



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της καβεολίνης-1 κατά την γήρανση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων

Study of caveolin-1 during aging of mesenchymal stem cells

Παύλου Μαρία
του Μιχαήλ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα)

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

ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Συνεπιβλέπων)

Πρόεδρος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας – Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ – ΜΑΡΙΑ (Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που έπαιξαν σημαντικό ρόλο στη διεκπεραίωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής εργασίας και διευθύντρια του εργαστηρίου Βιολογίας, κα. Τραχανά Βαρβάρα. Η καθοδήγηση της, καθώς και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν σημαντικοί αρωγοί στη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο και την κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την αμέριστη υποστήριξη τους σε αυτή μου την προσπάθεια. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου, Γούτα Ανδρέα για την ανεκτίμητη συμβολή και συνεργασία του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της πτυχιακής.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κοντινούς μου φίλους που μου συμπαραστάθηκαν ιδιαίτερα αυτό το διάστημα, και ήταν δίπλα μου σε κάθε στιγμή και αγωνία.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να το απευθύνω στους γονείς μου, για τη συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια, και την υποστήριξη που μου έχουν δείξει καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ABSTRACT.....	4/5
------------------------	-----

Εισαγωγή

1. Βλαστοκύτταρα.....	7
1.1 Είδη βλαστοκυττάρων.....	7
1.2 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα.....	9
1.3 Μεσεγχυματικά κύτταρα και γήρανση.....	9
2. Κυτταρική γήρανση.....	10
2.1 Είδη κυτταρικής γήρανσης.....	10
2.2 Επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες κυτταρική γήρανση.....	11
2.2.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	11
2.2.2 Οξειδωτικό στρες και Stress-Induced Premature Senescence	13
2.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια της γήρανσης.....	13
2.4 Χαρακτηριστικά κυττάρων σε κατάσταση senescence.....	16
2.4.1 Μορφολογικές μεταβολές.....	16
2.4.2 Βιοδείκτες.....	16
2.4.3 Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP).....	17
3. Caveolin-1.....	20
3.1 Δομή της caveolin-1 και caveolae.....	20
3.2 Βιοσύνθεση και μεταφορά της caveolin στη πλασματική μεμβράνη.....	22
3.3 Ρόλοι της caveolin-1.....	22
3.4 Caveolin-1 και παθήσεις σχετιζόμενες με τη γήρανση.....	25
4. Σηματοδότηση και caveolin-1 στη κυτταρική γήρανση.....	27
4.1 Μεταβολή των επιπέδων της caveolin-1 από το οξειδωτικό στρες.....	27
4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδικά της caveolin-1 στο SIPS.....	28
5. Σκοπός εργασίας.....	30

Πειραματικό μέρος

6. Υλικά και Μέθοδοι.....	31
6.1 Δείγματα Κυττάρων.....	31
6.2 Καλλιέργειες Wharton's Jelly Derived – Mesenchymal Stem Cells.....	31
6.3 Προσδιορισμός δραστηριότητας SA-β-gal.....	34
6.4 Επίδραση στα κύτταρα με H ₂ O ₂ σε 6-well plates και ανοσοφθορισμός.....	34
6.5 Επίδραση στα κύτταρα με H ₂ O ₂ σε 6-well plates και απομόνωση πρωτεϊνών.....	37
6.6 Μέθοδος Bradford.....	38
6.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).....	39
6.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot).....	41
7. Αποτελέσματα.....	44
7.1 Βιοδείκτες για την ένδειξη κυτταρικής γήρανσης.....	44
7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων πρωτεΐνης της Caveolin-1 έπειτα από επίδραση με H ₂ O ₂	45
7.3 Ανοσοφθορισμός.....	47
8. Συμπεράσματα-Συζήτηση	51
9. Βιβλιογραφία	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί έναν μηχανισμό όπου τα κύτταρα παύουν να διαιρούνται. Αυτή η αναστολή της κυτταρικής τους διαίρεσης προκαλεί μεταβολές στο φαινότυπο των κυττάρων και φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση διάφορων νόσων που συσχετίζονται με την ηλικία. Η κυτταρική γήρανση μπορεί να επέλθει από τη σταδιακή μείωση των τελομερών κατά την αντιγραφή, αλλά και από παράγοντες που προκαλούν στρες στο κύτταρο, όπως είναι το οξειδωτικό στρες και η ακτινοβολία. Έχειδειχθεί ότι η συσσώρευση ρήξεων στο DNA, που προκαλούν αυτοί οι παράγοντες, προκαλεί την απόκριση του κυττάρου γνωστή ως απόκριση στις βλάβες του DNA (DNA Damage Response-DDR), ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό μονοπάτι με ποικίλες διακλαδώσεις και αλληλοεπιδρώντα μόρια που στόχο έχει την επιδιόρθωση των βλαβών. Η μη επιτυχής επιδιόρθωση τους μπορεί να οδηγήσει στη μη αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς στην κυτταρική γήρανση. Υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης Caveolin-1, βασικό δομικό μόριο των μικροσπληλαιων (Caveolae) της πλασματικής μεμβράνης, στα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην κυτταρική γήρανση.

Τα Caveolae αποτελούν εγκολπώσεις στη πλασματική μεμβράνη και οι ρόλοι τους ποικίλουν. Συμμετέχουν στην ενδοκυττάρωση μορίων, ρυθμίζοντας έτσι τη μεταφορά των λιπιδίων καθώς και την ομοιόσταση της χοληστερόλης στο κύτταρο. Επιπρόσθετα η caveolin-1 αλληλοεπιδρά με διάφορα μόρια, μέσω μιας επικράτειας που ονομάζεται Caveolin Scaffolding Domain ρυθμίζοντας έτσι τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν.

