποθανατηφόρων συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και μόνο η σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 προκαλεί αύξηση στο

ποσοστό των πρόωρα γηρασμένων κυττάρων. Επιπλέον, ο συνδυασμός εφαρμογής οξειδωτικού στρες και σίγησης της καβεολίνης-1 επέφερε πολύ μεγαλύτερη αύξηση στα ποσοστά πρόωρα γηρασμένων κυττάρων σε σχέση με την εφαρμογή της κάθε συνθήκης ξεχωριστά. Από αυτές τις παρατηρήσεις συμπεραίνουμε ότι η σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 οδηγεί σε πρόωρη κυτταρική γήρανση τα WJ-MSCs πιθανώς ως αποτέλεσμα της μη επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA λόγω οξειδωτικού στρες, με σκοπό την αναστολή πολλαπλασιασμού τους για την αποφυγή της γενετικής αστάθειας και των αρνητικών συνεπειών της. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες που υποστηρίζουν ότι η καβεολίνη-1 δρα ανασταλτικά στην κυτταρική γήρανση (65,194,195) παρέχοντας παράλληλα και νέες πληροφορίες για αυτόν τον ρόλο της σε WJ-MSCs ο οποίος σχετίζεται με τον μηχανισμό απόκρισης σε γενοτοξικές βλάβες, ενώ έρχονται σε αντίθεση με μελέτες που υποστηρίζουν ότι η σίγηση της καβεολίνης-1 επαναφέρει τον μορφολογικά νεαρό φαινότυπο σε γηρασμένους ανθρώπινους ινοβλάστες δρώντας ανασταλτικά στην γήρανση (296). Σε αυτό το σημείο γίνεται εμφανής η πλειοτροπική δράση της καβεολίνης-1 στην κυτταρική γήρανση, καθώς σε πρόωρα γηρασμένα WJ-MSCs παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της, ενώ η μείωση της έκφρασης της καβεολίνης-1 ευθύνεται για την πρόωρη επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης μέσω συσσώρευσης βλαβών.

Ένας ακόμα πλειοτροπικός ρυθμιστής της κυτταρικής γήρανσης είναι και η αυτοφαγία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (242,247). Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την σχέση μεταξύ καβεολίνης-1 και διάφορων αυτοφαγικών μορίων (141,268,297). Με βάση τα παραπάνω θελήσαμε να ερευνήσουμε πιθανή συμμετοχή της αυτοφαγίας στην επαγωγή της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης που φαίνεται ότι επάγει η σίγηση της καβεολίνης-1 και πιθανώς να εξάγουμε συμπεράσματα για την σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και γήρανσης σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Για τον σκοπό αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε σίγηση της έκφρασης της ATG5 πρωτεΐνης της αυτοφαγίας σε συνδυασμό με σίγηση της καβεολίνης-1 σε νεαρά WJ-MSCs και αξιολογήθηκε το ποσοστό γηρασμένων κυττάρων. Το συγκεκριμένο μόριο αποτελεί μέρος ενός εκ των δύο συστημάτων που οδηγούν στην λιπιδίωση της LC3-I προς LC3-II και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά στενά με την καβεολίνη-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα (268). Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος έδειξαν ότι η ταυτόχρονη σίγηση της καβεολίνης-1 και του ATG5 μειώνει δραματικά την εμφάνιση πρόωρης γήρανσης σε σχέση τόσο με την σίγηση της καβεολίνης-1 όσο και με την σίγηση του ATG5 ξεχωριστά. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μείωση

της έκφρασης της καβεολίνης-1 οδηγεί σε πρόωρη κυτταρική γήρανση μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγικής διαδικασίας. Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε την σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και καβεολίνης-1 στο πλαίσιο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης με σκοπό να κατανοήσουμε την πλήρη εικόνα. Έτσι, σε early και late passage WJ-MSCs πραγματοποιήθηκε στέρωση θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας, η οποία αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή της αυτοφαγίας (298,299), σίγηση της καβεολίνης-1 και συνδυασμός των δύο συνθηκών και αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων πολλών μορίων της αυτοφαγίας. Σε early passage WJ-MSCs με φυσιολογική έκφραση καβεολίνης-1 παρατηρείται αύξηση της αυτοφαγικής ροής ως απόκριση σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας. Υπό σίγηση της καβεολίνης-1 παρατηρείται ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της αυτοφαγικής ροής, ενώ συνδυασμός των δύο συνθηκών οδηγεί σε αθροιστική αύξηση της αυτοφαγίας. Παρατηρούμε επίσης ότι η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας λόγω στέρωσης θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε αύξηση του μορίου ATG5, όπως είναι αναμενόμενο, η οποία είναι πολύ εντονότερη υπό σίγηση της καβεολίνης-1. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την διαπίστωση μελέτης των Chen και συνεργατών, οι οποίοι υποστηρίζουν ότι φυσιολογικά η καβεολίνη-1 δημιουργεί σύμπλοκο με το ATG5 και αναστέλλει την σύνδεση του στο ATG12 εμποδίζοντας έτσι την αυτοφαγία, ενώ υπό στρεσογόνες συνθήκες αλλά και υπό σίγηση της καβεολίνης-1 η αλληλεπίδραση αυτή αίρεται και η αυτοφαγία επάγεται (268). Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η καβεολίνη-1 φυσιολογικά σε νεαρά WJ-MSCs ασκεί μια ανασταλτική ρύθμιση στην αυτοφαγία καθώς η σίγηση της οδηγεί σε υπέρμετρη αύξηση της αυτοφαγίας. Σε late passage κύτταρα τα επίπεδα καβεολίνης-1 είναι πολύ αυξημένα ήδη και στην NT κατάσταση. Μετά την αφαίρεση θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας παρατηρείται μια οριακή αύξηση της αυτοφαγικής ροής ενώ τα επίπεδα καβεολίνης-1 παραμένουν υψηλά. Η σίγηση της έκφρασης της καβεολίνης-1 αυξάνει την αυτοφαγική ροή όπως και ο συνδυασμός των δύο συνθηκών, ωστόσο και πάλι αυτή η αύξηση είναι μικρή σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Συνολικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι στα late passage WJ-MSCs τα υπερβολικά αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 που παρατηρούνται ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες οδηγούν σε απορρυθμισμό της αυτοφαγικής απόκρισης σε σχέση με τα early passage κύτταρα, η οποία παραμένει ακόμα και σε συνθήκες στρες (έλλειψη θρεπτικών συστατικών). Αυτό πιθανώς αποτελεί αιτία για τον γηρασμένο φαινότυπο που εμφανίζουν καθώς έχει προταθεί από μελέτες ότι η αυτοφαγία δρα

προστατευτικά ενάντια στην γήρανση μέσω απομάκρυνσης κατεστραμμένων μορίων και οργανιδίων (243). Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν την σημασία της σωστής ρύθμισης των επιπέδων καβεολίνης-1 στα κύτταρα, απορρύθμιση της οποίας με την μορφή αύξησης ή μείωσης οδηγεί σε απορρύθμιση και της αυτοφαγικής διαδικασίας η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε κυτταρική γήρανση. Συνοψίζοντας, η παρούσα διπλωματική εργασία παρέχει στοιχεία τα οποία βοηθούν στην αποσαφήνιση του πλειοτροπικού τρόπου ρύθμισης της γήρανσης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων της γέλης του Wharton από την καβεολίνη-1, επεξηγώντας τις φαινομενικά αντίθετες δράσεις της υπό το πρίσμα της επιδιόρθωσης γενοτοξικών βλαβών ενώ αναδεικνύει και τον ρόλο της αυτοφαγικής διαδικασίας στην ρύθμιση αυτή.