Στη παρούσα εργασία διερευνήθηκε το πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης caveolin-1 σε διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης (passages) μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα στα οποία έχει γίνει επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οδηγώντας σε εξωγενές οξειδωτικό στρες. Σε διάφορα χρονικά σημεία ανάκαμψης των κυττάρων παρατηρήθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής. Επίσης μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό πώς συμπεριφέρεται η caveolin-1 έπειτα από την επίδραση με H_2O_2 , και κυρίως πού εντοπίζεται υποκυτταρικά, αμέσως μετά την πρόκληση βλαβών λόγω οξειδωτικής προσβολής καθώς και κατά την επιδιόρθωσή τους.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα επίπεδα της caveolin-1 αυξάνονται ραγδαία έπειτα από την επίδραση με οξειδωτικό στρες στα νεαρά μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (right after) και στη συνέχεια επιστρέφουν στα βασικά επίπεδα ενώ στα μεγαλύτερα αναπτυξιακά στάδια η αύξηση επήλθε σε επόμενο χρονικό σημείο (6 ώρες μετά την επίδραση). Επιπλέον παρατηρήθηκε παροδική μετακίνηση της caveolin-1 στον πυρήνα του κυττάρου που συμπίπτει με την εμφάνιση θραύσεων της διπλής έλικας (Double Strand Breaks-DSB) στο DNA. Αντιθέτως, στα γηρασμένα κύτταρα δεν παρατηρείται τέτοια μετακίνηση της Caveolin-1, καθώς φαίνεται να εντοπίζεται στον πυρήνα και υπό φυσιολογικές συνθήκες (no treatment). Επιπλέον ο αριθμός των βλαβών φαίνεται να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου στα νεαρά κύτταρα με ταυτόχρονη επιστροφή της caveolin-1 στον αρχικό της εντοπισμό, γεγονός που δεν φαίνεται να συμβαίνει στα γηρασμένα κύτταρα.

Η μετακίνηση συνεπώς της caveolin-1 εντός και εκτός του πυρήνα μπορεί να συσχετίζεται με την επιδιόρθωση των βλαβών, και πιθανώς να εμπλέκεται και στη σηματοδότηση της κυτταρικής γήρανσης. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν νέα δεδομένα για την εμπλοκή της caveolin-1 στην κυτταρική γήρανση και πιθανώς σε διάφορες παθήσεις που σχετίζονται με την ηλικία.

ABSTRACT

Cellular senescence is a phenomenon in which cells cease to divide. This arrest of cellular division causes various changes in their phenotype such as morphological alterations and seems to be linked to various age-related diseases. Cellular senescence can be triggered by the gradual shortening of telomeres during the replication of DNA as well as by other stimuli that provoke stress in the cell, such as oxidative stress and radiation. It has been shown that the accumulation of breaks in the DNA, which are attributed to the above-mentioned factors will lead to DNA Damage Response (DDR). DDR is a complicated cellular pathway in which many molecules intertwine, and this mechanism is responsible for the repair of breaks in the DNA. Failure to repair these breaks can result in irreversible inhibition of the cell cycle and therefore to cellular senescence. There is evidence regarding the possible involvement of the protein caveolin-1, which is an important component of Caveolae, in the cellular pathways that lead to cellular senescence.

Caveolae are invaginations in the membrane of the cell and they have a variety of roles. They are responsible for the process of endocytosis of different molecules, contributing to the translocation of lipids in and out of the cell as well as mediating in the homeostasis of cholesterol in the cell. Additionally, caveolin-1 interacts with a range of different molecules through its Caveolin Scaffolding Domain, thus it participates in the regulation of their signaling.

In the present undergraduate thesis, the goal was to investigate how the protein levels of Caveolin-1 change in different passages of mesenchymal stem cells which were treated with hydrogen peroxide (H_2O_2), leading to acute exogenous oxidative stress. It was observed by Western blotting how the protein levels of Caveolin-1 changed in different time points that represented the recovery of the cells. Furthermore, by immunofluorescence, it was investigated how Caveolin-1 behaves after the cells are treated with H_2O_2 , and mostly where are Caveolin-1 molecules located in the cell right after the production of breaks in the DNA as well as during their repair.

Our results showed an up-regulation in the protein levels of caveolin-1 right after the treatment with oxidative stress in the young mesenchymal stem cells which consequently came back in their basic levels, whereas in the senescent cells the increase in the protein levels of caveolin-1 appeared at a later time point (6 hours of recovery after the treatment). Moreover, a transient translocation of caveolin-1 into the nucleus was observed which concurred with the appearance of Double-Strand Breaks in the DNA. In contrast, in the senescent cells, a respective translocation of Caveolin-1 was not observed, as molecules of this protein appeared already in the nuclei in the no-treatment condition. Also, the number of breaks appears to be reduced over time in the younger cells with an intercurrent transfer of caveolin-1 in its original location, an event that does not take place in the senescent cells.

Consequently, the translocation of Caveolin-1 into and out of the nucleus might be associated with the repair of the breaks in DNA and this protein is likely involved in the signaling of cellular senescence. These results provide new data in the involvement of caveolin-1 in cellular senescence and possibly in various age-related diseases.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα (stem cells) είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται προς διάφορους κυτταρικούς τύπους (Fortier, 2005). Τα βλαστοκύτταρα σε πολλούς ιστούς εξυπηρετούν ως ένα εσωτερικό σύστημα αντικατάστασης των φθαρμένων ή τραυματισμένων κυττάρων. Έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διατήρησης του πληθυσμού τους μέσω δύο μηχανισμών, της συμμετρικής και ασύμμετρης διαίρεσης. Με την συμμετρική διαίρεση, ένα βλαστικό κύτταρο δίνει δύο θυγατρικά βλαστικά κύτταρα, ενώ με την ασύμμετρη διαίρεση προκύπτει ένα θυγατρικό βλαστοκύτταρο και ένα πρόδρομο κύτταρο (progenitor) του οποίου η μοίρα έχει προσδιοριστεί προς καθορισμένες κυτταρικές γενεαλογίες (J. Liu et al., 2020).