E. Βιβλιογραφία

1. Kaya S, Wiesmann N, Goldschmitt J, Krüger M, Al-Nawas B, Heider J. Differences in the expression of caveolin-1 isoforms in cancer-associated and normal fibroblasts of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2021 Mar 27 [cited 2021 Aug 12];25(10):5823–31. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-03887-8>
2. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, et al. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells: Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 [cited 2021 Aug 10];271(25):15160–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8663016/>
3. de Almeida CJG. Caveolin-1 and Caveolin-2 can be antagonistic partners in inflammation and beyond [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2017 [cited 2021 Jul 28]. Available from: <https://pmc/articles/PMC5715436/>
4. Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomoli M, Lodish HF, Lisanti MP. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Caveolin Isoforms Differ in Their N-terminal Protein Sequence and Subcellular Distribution IDENTIFICATION AND EPITOPE MAPPING OF AN ISOFORM-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY PROBE*. *J Biol Chem*. 1995;270(27):16395–401.
5. Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence [Internet]. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer; 2020 [cited 2021 May 8]. p. 397–414. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-020-09875-w>
6. Scherer PE, Lewis RY, Volonté D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Nov 14 [cited 2021 Aug 8];272(46):29337–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9361015/>
7. Filippini A, D'aleccio A. Caveolae and lipid rafts in endothelium: Valuable organelles for multiple functions [Internet]. Vol. 10, *Biomolecules*. Biomolecules; 2020 [cited 2021 Aug 26]. p. 1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825713/>
8. Liu P, Li W-P, Machleidt T, Anderson RGW. Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat Cell Biol* 1999 16 [Internet]. 1999 Sep 16 [cited 2021 Aug 26];1(6):369–75. Available from: https://www.nature.com/articles/ncb1099_369
9. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* [Internet]. 1998 Oct 9 [cited 2021 Aug 26];436(3):403–10. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2898%2901134-X>
10. Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer; 2020. p. 397–414.
11. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Mar 7 [cited 2021 Aug 26];272(10):6525–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9045678/>
12. Schlegel A, Lisanti MP. A Molecular Dissection of Caveolin-1 Membrane Attachment and Oligomerization TWO SEPARATE REGIONS OF THE CAVEOLIN-1 C-TERMINAL DOMAIN MEDIATE MEMBRANE BINDING AND OLIGOMER/OLIGOMER INTERACTIONS IN VIVO*. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 [cited 2021 Aug 12];275:21605–17. Available from: <http://www.jbc.org>
13. Hou K, Li S, Zhang M, Qin X. Caveolin-1 in autophagy: A potential therapeutic target in atherosclerosis [Internet]. Vol. 513, *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2021 [cited 2021 May 8]. p. 25–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33279502/>
14. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 [cited 2021 Aug 12];272(10):6525–33. Available from: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>
15. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, et al. Oligomeric structure of caveolin: Implications for caveolae membrane organization. *Cell Biol Environ Heal Sci*. 1995;92:9407–11.
16. Wang S, Wang N, Zheng Y, Zhang J, Zhang F, Wang Z. Caveolin-1: An Oxidative Stress-

- Related Target for Cancer Prevention [Internet]. Vol. 2017, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2017 [cited 2021 May 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28546853/>
17. Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin Is Palmitoylated on Multiple Cysteine Residues: PALMITOYLATION IS NOT NECESSARY FOR LOCALIZATION OF CAVEOLIN TO CAVEOLAE (*). *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Mar 24 [cited 2021 Aug 27];270(12):6838–42. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925818827296/fulltext>
 18. Parat MO, Fox PL. Palmitoylation of Caveolin-1 in Endothelial Cells is Post-translational but Irreversible. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 May 11 [cited 2021 Aug 27];276(19):15776–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11278313/>
 19. Lee H, Woodman SE, Engelman JA, Volonte D, Galbiati F, Kaufman HL, et al. Palmitoylation of Caveolin-1 at a Single Site (Cys-156) Controls its Coupling to the c-Src Tyrosine Kinase: Targeting of dually acylated molecules (Gpi-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (Tyr-14). *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Sep 14 [cited 2021 Aug 27];276(37):35150–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451957/>
 20. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, G(α) subunits, and H-Ras share a common membrane- anchored scaffolding protein, caveolin: Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(46):29182–90.
 21. Chen D, Li S, Qian X-X, Moon C, Zheng J. Tyrosine Phosphorylation of Caveolin 1 by Oxidative Stress Is Reversible and Dependent on the c-src Tyrosine Kinase but Not Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Placental Artery Endothelial Cells. *Biol Reprod* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2021 Aug 27];73(4):761–72. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/73/4/761/2667037>
 22. Cao H, Sanguinetti AR, Mastick CC. Oxidative stress activates both Src-kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: Caveolin-1 and paxillin. *Exp Cell Res* [Internet]. 2004 Mar 10 [cited 2021 Aug 27];294(1):159–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14980511/>
 23. Nah J, Yoo SM, Jung S, Jeong E Il, Park M, Kaang BK, et al. Phosphorylated CAV1 activates autophagy through an interaction with BECN1 under oxidative stress. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017 May 25 [cited 2021 Aug 25];8(5):e2822. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis201771>
 24. Maggi D, Biedi C, Segat D, Barbero D, Panetta D, Cordera R. IGF-I induces caveolin 1 tyrosine phosphorylation and translocation in the lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002 [cited 2021 Aug 27];295(5):1085–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12135605/>
 25. Gottlieb-Abraham E, Shvartsman DE, Donaldson JC, Ehrlich M, Gutman O, Martin GS, et al. Src-mediated caveolin-1 phosphorylation affects the targeting of active Src to specific membrane sites. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2021 Aug 27];24(24):3881. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24243881/>
 26. Wong TH, Dickson FH, Timmins LR, Nabi IR. Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression [Internet]. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews*. Cancer Metastasis Rev; 2020 [cited 2021 Aug 27]. p. 455–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32440845/>
 27. Zimnicka AM, Husain YS, Shajahan AN, Sverdllov M, Chaga O, Chen Z, et al. Src-dependent phosphorylation of caveolin-1 Tyr-14 promotes swelling and release of caveolae. <https://doi.org/10.1091/mbcE15-11-0756> [Internet]. 2016 May 11 [cited 2021 Aug 27];27(13):2090–106. Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/abs/10.1091/mbc.e15-11-0756>
 28. Schlegel A, Arvan P, Lisanti MP. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Feb 9 [cited 2021 Aug 27];276(6):4398–408. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11078729/>
 29. Kirchner P, Bug M, Meyer H. Ubiquitination of the N-terminal Region of Caveolin-1 Regulates Endosomal Sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase *. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Mar 8 [cited 2021 Aug 27];288(10):7363–72. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925819624129/fulltext>
 30. Lee CY, Lai TY, Tsai MK, Chang YC, Ho YH, Yu IS, et al. The ubiquitin ligase ZNRF1 promotes caveolin-1 ubiquitination and degradation to modulate inflammation. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Jun 8 [cited 2021 Aug 27];8(1):1–14. Available from:

- <https://www.nature.com/articles/ncomms15502>
31. Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia T V. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1995 [cited 2021 Aug 10];6(7):911–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7579702/>
 32. Walter P, Blobel G. Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. *J Cell Biol* [Internet]. 1983 Dec 1 [cited 2021 Aug 27];97(6):1693–9. Available from: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/97/6/1693/1389637/1693.pdf>
 33. Gilmore R, Blobel G, Walter P. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* [Internet]. 1982 Nov 1 [cited 2021 Aug 27];95(2):463–9. Available from: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/95/2/463/1402487/463.pdf>
 34. Hayer A, Stoeber M, Bissig C, Helenius A. Biogenesis of caveolae: Stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*. 2010 Mar;11(3):361–82.
 35. Pol A, Martin S, Fernández MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, et al. Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Trafficking through the Golgi Complex and between the Cell Surface and Lipid Bodies □ V. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2005 [cited 2021 Aug 17];16:2091–105. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E04>
 36. Fridolfsson HN, Roth DM, Insel PA, Patel HH. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2021 Aug 17];28(9):3823. Available from: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24911390/>
 37. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* [Internet]. 2000 [cited 2021 Aug 17];6(12):1362–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11100121/>
 38. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 [cited 2021 Aug 17];272(30):18522–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9228013/>
 39. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* [Internet]. 1953 [cited 2021 Sep 2];24(11):1424. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10019993056>
 40. Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* [Internet]. 1995 Nov 27 [cited 2021 Aug 9];376(1–2):108–12. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/0014-5793%2895%2901256-7>
 41. Peters KR, Carley WW, Palade GE. Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. *J Cell Biol* [Internet]. 1985 Dec 1 [cited 2021 Aug 9];101(6):2233–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4066756/>
 42. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RGW. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* [Internet]. 1992 Feb 21 [cited 2021 Aug 9];68(4):673–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1739974/>
 43. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Sep 12 [cited 2021 Aug 11];92(19):8655–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7567992/>
 44. Lajoie P, Nabi IR. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol* [Internet]. 2010 [cited 2021 May 8];282(C):135–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20630468/>
 45. Örtengren U, Karlsson M, Blazic N, Blomqvist M, Nystrom FH, Gustavsson J, et al. Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes. *Eur J Biochem* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2021 Aug 9];271(10):2028–36. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.2004.04117.x>
 46. Parton RG, Tillu VA, Collins BM. *Current Biology*. R402 *Curr Biol*. 2018;28.
 47. Lamaze C, Tardif N, Dewulf M, Vassilopoulos S, Blouin CM. The caveolae dress code: structure and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2017 Aug 1;47:117–25.
 48. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, et al. PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function. *Cell* [Internet]. 2008 Jan 11 [cited 2021 Aug 27];132(1):113–24. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867407015462/fulltext>
 49. Liu L, Pilch PF. A Critical Role of Cavin (Polymerase I and Transcript Release Factor) in Caveolae Formation and Organization *. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Feb 15 [cited 2021 Aug 27];283(7):4314–22. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820697411/fulltext>

50. Dudău M, Codrici E, Tanase C, Gherghiceanu M, Enciu AM, Hinescu ME. Caveolae as Potential Hijackable Gates in Cell Communication. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers; 2020. p. 1228.
51. Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia T V., Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Oct 24 [cited 2021 Aug 17];92(22):10339–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7479780/>
52. Epand RM, Sayer BG, Epand RF. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *J Mol Biol* [Internet]. 2005 Jan 14 [cited 2021 Aug 17];345(2):339–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15571726/>
53. Yang G, Xu H, Li Z, Li F. Interactions of caveolin-1 scaffolding and intramembrane regions containing a CRAC motif with cholesterol in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 17];1838(10):2588–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24998359/>
54. Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RGW. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* [Internet]. 1994 Dec [cited 2021 Aug 18];127(5):1185–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7962084/>
55. Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A Caveolin Dominant Negative Mutant Associates with Lipid Bodies and Induces Intracellular Cholesterol Imbalance. *J Cell Biol* [Internet]. 2001 Mar 5 [cited 2021 Aug 18];152(5):1057. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11551120/>
56. Le Lay S, Hajdúch E, Lindsay MR, Le Lièvre X, Thiele C, Ferré P, et al. Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: A role for caveolar endocytosis. *Traffic* [Internet]. 2006 May [cited 2021 Aug 18];7(5):549–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16643278/>
57. Fielding PE, Fielding CJ. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* [Internet]. 2002 [cited 2021 Aug 18];34(44):14288–92. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00044a004>
58. Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Cell Biol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Aug 18];94:10693–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9410693/>
59. Fielding CJ, Bist A, Fielding PE. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Cell Biol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Aug 18];94:3753–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/943753/>
60. Sohn J, Lin H, Fritch MR, Tuan RS. Influence of cholesterol/caveolin-1/caveolae homeostasis on membrane properties and substrate adhesion characteristics of adult human mesenchymal stem cells. [cited 2021 Aug 17]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0830-4>
61. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* [Internet]. 2006 [cited 2021 Aug 19];4(3):185–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16950136/>
62. Bosch M, Mari M, Herms A, Fernández A, Fajardo A, Kassarjian A, et al. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol*. 2011;21(8):681–6.
63. Shiroto T, Romero N, Sugiyama T, Sartoretto JL, Kalwa H, Yan Z, et al. Caveolin-1 is a critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascular endothelium. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 3 [cited 2021 May 8];9(2):87871. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711111/>
64. Asterholm IW, Mundy DI, Weng J, Anderson RGW, Scherer PE. Altered Mitochondrial Function and Metabolic Inflexibility Associated with Loss of Caveolin-1. *Cell Metab* [Internet]. 2012 Feb 8 [cited 2021 Aug 19];15(2):171. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111111/>
65. Volonte D, Liu Z, Shiva S, Galbiati F. Caveolin-1 controls mitochondrial function through regulation of m-AAA mitochondrial protease. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 19];8(10):2355. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/>
66. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, et al. Caveolin-1 Null Mice Are Viable but Show Evidence of Hyperproliferative and Vascular Abnormalities. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Oct 12 [cited 2021 Aug 20];276(41):38121–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11457855/>
67. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* (80-)

- [Internet]. 2001 Sep 28 [cited 2021 Aug 20];293(5539):2449–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11498544/>
68. Glenney JR. Tyrosine Phosphorylation of a 22-kDa Protein Is Correlated with Transformation by Rous Sarcoma Virus*. *J Biol Chem*. 1989;264(34):20163–6.
 69. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Nov 28 [cited 2021 Aug 20];272(48):30429–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9374534/>
 70. Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, et al. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo: A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* [Internet]. 1998 May 29 [cited 2021 Aug 20];428(3):205–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9654135/>
 71. Park WY, Park JS, Cho KA, Kim DI, Ko YG, Seo JS, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jul 7 [cited 2021 Aug 20];275(27):20847–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10781609/>
 72. Zhang W, Razani B, Altschuler Y, Bouzahzah B, Mostov KE, Pestell RG, et al. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3): Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jul 7 [cited 2021 Aug 20];275(27):20717–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10748172/>
 73. Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, et al. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 [cited 2021 Aug 21];270(26):15693–701. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7797570/>
 74. Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG, Ishikawa Y. Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling*. 1998 [cited 2021 Aug 21]; Available from: <http://www.jbc.org>
 75. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 Potentiates Estrogen Receptor (ER) Signaling CAVEOLIN-1 DRIVES LIGAND-INDEPENDENT NUCLEAR TRANSLOCATION AND ACTIVATION OF ER*. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 [cited 2021 Aug 21];274:33551–6. Available from: <http://www.jbc.org>
 76. Betteridge DJ. What Is Oxidative Stress? 2000;
 77. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 24];22:377–88. Available from: www.nature.com/cdd
 78. Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress – a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int J Cosmet Sci* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2021 Aug 24];37:1–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ics.12287>
 79. Pole A, Dimri M, P. Dimri G. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Mol Sci* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sep 2];3(3):300–24. Available from: <http://www.aimspress.com/article/doi/10.3934/molsci.2016.3.300>
 80. Krause KH. Aging: A revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases [Internet]. Vol. 42, *Experimental Gerontology*. *Exp Gerontol*; 2007 [cited 2021 Sep 2]. p. 256–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17126513/>
 81. Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. 2015 [cited 2021 Aug 24]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/105135>
 82. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions [Internet]. Vol. 2016, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2016 [cited 2021 Sep 2]. Available from: <http://pmc/articles/PMC4960346/>
 83. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells [Internet]. Vol. 22, *Trends in Biochemical Sciences*. *Trends Biochem Sci*; 1997 [cited 2021 Sep 2]. p. 477–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9433128/>
 84. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: From health to disease [Internet]. Vol. 142, *Swiss Medical Weekly*. *Swiss Med Wkly*; 2012 [cited 2021 Sep 2]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22903797/>
 85. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1987 [cited 2021 Sep 2];84(24):9265–9. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2827174/>
86. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression [Internet]. Vol. 11, Trends in Cell Biology. Trends Cell Biol; 2001 [cited 2021 Sep 2]. p. 66–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11166214/>
 87. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1990 [cited 2021 Sep 2];87(12):4533–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2352934/>
 88. Zou H, Stoppani E, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. Mech Ageing Dev. 2011;132(11–12):533–42.
 89. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nat 2000 4086809 [Internet]. 2000 Nov 9 [cited 2021 Sep 3];408(6809):239–47. Available from: <https://www.nature.com/articles/35041687>
 90. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: The critical roles of p53 [Internet]. Vol. 32, Oncogene. Nature Publishing Group; 2013 [cited 2021 Sep 2]. p. 5129–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/onc2012640>
 91. Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Oxidative Stress Induces Premature Senescence by Stimulating Caveolin-1 Gene Transcription through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Sp1-Mediated Activation of Two GC-Rich Promoter Elements. Cancer Res [Internet]. 2006 Nov 15 [cited 2021 Aug 22];66(22):10805. Available from: </pmc/articles/PMC4288740/>
 92. Cai R, Xue Y, Huang J, Wang J, Wang J, Zhao S, et al. NS1619 regulates the expression of caveolin-1 protein in a time-dependent manner via ROS/PI3K/PKB/FoxO1 signaling pathway in brain tumor microvascular endothelial cells. J Neurol Sci [Internet]. 2016 Oct 15 [cited 2021 Aug 22];369:109–18. Available from: <http://www.jns-journal.com/article/S0022510X16304865/fulltext>
 93. Mougeolle A, Poussard S, Decossas M, Lamaze C, Lambert O, Dargelos E. Oxidative Stress Induces Caveolin 1 Degradation and Impairs Caveolae Functions in Skeletal Muscle Cells. 2015;
 94. Luanpitpong S, Talbott SJ, Rojanasakul Y, Nimmannit U, Pongrakhananon V, Wang L, et al. Regulation of Lung Cancer Cell Migration and Invasion by Reactive Oxygen Species and Caveolin-1. J Biol Chem. 2010 Dec 10;285(50):38832–40.
 95. Volonté D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP. Cellular Stress Induces the Tyrosine Phosphorylation of Caveolin-1 (Tyr14) via Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase and c-Src kinase: EVIDENCE FOR CAVEOLAE, THE ACTIN CYTOSKELETON, AND FOCAL ADHESIONS AS MECHANICAL SENSORS OF OSMOTIC STRESS. J Biol Chem. 2001 Mar 1;276(11):8094–103.
 96. Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Couraud P-O, Suzuki T, et al. Oxidative stress-induced activation of Abl and Src kinases rapidly induces P-glycoprotein internalization via phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14, decreasing cortisol efflux at the blood–brain barrier: <https://doi.org/10.1177/0271678X18822801> [Internet]. 2019 Jan 9 [cited 2021 Aug 22];40(2):420–36. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0271678X18822801>
 97. Parat MO, Stachowicz RZ, Fox PL. Oxidative stress inhibits caveolin-1 palmitoylation and trafficking in endothelial cells. Biochem J [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2021 Aug 22];361(3):681–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11802799/>
 98. Goutas A, Papathanasiou I, Mourmoura E, Tsesmelis K, Tsezou A, Trachana V. Oxidative Stress Response Is Mediated by Overexpression and Spatiotemporal Regulation of Caveolin-1. Antioxidants [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Aug 21];9(8):1–23. Available from: </pmc/articles/PMC7464519/>
 99. Volonte D, Liu Z, Musille PM, Stoppani E, Wakabayashi N, Di YP, et al. Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. Mol Biol Cell [Internet]. 2013 Jun 15 [cited 2021 Aug 22];24(12):1852–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23637463/>
 100. Li W, Liu H, Zhou J Sen, Cao JF, Zhou XB, Choi AMK, et al. Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2). J Biol Chem [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2021 Sep 10];287(25):20922–30. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820497868/fulltext>
 101. Petriello MC, Han SG, Newsome BJ, Hennig B. PCB 126 toxicity is modulated by cross-talk between caveolae and Nrf2 signaling. Toxicol Appl Pharmacol [Internet]. 2014 Jun 1 [cited

- 2021 Sep 10];277(2):192–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X14001148>
102. MUSTACICH D, POWIS G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* [Internet]. 2000 Feb 15 [cited 2021 Sep 10];346(1):1–8. Available from: /biochemj/article/346/1/1/35352/Thioredoxin-reductase
 103. Volonte D, Galbiati F. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Rep* [Internet]. 2009 Dec [cited 2021 Sep 10];10(12):1334. Available from: /pmc/articles/PMC2799211/
 104. Gad H, Koolmeister T, Jemth A-S, Eshtad S, Jacques SA, Ström CE, et al. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nat* 2014 5087495 [Internet]. 2014 Apr 2 [cited 2021 Oct 8];508(7495):215–21. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13181>
 105. Volonte D, Vyas AR, Chen C, Dacic S, Stabile LP, Kurland BF, et al. Caveolin-1 promotes the tumor suppressor properties of oncogene-induced cellular senescence. *J Biol Chem* [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2021 Sep 10];293(5):1794–809. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820389560/fulltext>
 106. Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews*. 2020. p. 397–414.
 107. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965 Mar 1;37(3):614–36.
 108. Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Ibrahim JG, et al. Expression of p16INK4a in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* [Internet]. 2009 [cited 2021 Sep 22];8(4):439–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19485966/>
 109. Caldwell ME, Denicola GM, Martins CP, Jacobetz MA, Maitra A, Hruban RH, et al. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* [Internet]. 2012 Mar 22 [cited 2021 Sep 22];31(12):1599–608. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21860420/>
 110. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 29;0:485.
 111. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell* [Internet]. 2013 Jun 6 [cited 2021 Sep 22];153(6):1194–217. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867413006454/fulltext>
 112. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nat* 2011 4797372 [Internet]. 2011 Nov 2 [cited 2021 Sep 22];479(7372):232–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10600>
 113. Sharpless NE. Ink4a/Arf links senescence and aging. In: *Experimental Gerontology* [Internet]. *Exp Gerontol*; 2004 [cited 2021 Sep 22]. p. 1751–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15582292/>
 114. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011 Dec 1;21(6):354–9.
 115. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec 1;25(3):585–621.
 116. Campisi J, Kim S ho, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol*. 2001 Nov 1;36(10):1619–37.
 117. D'Adda Di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response [Internet]. Vol. 18, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004 [cited 2021 Aug 31]. p. 1781–99. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/18/15/1781.full>
 118. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nat* 1990 3456274 [Internet]. 1990 [cited 2021 Aug 31];345(6274):458–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/345458a0>
 119. Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol Cell* [Internet]. 2004 May 21 [cited 2021 Aug 31];14(4):501–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15149599/>
 120. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* [Internet]. 2001 Oct 5 [cited 2021 Aug 31];107(1):67–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11595186/>
 121. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition

- of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* (80-). 2007 Mar 30;315(5820):1850–3.
122. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation [Internet]. Vol. 75, *Biochemistry (Moscow)*. Biochemistry (Mosc); 2010 [cited 2021 Aug 31]. p. 1563–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21417995/>
 123. Fridlyanskaya I, Alekseenko L, Nikolsky N. Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. Vol. 72, *Experimental Gerontology*. Pergamon; 2015. p. 124–8.
 124. Bodnar AG. Human Cells Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal. 2012 [cited 2021 Aug 31]; Available from: <http://www.sciencemag.org/content/279/5349/349.full.html><http://www.sciencemag.org/content/279/5349/349.full.html#ref-list-1>[http://www.sciencemag.org/cgi/collection/cell_biol](http://www.sciencemag.org/content/279/5349/349.full.html%23related-urls)
 125. Toussaint O, Medrano EE, Von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes [Internet]. Vol. 35, *Experimental Gerontology*. Exp Gerontol; 2000 [cited 2021 Sep 2]. p. 927–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121681/>
 126. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence [Internet]. Vol. 37, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Int J Biochem Cell Biol; 2005 [cited 2021 Sep 1]. p. 961–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15743671/>
 127. Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 May 10 [cited 2021 Sep 2];91(10):4130–4. Available from: <https://www.pnas.org/content/91/10/4130>
 128. Choo KB, Tai L, Hymavathée KS, Wong CY, Nguyen PNN, Huang CJ, et al. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 2];11(11):1201–7. Available from: </pmc/articles/PMC4166865/>
 129. Kiyoshima T, Enoki N, Kobayashi I, Sakai T, Nagata K, Wada H, et al. Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts. *Int J Mol Med* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2021 Sep 2];30(5):1007–12. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2012.1102/abstract>
 130. Caldini R, Chevanne M, Mocali A, Tombaccini D, Paoletti F. Premature induction of aging in sublethally H₂O₂-treated young MRC5 fibroblasts correlates with increased glutathione peroxidase levels and resistance to DNA breakage. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 1998 Sep 15 [cited 2021 Sep 2];105(1–2):137–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9922124/>
 131. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d’Adda di Fagnana F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities [Internet]. Vol. 22, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2021 [cited 2021 Sep 1]. p. 75–95. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41580-020-00314-w>
 132. Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging. Vol. 9, *Frontiers in Genetics*. Frontiers; 2018. p. 247.
 133. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2006 810 [Internet]. 2006 Sep 10 [cited 2021 Sep 24];8(10):1053–63. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb1471>
 134. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence [Internet]. Vol. 128, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2018 [cited 2021 Sep 2]. p. 1238–46. Available from: </pmc/articles/PMC5873888/>
 135. Neurohr GE, Terry RL, Lengefeld J, Bonney M, Brittingham GP, Moretto F, et al. Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* [Internet]. 2019 Feb 21 [cited 2021 Sep 24];176(5):1083-1097.e18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30739799/>
 136. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1995 Sep 26 [cited 2021 Sep 2];92(20):9363–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/92/20/9363>
 137. Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*

- [Internet]. 2003 Jun 13 [cited 2021 Sep 1];113(6):703–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12809602/>
138. Sadaie M, Salama R, Carroll T, Tomimatsu K, Chandra T, Young ARJ, et al. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes Dev* [Internet]. 2013 Aug 15 [cited 2021 Sep 1];27(16):1800–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23964094/>
 139. Dou Z, Ivanov A, Adams PD, Berger SL. Mammalian autophagy degrades nuclear constituents in response to tumorigenic stress [Internet]. Vol. 12, *Autophagy*. Autophagy; 2016 [cited 2021 Sep 24]. p. 1416–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26654219/>
 140. Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan JA, Zhu J, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2021 Sep 24];527(7576):105–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26524528/>
 141. Bai X, Yang X, Jia X, Rong Y, Chen L, Zeng T, et al. CAV1-CAVIN1-LC3B-mediated autophagy regulates high glucose-stimulated LDL transcytosis. *Autophagy* [Internet]. 2020 Jun 2 [cited 2021 Apr 21];16(6):1111–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/330469686/>
 142. Ivanov A, Pawlikowski J, Manoharan I, van Tuyn J, Nelson DM, Rai TS, et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol*. 2013 Jul 8;202(1):129–43.
 143. Olsvik HL, Lamark T, Takagi K, Larsen KB, Evjen G, Øvervatn A, et al. FYCO1 contains a C-terminally extended, LC3A/B-preferring LC3-interacting region (LIR) motif required for efficient maturation of autophagosomes during basal autophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Dec 4 [cited 2021 Sep 25];290(49):29361–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26468287/>
 144. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression [Internet]. Vol. 5, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010 [cited 2021 Sep 1]. p. 99–118. Available from: www.annualreviews.org
 145. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Sep 1];15(8):978–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23732483/>
 146. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence [Internet]. Vol. 11, *Aging Cell*. Aging Cell; 2012 [cited 2021 Sep 1]. p. 345–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22321662/>
 147. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* [Internet]. 2008 Jun 13 [cited 2021 Sep 1];133(6):1019–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18555778/>
 148. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* [Internet]. 2008 Feb 8 [cited 2021 Sep 1];132(3):363–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267069/>
 149. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* [Internet]. 2011 Nov 24 [cited 2021 Sep 1];479(7374):547–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22080947/>
 150. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Oct 6 [cited 2021 Sep 1];281(40):29568–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880208/>
 151. Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro M V., Augert A, Raguz S, et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1006–18.
 152. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-κB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* [Internet]. 2011 Oct 15 [cited 2021 Sep 1];25(20):2125–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21979375/>
 153. Chen H, Ruiz PD, McKimpson WM, Novikov L, Kitsis RN, Gamble MJ. MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Mol Cell* [Internet]. 2015 Sep 3 [cited 2021 Sep 2];59(5):719–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26300260/>
 154. Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev*. 2001 Oct 1;122(15):1695–706.

155. Wang E. Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bell Is Involved. *Cancer Res.* 1995;55(11):2284–92.
156. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Apr 6 [cited 2021 Sep 24];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27048913/>
157. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 Sep 24];15(3):428–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/acel.12445>
158. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge R-M, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 2015 221 [Internet]. 2015 Dec 14 [cited 2021 Sep 24];22(1):78–83. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4010>
159. Kulaberoglu Y, Gundogdu R, Hergovich A. The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair. *Genome Stab From Virus to Hum Appl.* 2016 Jan 1;243–56.
160. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* [Internet]. 2013 [cited 2021 Sep 23];27(4):254. Available from: </pmc/articles/PMC3721034/>
161. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* [Internet]. 1997 May 15 [cited 2021 Sep 23];387(6630):299–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9153396/>
162. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* [Internet]. 1997 May 15 [cited 2021 Sep 23];387(6630):296–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9153395/>
163. D'Adda Di Fagagna F. Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response [Internet]. Vol. 8, *Nature Reviews Cancer*. *Nat Rev Cancer*; 2008 [cited 2021 Sep 24]. p. 512–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18574463/>
164. Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003 53 [Internet]. 2003 Feb 24 [cited 2021 Sep 24];5(3):255–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb945>
165. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Nov 23 [cited 2021 Sep 24];96(24):13777–82. Available from: <https://www.pnas.org/content/96/24/13777>
166. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* [Internet]. 1993 Nov 19 [cited 2021 Sep 24];75(4):817–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8242752/>
167. Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993;75(4):805–16.
168. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nat* 1993 3666456 [Internet]. 1993 [cited 2021 Sep 24];366(6456):704–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/366704a0>
169. Fischer M, Müller GA. Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. <https://doi.org/10.1080/1040923820171360836> [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2021 Sep 24];52(6):638–62. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10409238.2017.1360836>
170. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene* 2011 3016 [Internet]. 2010 Dec 13 [cited 2021 Sep 24];30(16):1956–62. Available from: <https://www.nature.com/articles/onc2010568>
171. Park JS, Kim HY, Kim HW, Chae GN, Oh HT, Park JY, et al. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2005 [cited 2021 Sep 27];126(5):551–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15811424/>
172. Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJJ, Chen J-R. Soy protein isolate down-regulates caveolin-1 expression to suppress osteoblastic cell senescence pathways. *FASEB J* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2021 Sep 27];28(7):3134–45. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.13-243659>
173. Sun C, Wang N, Huang J, Xin J, Peng F, Ren Y, et al. Inhibition of phosphatidylcholine-