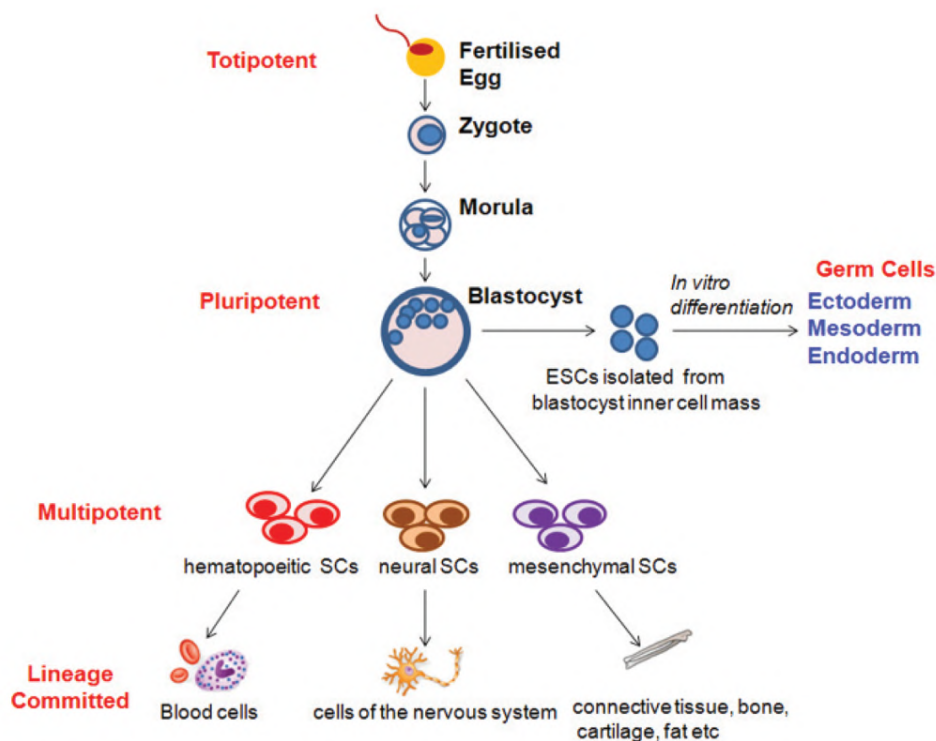
1.1 Είδη βλαστοκυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορες κατηγορίες αναλόγως με το δυναμικό διαφοροποίησης τους (potency) και το αναπτυξιακό στάδιο ανάκτησης τους. Δυναμικό διαφοροποίησης ορίζεται ως ο αριθμός των πιθανών μοιρών που μπορεί να ακολουθήσει ένα κύτταρο, δηλαδή τις δυνατές κατευθύνσεις διαφοροποίησης προς τους κυτταρικούς τύπους. Αυτή η ταξινόμηση που απεικονίζεται και στην *Εικόνα 1* ονομάζεται ιεραρχία των βλαστικών κυττάρων και είναι η εξής (Alison et al., 2002):

1. Τα παντοδύναμα (totipotent) βλαστοκύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλους τους κυτταρικούς τύπους. Το ζυγωτό είναι ένα τέτοιο κύτταρο που είναι ικανό να «δώσει» όλα τα όργανα και τους ιστούς του εμβρύου αλλά και τις έξω-εμβρυακές μεμβράνες αυτού (τροφοβλάστες του πλακούντα).
2. Τα ολοδύναμα (pluripotent) βλαστοκύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο που προέρχεται από τις τρεις βλαστικές στοιβάδες της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Inner Cell Mass, ICM) της βλαστοκύστης, δηλαδή το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα.
3. Τα πολυδύναμα (multipotent) βλαστοκύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς ορισμένες μόνο κυτταρικές γενεαλογίες αντίστοιχες της θέσης τους στον οργανισμό χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτο.

Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο ανάκτησης τους, τα βλαστοκύτταρα διαχωρίζονται σε Εμβρυικά Βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs) και σε Ενήλικα (Στελεχειαία) Βλαστοκύτταρα (Adult Stem Cells, ASCs). Τα ESCs ανακτώνται από το ICM της βλαστοκύστης ενός εμβρύου σε αναπτυξιακό στάδιο 5-7 ημερών πριν από την εμφύτευση του στη μήτρα κατά τη διαδικασία της in vitro γονιμοποίησης (Fortier, 2005). Τα ESCs είναι αθάνατα σε κυτταροκαλλιέργεια, δηλαδή μπορούν να αναδιπλασιάζονται για αρκετά εκατοντάδες passages διατηρώντας την αδιαφοροποίητη κατάσταση τους (Chagastelles & Nardi, 2011). Επιπλέον είναι ολοδύναμα και άρα ικανά να διαφοροποιηθούν προς οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο που εντοπίζεται στον ενήλικα οργανισμό (Chagastelles & Nardi, 2011). Η ενεργότητα του ενζύμου τελομεράση είναι πολύ υψηλή σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα (Rubin, 2002).

Τα Ενήλικα Βλαστοκύτταρα απομονώνονται από διάφορους ιστούς. Χαρακτηρίζονται από περιορισμένο χρόνο ζωής, σε αντίθεση με τα ESCs, και είναι πολυδύναμα καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν προς ορισμένους κυτταρικούς τύπους (Chagastelles & Nardi, 2011). Τα ASCs μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε Αιμοποιητικά Βλαστοκύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) (τα οποία είναι μεσοδερμικής προέλευσης και χρησιμοποιούνται κατά κόρων σε μεταμοσχεύσεις μυελού του οστού), σε Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), σε Νευρικά Βλαστοκύτταρα, σε Επιθηλιακά Βλαστοκύτταρα, σε Δερμικά Βλαστοκύτταρα κ.α.. Όσο πιο καθοδικά κατεβαίνουμε σε αυτή την ιεραρχία τόσο περισσότερο διαφοροποιείται το κύτταρο αποκτώντας μια ταυτότητα.



Εικόνα 1: Η ιεραρχική κατάταξη των βλαστοκυττάρων. Όσο κατεβαίνουμε σε αυτή την κατάταξη τόσο περιορίζεται το δυναμικό διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων, αποκτώντας έτσι μια κυτταρική ταυτότητα (Hayes et al., 2012).

Τα induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) αποτελούν μια κατηγορία βλαστοκυττάρων τα οποία ουσιαστικά μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο όπως τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα. Τα iPSCs προκύπτουν από τον αναπρογραμματισμό πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων με την in vitro εισαγωγή μεταγραφικών παραγόντων, όπως έπραξαν οι ερευνητές Takahashi και Yamanaka (2006). Η χρήση των iPSCs δεν φέρει ηθικά διλήμματα που χαρακτηρίζει τη χρήση των ESCs (η απομόνωση των οποίων προϋποθέτει την καταστροφή των βλαστοκύστεων) (G. Liu et al., 2020). Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως σε εφαρμογές της εξατομικευμένης ιατρικής, καθώς οι αυτόλογες μεταμοσχεύσεις δε θα προκαλέσουν ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού (G. Liu et al., 2020). Ακόμα, τα iPSCs αποτελούν χρήσιμα μοντέλα για τη μελέτη διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, αλλά και δοκιμών διάφορων εξατομικευμένων φαρμακευτικών θεραπειών (Bragança et al., 2019).

1.2 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα και μπορούν να απομονωθούν από διάφορα σημεία από ενήλικο οργανισμό ή έμβρυο. Συγκεκριμένα, μπορούν να απομονωθούν από το μυελό των οστών, την περιφερική κυκλοφορία αίματος του εμβρύου, το ήπαρ, το αίμα του ομφάλιου λώρου και το αμνιωτικό υγρό (Campagnoli et al., 2001).

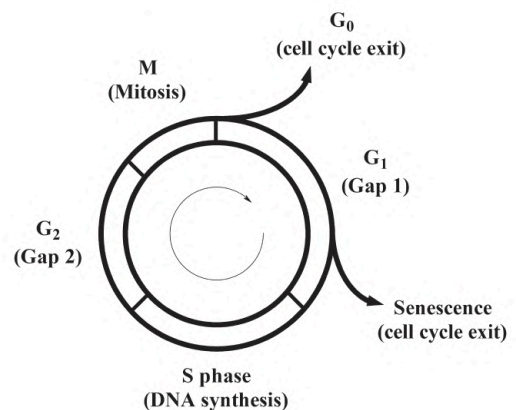
Μορφολογικά, στη μη διαφοροποιημένη τους μορφή, μοιάζουν με ινοβλάστες, καθώς έχουν ατρακτοειδή εμφάνιση (Campagnoli et al., 2001). In vitro μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες (Bruder et al., 1997), χονδροκύτταρα (Halleux et al., 2001), λιπώδη κύτταρα (Halleux et al., 2001), μυϊκά κύτταρα (Toma et al., 2002), νευρώνες (Woodbury et al., 2000) και αστροκύτταρα (Kopen et al., 1999). Λόγω αυτού του ευρέως φάσματος διαφοροποίησης τους προς πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές και της δυνατότητας αυτό-ανανέωσης τους, χρησιμοποιούνται εκτενώς στη θεραπευτική αναγεννητική ιατρική για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Επιπλέον, μπορούν να απομονωθούν με σχετική ευκολία συγκριτικά με άλλες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων και είναι διαθέσιμα σε μεγάλο βαθμό από διάφορες πηγές. Επιπρόσθετα ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι δρουν ανοσορρυθμιστικά, δηλαδή δε προκαλούν ανοσοαπόκριση όταν γίνει αλλογενής μεταμόσχευση (μεταμόσχευση κατά την οποία το γενετικό υλικό του δέκτη δεν είναι γενετικά ταυτόσημο με αυτό το δότη) και συνεπώς το ρίσκο απόρριψης από τον δέκτη είναι μειωμένο (Lee et al., 2016; Wang et al., 2013). Αυτό καθιστά τα MSCs κύτταρα «καθολικής αποδοχής» (Atoui & Chiu, 2012).

1.3 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και γήρανση

Τα MSCs που έχουν απομονωθεί από άνθρωπο, παύουν να διαιρούνται σχετικά νωρίς συγκριτικά με άλλα βλαστοκύτταρα, περίπου στα 30 – 40 population doublings (PD) (Banfi et al., 2002; Baxter et al., 2004). Population doublings (PD) είναι ο αριθμός των φορών όπου ένας πληθυσμός κυττάρων έχει in vitro διπλασιαστεί από την αρχική απομόνωση τους (Roth, 1974). Παύουν να διαιρούνται καθώς εισέρχονται σε γήρανση και αυτό οδηγεί σε μείωση του δυναμικού αναγέννησης τους (Banfi et al., 2002; Kretlow et al., 2008; Yu et al., 2011), όπως επίσης μειώνεται και το δυναμικό διαφοροποίησης τους, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν σταδιακή απώλεια της πολυδυναμικότητάς τους (multipotentiality) (D'Ippolito et al., 1999). Επιπλέον, εκτός από το μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, τα γηρασμένα MSCs χαρακτηρίζονται και από σταδιακή απώλεια της ικανότητας κυτταρικής μετανάστευσης και μειωμένης απόκρισης έναντι σε βιολογικά ή μηχανικά σήματα συγκριτικά με νεαρά MSCs (Kasper et al., 2009; M. Liu et al., 2017). Η κυτταρική θεραπεία που βασίζεται στα MSCs έχει ως σκοπό να αντικαταστήσει τα κύτταρα που έχουν φθαρεί από κάποια πάθηση, με νέα πλήρως λειτουργικά κύτταρα. Συνεπώς η κυτταρική γήρανση αποτελεί έναν ανασταλτικό παράγοντα για τη χρήση τους στην αναγέννηση των ιστών, και η παράταση της διάρκειας ζωής τους (lifespan) πιθανώς θα τα καταστήσει ιδανικότερο μέσο για τις κυτταρικές θεραπείες.

2. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση (cellular senescence) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hayflick και Moorhead το 1961 ως “μια μη αντιστρεπτή κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα τους να διαιρούνται μετά από έναν πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων”. Η αναστολή αυτή είναι μόνιμη για τα κύτταρα, και πραγματοποιείται στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες γίνεται η κυτταρική ανάπτυξη (Muller, 2009). Έχει παρατηρηθεί από τους Matsumura και συνεργάτες (1979), ότι παρόλο που το κύτταρο παύει να διαιρείται, παραμένει μεταβολικά ενεργό για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό κυρίως οφείλεται στο γεγονός ότι τα γηρασμένα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται πλέον σε εξωτερικά ερεθίσματα όπως είναι οι αυξητικοί και οι αποπτωτικοί παράγοντες.



Εικόνα 2: Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου (Muller, 2009).

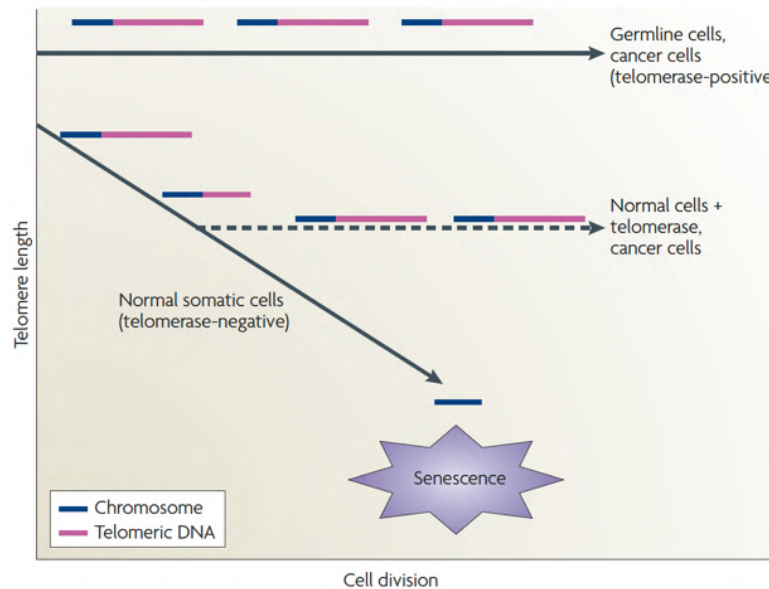
Η κυτταρική γήρανση θεωρείται ότι αναπτύχθηκε ως ένας ογκοκατασταλτικός μηχανισμός. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει τουλάχιστον δύο κύριους μηχανισμούς για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων: τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική γήρανση. Έτσι τα κύτταρα αποτρέπονται από το να πολλαπλασιαστούν ανεξέλεγκτα και συνεπώς αποτρέπεται η ογκογένεση που θα μπορούσε να προκληθεί από τον συνεχή πολλαπλασιασμό τους. Επίσης η κυτταρική γήρανση διαμεσολαβεί στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην ανάπτυξη ιστού αλλά ευθύνεται και για διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικιακή γήρανση (aging).

2.1 Είδη κυτταρικής γήρανσης

Η κυτταρική γήρανση με βάση τον τρόπο που επέρχεται, διαχωρίζεται βασικά σε δύο κατηγορίες: την αναδιπλασιαστική γήρανση (Replicative senescence) και την επαγόμενη από το στρες πρόωρη γήρανση (Stress-Induced Premature Senescence (SIPS)). Οι δύο αυτές διαδικασίες αν και συμβαίνουν ανεξάρτητα, έχουν μεταξύ τους μια αθροιστική δράση καθώς στρεσογόνοι παράγοντες οδηγούν πιο γρήγορα στην αναστολή των κυτταρικών διαιρέσεων. Συνεπώς, αν και η προέλευση του σήματος είναι διαφορετική, και οι δύο αυτοί κυτταρικοί μηχανισμοί οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα το οποίο είναι η κυτταρική γήρανση (Ben-Porath & Weinberg, 2005).

Όσον αφορά την replicative senescence, βασίζεται στη μείωση του μήκους των τελομερών, που συμβαίνει κάθε φορά κατά τη διαδικασία σύνθεσης του νέου DNA, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (Harley et al., 1990; Von Zglinicki, 2006). Τα τελομερή είναι συντηρημένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδικής φύσεως μήκους 15 – 20 kbp τα οποία βρίσκονται στο τέλος του γραμμικού χρωμοσώματος, στο 3' άκρο, και το προστατεύουν δημιουργώντας μια λούπα. Αρχικά συνίστανται από ένα επαναλαμβανόμενο δίκλωνο DNA μοτίβο έξι νουκλεοτιδίων «TTAGGG» το οποίο καταλήγει σε μια μονόκλωνη αλυσίδα πλούσια σε γουανίνες η οποία σχηματίζει μια θηλιά, προστατεύοντας έτσι τα άκρα των χρωμοσωμάτων. Ο σχηματισμός και η διατήρηση των τελομερών, επιτυγχάνεται από ένα ένζυμο που

ονομάζεται τελομεράση το οποίο είναι μια αντίστροφη μεταγραφάση. Αν και το ένζυμο αυτό εκφράζεται στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, δεν εκφράζεται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα με αποτέλεσμα μετά από ένα σημείο το κύτταρο να οδηγείται στη γήρανση. Σε κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA, το κύτταρο χάνει περίπου 50 bp – 200 bp από τα τελομερή και έρχεται πιο κοντά στο Hayflick Limit. Το Hayflick Limit αντιπροσωπεύει το μέγιστο αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που υπόκειται ένα κύτταρο μέχρι να σταματήσει, λόγω της μείωσης του μήκους των τελομερών μέχρι ενός κρίσιμου σημείου, πέραν του οποίου περαιτέρω διαιρέσεις θα οδηγούσαν σε απώλεια ζωτικού γενετικού υλικού. Αυτό το όριο σηματοδοτεί την κυτταρική γήρανση (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Τα κύτταρα της γαμετικής σειράς έχουν ενεργό το ένζυμο τελομεράση με αποτέλεσμα το μήκος των τελομερών να παραμένει σταθερό κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις. Το ίδιο ισχύει και για τα καρκινικά κύτταρα. Τα σωματικά κύτταρα δεν έχουν ενεργό αυτό το ένζυμο με αποτέλεσμα μετά από ένα αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων να οδηγούνται στη κυτταρική γήρανση (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