- specific phospholipase C prevents bone marrow stromal cell senescence in vitro. *J Cell Biochem* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2021 Sep 27];108(2):519–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.22282>
174. Lim JS, Nguyen KCT, Nguyen CT, Jang I-S, Han JM, Fabian C, et al. Flagellin-dependent TLR5/caveolin-1 as a promising immune activator in immunosenescence. *Aging Cell* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Sep 27];14(5):907–15. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ace1.12383>
 175. Sun S, Cai B, Li Y, Su W, Zhao X, Gong B, et al. HMGB1 and Caveolin-1 related to RPE cell senescence in age-related macular degeneration. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2019 Jul 7 [cited 2021 Sep 27];11(13):4323–37. Available from: <https://www.aging-us.com/article/102039>
 176. Park WY, Park JS, Cho KA, Kim DI, Ko YG, Seo JS, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jul 7 [cited 2021 Aug 30];275(27):20847–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10781609/>
 177. Cho KA, Ryu SJ, Park JS, Jang IS, Ahn JS, Kim KT, et al. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Jul 25 [cited 2021 Sep 27];278(30):27789–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12730243/>
 178. Cho KA, Sung JR, Yoon SO, Ji HP, Jung WL, Kim HP, et al. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2021 Sep 27];279(40):42270–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15263006/>
 179. Kang M-J, Chung YH, Hwang C-I, Murata M, Fujimoto T, Mook-Jung I-H, et al. Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing. *Exp Mol Med* 2006 382 [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2021 Aug 30];38(2):126–33. Available from: <https://www.nature.com/articles/emm200616>
 180. Ha T-Y, Choi YR, Noh HR, Cha S-H, Kim J-B, Park SM. Age-related increase in caveolin-1 expression facilitates cell-to-cell transmission of α -synuclein in neurons. *Mol Brain* 2021 141 [Internet]. 2021 Jul 28 [cited 2021 Aug 30];14(1):1–16. Available from: <https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-021-00834-2>
 181. Roitenberg N, Bejerano-Sagie M, Boocholez H, Moll L, Marques FC, Golodetzki L, et al. Modulation of caveolae by insulin/IGF-1 signaling regulates aging of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep* [Internet]. 2018 Aug [cited 2021 Aug 30];19(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29945933/>
 182. Herbert Z, Bötticher G, Aschoff A, Sendemir E, Zermann DH, Arnold R, et al. Changing caveolin-1 and oxytocin receptor distribution in the ageing human prostate. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Aug 30];36(5):361–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17845226/>
 183. Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of Caveolin-1 Induces Premature Cellular Senescence in Primary Cultures of Murine Fibroblasts: Stress-Induced Premature Senescence Upregulates the Expression of Endogenous Caveolin-1. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 [cited 2021 Aug 30];13(7):2502. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/117330/>
 184. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, et al. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: Possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Mar;54(3):818–31.
 185. Wang J, Bai Y, Zhao X, Ru J, Kang N, Tian T, et al. oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae. *Biosci Rep* [Internet]. 2018 Jun 12 [cited 2021 Aug 30];38(3):20180283. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30597791/>
 186. Ding L, Zeng Q, Wu J, Li D, Wang H, Lu W, et al. Caveolin-1 regulates oxidative stress-induced senescence in nucleus pulposus cells primarily via the p53/p21 signaling pathway in vitro. *Mol Med Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Aug 30];16(6):9521–7. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.7789/abstract>
 187. Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, Kasper M, Thannickal VJ, Le Saux CJ. Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2021 Aug 30];47(1):28–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22362388/>
 188. Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Aug 31];69(7):2878–86. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19318577/>
189. Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJJ, Chen JR. Soy protein isolate down-regulates caveolin-1 expression to suppress osteoblastic cell senescence pathways. *FASEB J* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2021 Aug 31];28(7):3134–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24719353/>
 190. Bitar MS, Abdel-Halim SM, Al-Mulla F. Caveolin-1/PTRF upregulation constitutes a mechanism for mediating p53-induced cellular senescence: Implications for evidence-based therapy of delayed wound healing in diabetes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2021 Aug 31];305(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23941874/>
 191. Volonte D, Kahkonen B, Shapiro S, Di Y, Galbiati F. Caveolin-1 Expression Is Required for the Development of Pulmonary Emphysema through Activation of the ATM-p53-p21 Pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Feb 27 [cited 2021 Aug 31];284(9):5462. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18111111/>
 192. Volonte D, Zou H, Bartholomew JN, Liu Z, Morel PA, Galbiati F. Oxidative Stress-induced Inhibition of Sirt1 by Caveolin-1 Promotes p53-dependent Premature Senescence and Stimulates the Secretion of Interleukin 6 (IL-6) *. 2015;
 193. Zou H, Stoppani E, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mech Ageing Dev*. 2011 Nov 1;132(11–12):533–42.
 194. Yu DM, Jung SH, An HT, Lee S, Hong J, Park JS, et al. Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 Sep 9];16(4):773–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28514055/>
 195. Jeffries EP, Filippo M Di, Galbiati F. Failure to reabsorb the primary cilium induces cellular senescence. *FASEB J* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Sep 28];33(4):4866–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.201801382R>
 196. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [Internet]. Vol. 43, *Annual Review of Genetics*. Annu Rev Genet; 2009 [cited 2021 Sep 7]. p. 67–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19653858/>
 197. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy [Internet]. Vol. 335, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Curr Top Microbiol Immunol; 2009 [cited 2021 Sep 8]. p. 1–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19802558/>
 198. Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. Vol. 176, *Cell*. Cell Press; 2019. p. 11–42.
 199. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. [Internet]. Vol. 28, *Annual review of physiology*. Annu Rev Physiol; 1966 [cited 2021 Sep 8]. p. 435–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5322983/>
 200. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [Internet]. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018 [cited 2021 Sep 5]. p. 349–64. Available from: www.nature.com/nrm
 201. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2011 Jul 7 [cited 2021 Sep 8];80:125–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21548784/>
 202. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2008 Aug 25;182(4):685–701.
 203. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. <http://dx.doi.org/10.4161/auto5810274> [Internet]. 2009 Nov 16 [cited 2021 Sep 5];5(8):1180–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.5.8.10274>
 204. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* [Internet]. 2013 Mar 21 [cited 2021 Sep 5];495(7441):389–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23455425/>
 205. Nascimbeni AC, Giordano F, Dupont N, Grasso D, Vaccaro MI, Codogno P, et al. ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI 3P synthesis. *EMBO J* [Internet]. 2017 Jul 14 [cited 2021 Sep 5];36(14):2018–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28550152/>
 206. Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2021 Sep 7];119(18):3888–900. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940348/>
207. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Sep 5];15(7):741–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23685627/>
 208. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5-16L1. *Mol Cell*. 2014 Jul 17;55(2):238–52.
 209. Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem*. 2001 Jan 19;276(3):1701–6.
 210. Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, Minematsu-Ikeguchi N, Yokota M, Ohsumi M, et al. The Mouse APG10 Homologue, an E2-like Enzyme for Apg12p Conjugation, Facilitates MAP-LC3 Modification. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):39517–26.
 211. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Sep 7];116(9):1679–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12665549/>
 212. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* [Internet]. 2010 Jun 2 [cited 2021 Sep 7];29(11):1792–802. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20418806/>
 213. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2021 Sep 7];19(21):5720–8. Available from: </pmc/articles/PMC305793/>
 214. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2021 Sep 7];117(13):2805–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15169837/>
 215. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* [Internet]. 2000 Nov 23 [cited 2021 Sep 7];408(6811):488–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/35044114>
 216. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm [Internet]. Vol. 61, *Essays in Biochemistry*. Essays Biochem; 2017 [cited 2021 Sep 7]. p. 609–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29233872/>
 217. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Aug 17 [cited 2021 Sep 7];282(33):24131–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17580304/>
 218. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun JA, et al. A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol Cell* [Internet]. 2009 Feb 27 [cited 2021 Sep 7];33(4):505–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250911/>
 219. Pankiv S, Alemu EA, Brech A, Bruun J-A, Lamark T, Øvervatn A, et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol* [Internet]. 2010 Jan 25 [cited 2021 Sep 17];188(2):253. Available from: </pmc/articles/PMC2812517/>
 220. Fu M meng, Nirschl JJ, Holzbaur ELF. LC3 Binding to the scaffolding protein jip1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes. *Dev Cell* [Internet]. 2014 Jun 9 [cited 2021 Sep 25];29(5):577–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24914561/>
 221. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* [Internet]. 2012 Dec 7 [cited 2021 Sep 25];151(6):1256–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23217709/>
 222. Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* [Internet]. 2015 Apr 23 [cited 2021 Sep 7];520(7548):563–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25686604/>
 223. Wilkinson DS, Jariwala JS, Anderson E, Mitra K, Meisenhelder J, Chang JT, et al. Phosphorylation of LC3 by the hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Mol Cell* [Internet]. 2015 Jan 8 [cited 2021 Sep 25];57(1):55–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25544559/>

224. Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, Colombo MI. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci*. 2004 Jun 1;117(13):2687–97.
225. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Katharina Simon A, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging* [Internet]. [cited 2021 Sep 4]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>
226. Jung M, Choi H, Mun JY. The autophagy research in electron microscopy. *Appl Microsc* 2019 491 [Internet]. 2019 Nov 6 [cited 2021 Sep 7];49(1):1–7. Available from: <https://appmicro.springeropen.com/articles/10.1186/s42649-019-0012-6>
227. Song C, Mitter SK, Qi X, Beli E, Rao H V., Ding J, et al. Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy. *PLoS One* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Sep 11];12(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28222108/>
228. McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2021 Sep 11];298(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19955483/>
229. Wu H, Wang MC, Bohmann D. JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mech Dev* [Internet]. 2009 Aug [cited 2021 Sep 11];126(8–9):624–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19540338/>
230. Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, Hall MN, Grzesiek S. The Solution Structure of the FATC Domain of the Protein Kinase Target of Rapamycin Suggests a Role for Redox-dependent Structural and Cellular Stability *. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 May 27 [cited 2021 Sep 11];280(21):20558–64. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820640571/fulltext>
231. Tripathi DN, Chowdhury R, Trudel LJ, Tee AR, Slack RS, Walker CL, et al. Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Aug 6 [cited 2021 Sep 11];110(32):E2950–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/110/32/E2950>
232. Zmijewski JW, Banerjee S, Bae H, Friggeri A, Lazarowski ER, Abraham E. Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Oct 22 [cited 2021 Sep 11];285(43):33154–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729205/>
233. Zhang X, Cheng X, Yu L, Yang J, Calvo R, Patnaik S, et al. MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Jun 30 [cited 2021 Sep 11];7(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms12109>
234. Wright C, Iyer AK V., Kulkarni Y, Azad N. S-Nitrosylation of Bcl-2 Negatively Affects Autophagy in Lung Epithelial Cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Sep 11];117(2):521–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26241894/>
235. Park HS, Huh SH, Kim MS, Lee SH, Choi EJ. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Dec 19 [cited 2021 Sep 11];97(26):14382–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121042/>
236. Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, et al. Complex Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Autophagy. *Mol Cell* [Internet]. 2011 Jul 8 [cited 2021 Sep 11];43(1):19–32. Available from: <http://www.cell.com/article/S1097276511003789/fulltext>
237. Lopez-Rivera E, Jayaraman P, Parikh F, Davies MA, Ekmekcioglu S, Izadmehr S, et al. Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2. *Cancer Res* [Internet]. 2014 Feb 15 [cited 2021 Sep 11];74(4):1067–78. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/74/4/1067>
238. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity [Internet]. Vol. 53, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annual Reviews; 2013 [cited 2021 Sep 11]. p. 401–26. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
239. Lee Y, Kim J, Kim MS, Kwon Y, Shin S, Yi H, et al. Coordinate regulation of the senescent state by selective autophagy. *Dev Cell* [Internet]. 2021 May 17 [cited 2021 Sep 11];56(10):1512–1525.e7. Available from: <http://www.cell.com/article/S1534580721003178/fulltext>
240. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective

- autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010 Feb 21 [cited 2021 Sep 11];12(3):213–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb2021>
241. Roca-Agüjetas V, De Dios C, Lestón L, Mari M, Morales A, Colell A. Recent Insights into the Mitochondrial Role in Autophagy and Its Regulation by Oxidative Stress. Vol. 2019, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2019.
 242. Kwon Y, Kim JW, Jeoung JA, Kim M-S, Kang C. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Molecules and Cells* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 4];40(9):607–12. Available from: <http://www.molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2017.0151>
 243. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and Aging. *Cell*. 2011 Sep 2;146(5):682–95.
 244. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2021 Sep 25];6(8):e23367. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023367>
 245. Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. <https://doi.org/10.4161/auto.5269> [Internet]. 2007 Feb 16 [cited 2021 Sep 25];4(2):176–84. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.5269>
 246. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nat* 2009 4607253 [Internet]. 2009 Jul 8 [cited 2021 Sep 25];460(7253):392–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature08221>
 247. Rastaldo R, Vitale E, Giachino C. Dual Role of Autophagy in Regulation of Mesenchymal Stem Cell Senescence. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Apr 24;0:276.
 248. Ma Y, Qi M, An Y, Zhang L, Yang R, Doro DH, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging. *Aging Cell* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2021 Sep 25];17(1):e12709. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/acel.12709>
 249. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguer E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nat* 2016 5297584 [Internet]. 2016 Jan 6 [cited 2021 Sep 25];529(7584):37–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature16187>
 250. Zheng Y, Hu C-J, Zhuo R-H, Lei Y-S, Han N-N, He L. Inhibition of autophagy alleviates the senescent state of rat mesenchymal stem cells during long-term culture. *Mol Med Rep* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2021 Sep 25];10(6):3003–8. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2014.2624/abstract>
 251. Zheng Y, Lei Y, Hu C, Hu C. p53 regulates autophagic activity in senescent rat mesenchymal stromal cells. *Exp Gerontol*. 2016 Mar 1;75:64–71.
 252. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Sep 25];23(7):798–803. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/23/7/798.full>
 253. Narita M, Young ARJ, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, et al. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* (80-). 2011 May 20;332(6032):966–70.
 254. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* (80-) [Internet]. 2015 Sep 25 [cited 2021 Sep 5];349(6255). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26404840/>
 255. Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan JA, Zhu J, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2021 Sep 5];527(7576):105–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26524528/>
 256. Budanov A V., Karin M. p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):451–60.
 257. Maiuri MC, Malik SA, Morselli E, Kepp O, Criollo A, Mouchel P-L, et al. Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. <http://dx.doi.org/10.4161/cc8108498> [Internet]. 2009 May 15 [cited 2021 Sep 4];8(10):1571–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.8.10.8498>
 258. Feng Z, Hu W, De Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, et al. The regulation of AMPK β 1,

- TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* [Internet]. 2007 [cited 2021 Sep 5];67(7):3043–53. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/>
259. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 May 4 [cited 2021 Sep 5];10(6):676–87. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb1730>
 260. Tasdemir E, Maiuri MC, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M, et al. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2008 Aug 16 [cited 2021 Sep 5];4(6):810–4. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.6486>
 261. Morselli E, Shen S, Ruckenstein C, Bauer MA, Mariño G, Galluzzi L, et al. p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. <https://doi.org/10.4161/cc101616868> [Internet]. 2011 Aug 15 [cited 2021 Sep 5];10(16):2763–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.10.16.16868>
 262. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Mar 2 [cited 2021 Sep 5];107(9):4153–8. Available from: [/pmc/articles/PMC2840158/](https://www.pmc/articles/PMC2840158/)
 263. Tripathi DN, Chowdhury R, Trudel LJ, Tee AR, Slack RS, Walker CL, et al. Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Aug 6 [cited 2021 Sep 5];110(32):E2950–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/110/32/E2950>
 264. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 Signaling under Hypoxic Conditions Is Controlled by ATM-Dependent Phosphorylation of HIF-1 α . *Mol Cell* [Internet]. 2010 Nov 24 [cited 2021 Sep 5];40(4):509–20. Available from: <http://www.cell.com/article/S109727651000835X/fulltext>
 265. Rastaldo R, Vitale E, Giachino C. Dual Role of Autophagy in Regulation of Mesenchymal Stem Cell Senescence. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers; 2020. p. 276.
 266. Xue W, Wang J, Jiang W, Shi C, Wang X, Huang Y, et al. Caveolin-1 alleviates lipid accumulation in NAFLD associated with promoting autophagy by inhibiting the Akt/mTOR pathway. *Eur J Pharmacol*. 2020 Mar 15;871:172910.
 267. Zhang X, Ramírez CM, Aryal B, Madrigal-Matute J, Liu X, Diaz A, et al. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Cav-1 (Caveolin-1) Deficiency Increases Autophagy in the Endothelium and Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arter Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2020 [cited 2021 May 8];40:1510–22. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.120.314291>.
 268. Chen Z-H, Cao J-F, Zhou J-S, Liu H, Che L-Q, Mizumura K, et al. Interaction of caveolin-1 with ATG12-ATG5 system suppresses autophagy in lung epithelial cells. <https://doi.org/10.1152/ajplung002682013> [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2021 Aug 28];306(11):1016–25. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplung.00268.2013>
 269. Liu J, Weaver J, Jin X, Zhang Y, Xu J, Liu KJ, et al. Nitric Oxide Interacts with Caveolin-1 to Facilitate Autophagy-Lysosome-Mediated Claudin-5 Degradation in Oxygen-Glucose Deprivation-Treated Endothelial Cells. *Mol Neurobiol* 2015 539 [Internet]. 2015 Oct 29 [cited 2021 Sep 9];53(9):5935–47. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-015-9504-8>
 270. Hou K, Li S, Zhang M, Qin X. Caveolin-1 in autophagy: A potential therapeutic target in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2021 Feb 1;513:25–33.
 271. Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, et al. Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: Role of stromal caveolin-1 as a key regulator. *Cell Cycle* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2021 May 8];10(11):1784–93. Available from: [/pmc/articles/PMC3142462/](https://www.pmc/articles/PMC3142462/)
 272. Shi Y, Tan SH, Ng S, Zhou J, Yang N Di, Koo GB, et al. Critical role of CAV1/caveolin-1 in cell stress responses in human breast cancer cells via modulation of lysosomal function and autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 May 8];11(5):769–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25945613/>
 273. Guan J, Yuan Z, He J, Wu Z, Liu B, Lin X, et al. Overexpression of caveolin-1 reduces Taxol resistance in human osteosarcoma cells by attenuating PI3K-Akt-JNK dependent autophagy. *Exp Ther Med* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Sep 8];12(5):2815–22. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2016.3713/abstract>
 274. Bai X, Yang X, Jia X, Rong Y, Chen L, Zeng T, et al. CAV1-CAVIN1-LC3B-mediated

- autophagy regulates high glucose-stimulated LDL transcytosis. <https://doi.org/10.1080/1554862720191659613> [Internet]. 2019 Jun 2 [cited 2021 Sep 9];16(6):1111–29. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15548627.2019.1659613>
275. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, et al. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells* [Internet]. 2019 [cited 2021 Oct 5];12(2):218. Available from: </pmc/articles/PMC6657936/>
 276. Wang Q, Yang Q, Wang Z, Tong H, Ma L, Zhang Y, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Oct 6];12(1):85. Available from: </pmc/articles/PMC4962749/>
 277. McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WHI. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. In: *Biochemical Society Transactions* [Internet]. Portland Press; 1991 [cited 2021 Sep 11]. p. 29S-29S. Available from: </biochemsoctrans/article/19/1/29S/81930/Isolation-culture-and-characterisation-of>
 278. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DÖ, et al. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2021 Sep 11];25(2):319–31. Available from: <https://stemcells.journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/stemcells.2006-0286>
 279. Ansari AS, Yazid MD, Sainik NQAV, Razali RA, Saim A Bin, Idrus RBH. Osteogenic induction of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cell for bone regeneration: A systematic review. Vol. 2018, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2018.
 280. Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ. The TGF- β 1/p53/PAI-1 Signaling Axis in Vascular Senescence: Role of Caveolin-1. *Biomol* 2019, Vol 9, Page 341 [Internet]. 2019 Aug 3 [cited 2021 Oct 5];9(8):341. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/8/341/html>
 281. McCulloch K, Litherland GJ, Rai TS. Cellular senescence in osteoarthritis pathology. *Aging Cell* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Sep 30];16(2):210–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/acel.12562>
 282. Goutas A, Syrrou C, Papathanasiou I, Tsezou A, Trachana V. The autophagic response to oxidative stress in osteoarthritic chondrocytes is deregulated. *Free Radic Biol Med*. 2018 Oct 1;126:122–32.
 283. Hsieh S-R, Hsu C-S, Lu C-H, Chen W-C, Chiu C-H, Liou Y-M. Epigallocatechin-3-gallate-mediated cardioprotection by Akt/GSK-3 β /caveolin signalling in H9c2 rat cardiomyoblasts. *J Biomed Sci* 2013 201 [Internet]. 2013 Nov 19 [cited 2021 Oct 5];20(1):1–13. Available from: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1423-0127-20-86>
 284. Limerá C, Sabbadini S, Sweet JB, Mezzetti B. New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. Vol. 8, *Frontiers in Plant Science*. Frontiers; 2017. p. 1418.
 285. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference [Internet]. Vol. 8, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2007 [cited 2021 Sep 12]. p. 173–84. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrg2006>
 286. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* [Internet]. 2012 Sep [cited 2021 Sep 15];4(9):429–34. Available from: </pmc/articles/PMC3456489/>
 287. Bradford Assay (Bradford Reagent) | Bio-Rad [Internet]. [cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://www.bio-rad.com/featured/en/bradford-assay.html>
 288. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72(1–2):248–54.
 289. Reynolds JA, Tanford C. Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1970 Jul 1 [cited 2021 Sep 15];66(3):1002–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/66/3/1002>
 290. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Proteins* [Internet]. 1984 Nov 14 [cited 2021 Sep 15];41–55. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-062-8:41>
 291. Klionsky D, Abdelmohsen, Abe, MJ A, H A, A AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* [Internet]. 2016 Jan

- 21 [cited 2021 Sep 14];12(1):1–222. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26799652/>
292. The principle and method of Western blotting (WB) | MBL Life Science -JAPAN- [Internet]. [cited 2021 Sep 15]. Available from:
<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/westernblotting.html>
293. Harbo M, Delaisse JM, Kjaersgaard-Andersen P, Soerensen FB, Koelvraa S, Bendix L. The relationship between ultra-short telomeres, aging of articular cartilage and the development of human hip osteoarthritis. *Mech Ageing Dev.* 2013 Sep 1;134(9):367–72.
294. Burova E, Borodkina A, Shatrova A, Nikolsky N. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;
295. Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts: Stress-induced premature senescence upregulates the expression of endogenous caveolin-1. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 Apr 24 [cited 2021 Sep 30];13(7):2502–17. Available from:
<https://www.molbiolcell.org/doi/abs/10.1091/mbc.01-11-0529>
296. Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim H-P, et al. Morphological Adjustment of Senescent Cells by Modulating Caveolin-1 Status *. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2021 Sep 24];279(40):42270–8. Available from:
<http://www.jbc.org/article/S0021925820726979/fulltext>
297. Shiroto T, Romero N, Sugiyama T, Sartoretto JL, Kalwa H, Yan Z, et al. Caveolin-1 is a critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascular endothelium. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 3 [cited 2021 Sep 8];9(2). Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24498385/>
298. Yuan HX, Russell RC, Guan KL. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 Sep 8];9(12):1983–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24013218/>
299. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Sep 8];20(7):1981–91. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19211835/>

Εικόνες από το διαδίκτυο:

- [1] Azmistowski17- Own work, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=40694154>