Ωστόσο, κυτταρική γήρανση μπορεί να επέλθει και μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων της μείωσης των τελομερών. Έναν από αυτούς τους μηχανισμούς αποτελεί η επαγόμενη από το στρες πρόωρη γήρανση (SIPS). Το SIPS δε βασίζεται σε έναν εσωτερικό κυτταρικό μηχανισμό, αλλά σε διάφορες καταστάσεις στρες που υπόκειται ένα κύτταρο και το οδηγούν στην κυτταρική γήρανση πιο γρήγορα συγκριτικά με το replicative senescence. Αυτές οι καταστάσεις στρες συνίστανται από ρήξεις στο DNA, βλάβες στη δομή της χρωματίνης αλλά και το οξειδωτικό στρες (Ben-Porath & Weinberg, 2005).

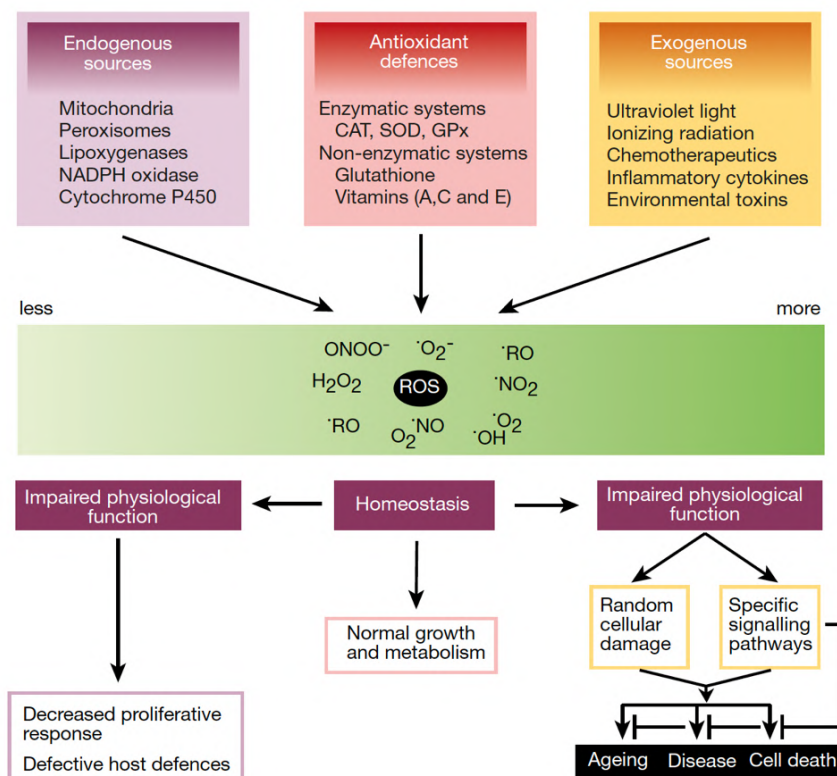
2.2 Επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες κυτταρική γήρανση

2.2.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή μόρια τα οποία έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα της τροχιάς τους, και προκειμένου να γίνουν πιο σταθερά, δεσμεύουν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, δημιουργώντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση (Riley, 1994). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν ενδογενώς στο κύτταρο από διάφορες αιτίες. Σε ποσοστό 90% αποτελούν παραπροϊόντα των αερόβιων μεταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική

φωσφορυλίωση (Poyton et al., 2009). Ωστόσο, και εξωτερικοί ανεξάρτητοι παράγοντες όπως διάφοροι τύποι ακτινοβολίας (ιονίζουσα και υπεριώδης), το κάπνισμα, αλλά και η κακή διατροφή μπορούν να αποτελέσουν αίτια παραγωγής μεγαλύτερου αριθμού δραστικών ριζών. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species (ROS)), οι οποίες περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες, και μη ελεύθερες ρίζες που αποτελούν οξειδωμένα μόρια όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Επιπλέον υπάρχουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species (RNS)).

Σε χαμηλές ποσότητες οι ROS και RNS θεωρούνται απαραίτητα μόρια για τη διεκπεραίωση φυσιολογικών διαδικασιών του κυττάρου όπως είναι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση τους (Sart et al., 2015). Ωστόσο σε μεγαλύτερες μη επιτρεπτές συγκεντρώσεις, το κύτταρο επιστρατεύει διάφορους μηχανισμούς αντιμετώπισης των πλεοναζόντων δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν διάφορα ένζυμα όπως είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) - η οποία μετατρέπει τη ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου - και τα ένζυμα καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης τα οποία μετατρέπουν το H_2O_2 σε H_2O (Finkel & Holbrook, 2000). Εκτός από ένζυμα, διάφορα άλλα μόρια όπως η γλουταθειόνη και οι βιταμίνες A, C και E συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των δραστικών ριζών (Finkel & Holbrook, 2000). Οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών και των μηχανισμών αντιοξειδωτικής άμυνας ενός συστήματος, δηλαδή όταν διαταραχθεί η ισορροπία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (Pisoschi & Pop, 2015).



Εικόνα 4: Στο κύτταρο εάν αυξηθούν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές, προκαλείται οξειδωτικό στρες. Το κύτταρο φέρει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για να αντιμετωπίσει τις πλεονάζουσες ελεύθερες ρίζες, αλλά όταν δεν εξουδετερώνονται πλήρως, τότε το κύτταρο οδηγείται σε γήρανση, απόπτωση, ή παθολογική κατάσταση (Finkel & Holbrook, 2000).

Το πόσο αποτελεσματικά δρουν αυτοί οι μηχανισμοί για να εξασφαλίσουν την ομοιόσταση στον οργανισμό, έχει αντίκτυπο στο μέγεθος του οξειδωτικού στρες. Αυξημένες συγκεντρώσεις των ROS και RNS στοχεύουν και αλλοιώνουν γενετικό υλικό, πρωτεΐνες και λιπίδια (Finkel & Holbrook, 2000). Συνεπώς αυτή η ανισορροπία έχει πολύ σημαντικές επιπτώσεις για το κύτταρο καθώς απορρυθμίζονται κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια και μπορεί να οδηγηθεί στον κυτταρικό θάνατο, στην κυτταρική γήρανση ή σε άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Η περίσσεια ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα σε πρόωρη κυτταρική γήρανση (Sart et al., 2015).

2.2.2 Οξειδωτικό στρες και Stress-Induced Premature Senescence

Η συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου και το επακόλουθο οξειδωτικό στρες μπορούν να επάγουν πρόωρη κυτταρική γήρανση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αυξημένες συγκεντρώσεις ROS επιταχύνουν τη διάβρωση των τελομερών και προκαλούν βλάβες στο DNA, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της απόκρισης στις βλάβες του DNA (DNA Damage Response (DDR)) και οδηγώντας στο SIPS. Με έρευνα των Blander και συνεργατών (2003) έχειδειχθεί ότι η σίγαση του αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD1 επάγει πρόωση γήρανση σε κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών, που οφείλεται στην αύξηση των επιπέδων των ROS. Επίσης, η επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε ανθρώπινους ινοβλάστες, οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση του DNA και μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, καθώς και μορφολογία που παρομοιάζε αυτή των γηρασμένων κυττάρων (Q. Chen & Ames, 1994). Ακόμα, εντοπίστηκαν από τους Chen και συνεργάτες (2004) μεταβολές σε δύο πρωτεΐνες-διαμεσολαβητές του κυτταρικού κύκλου, και συγκεκριμένα αυξημένα επίπεδα της p53 και αποφωσφορυλίωση της pRb. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε και μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία της αντιγραφής του DNA όπως είναι η Cdc6 και Mcm2. Αυτές οι μεταβολές οφείλονται στο οξειδωτικό στρες το οποίο επάχθηκε σε ινοβλάστες ανθρώπου μέσω του H_2O_2 . Επιπλέον, έρευνα από τους Robles και Adamí (1998) που χρησιμοποίησαν άλλους παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες στο κύτταρο, όπως είναι η μπλεομυκίνη και η ακτινομική D, οδήγησαν στο ίδιο αποτέλεσμα.

2.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια της γήρανσης

Προκειμένου τα κύτταρα να εισέλθουν στην κυτταρική γήρανση, είναι αναγκαίο να γίνει παύση του κυτταρικού κύκλου και άρα να κατασταλούν τα μόρια που είναι υπεύθυνα για τη μετάβαση του κυττάρου στις υπόλοιπες φάσεις αυτού. Συγκεκριμένα, δύο είναι τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και αυτά αφορούν τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb (Retinoblastoma Susceptibility Protein), μόρια-ρυθμιστές της κυτταρικής γήρανσης. Αν και αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια αλληλεπιδρούν, μπορούν να οδηγήσουν ανεξάρτητα στην παύση του κυτταρικού κύκλου.

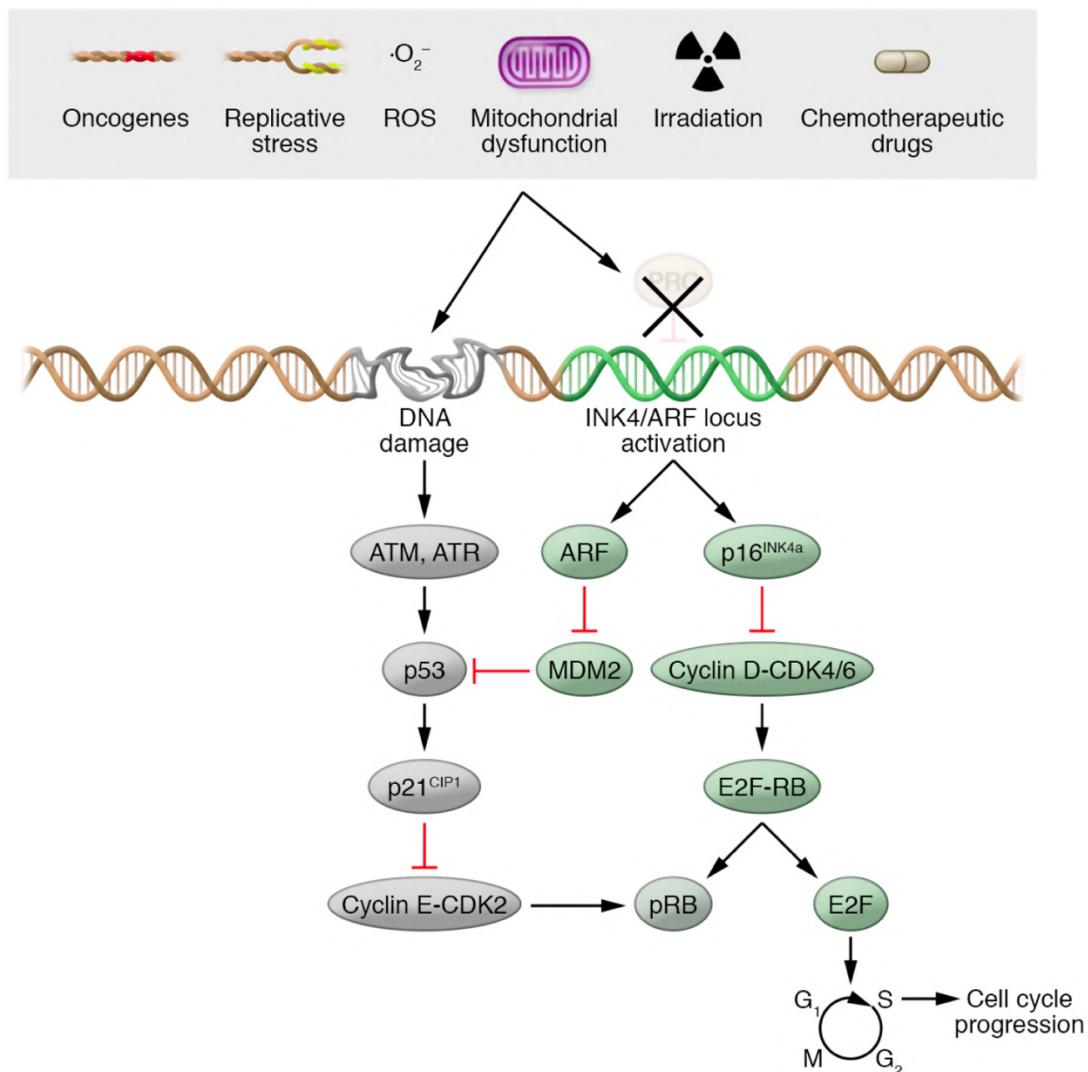
Οι ρήξεις στο DNA που προκαλεί το οξειδωτικό στρες εκκινούν την απόκριση στις βλάβες του DNA (DDR). Η κυτταρική γήρανση συσχετίζεται με την συνεχή ενεργοποίηση αυτού του μηχανισμού, καθώς συσσωρεύεται στο κύτταρο αυξημένος αριθμός ρήξεων οι οποίες δεν είναι δυνατό πλέον να επιδιορθωθούν (Fumagalli et al., 2012). Ο DDR χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX (γ H2AX) (Mah et al., 2010) καθώς και αυξημένη σηματοδότηση της πρωτεΐνης 53 binding protein 1 (53BP1) (Panier & Boulton, 2014), γεγονότα που υποδηλώνουν την ύπαρξη ρήξεων στο DNA. Αρχικά σε αυτόν το

μηχανισμό γίνεται στρατολόγηση των κινασών Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) για τις ρήξεις στη μια έλικα του DNA (single strand breaks) και Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) για τις ρήξεις στη διπλή έλικα του DNA (double strand breaks) στα σημεία που έχει προκληθεί ρήξη (Pacheco-Rivera et al., 2017). Ο DDR οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης ATM καθώς αυτή αυτοφωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα από διμερές να γίνεται μονομερές, και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει άλλα υποστρώματα-στόχους συμπεριλαμβανομένου και του μεταγραφικού παράγοντα p53 στη Ser15 (Bakkenist & Kastan, 2003). Επίσης η κινάση ATM φωσφορυλιώνει την κινάση Chk2 (Matsuoka et al., 2000) η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την p53 στη Ser20 (Chehab et al., 2000), κατάλοιπο το οποίο βρίσκεται στην περιοχή με την οποία η HDM2 αλληλοεπιδρά με την p53. Προκειμένου να σταθεροποιηθεί ακόμα περισσότερο η ενεργή p53, οι κινάσες ATM, ATR και ABL-1 φωσφορυλιώνουν την HDM2 σε διάφορα κατάλοιπα με αποτέλεσμα να την απενεργοποιούν (Mayo & Donner, 2002; Meek, 2004; Shinozaki et al., 2003). Η HDM2 (MDM2 στο ποντίκι) είναι μια E3 λιγάση, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες σημαίνει με μόρια ουβικουτίνης την p53 με αποτέλεσμα να οδηγείται στα πρωτεασώματα για πρωτεόλυση (Juven-Gershon & Oren, 1999). Επιπλέον, όταν το κύτταρο υποστεί στρες, αυξάνονται τα επίπεδα της p53 καθώς η πρωτεΐνη p14^{ARF} (Alternate Reading Frame) αναστέλλει την HDM2 (Sherr & McCormick, 2002). Συνεπώς σε κατάσταση στρες, αφού η HDM2 αναστέλλεται με όλους τους παραπάνω τρόπους, η p53 είναι ελεύθερη να μεταγράψει την πρωτεΐνη p21^{Cip1/Waf1} (cyclin-dependent kinase inhibitor 1). Η p21^{Cip1/Waf1} προσδένεται στα σύμπλοκα cyclin E/Cdk2 and cyclin D/Cdk4 και οδηγεί στη παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1.

Εκτός από τη παραπάνω σηματοδότηση υπάρχει και ένα ακόμα σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι που διαμεσολαβεί κυρίως στις αποκρίσεις του κυττάρου σε διάφορες μορφές στρες με αποτέλεσμα να οδηγείται στη πρόωρη κυτταρική γήρανση και αφορά το μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ERK (Kurata, 2000). Κλειδί σε αυτό το μονοπάτι αποτελούν οι Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) οι οποίες ερμηνεύουν τα εξωτερικά ερεθίσματα μέσω μεταβολών στη γονιδιακή έκφραση (Iwasa et al., 2003). Συγκεκριμένα, αύξηση των επιπέδων ROS οδηγούν στην συσσώρευση των MAPK MKK3 και MKK6 οδηγώντας στην επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p38^{MAPK} (Wang et al., 2002). Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί τη p16^{INK4a} που αποτελεί έναν cyclin depend kinase (CDK) inhibitor που κωδικοποιείται από τον ίδιο γονιδιακό τόπο που κωδικοποιείται και η πρωτεΐνη p14^{ARF} (Lowe & Sherr, 2003). Σε νεαρά κύτταρα ο γονιδιακός αυτός τόπος που ονομάζεται INK/ARF locus υπόκειται σε σίγαση μέσω μεθυλίωσης στην H3K27 (Bracken et al., 2007), ενώ κατά την κυτταρική γήρανση η απομεθυλάση JMJD3 αφαιρεί τις μεθυλικές ομάδες από τις ιστόνες οδηγώντας στη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων (Agger et al., 2009; Barradas et al., 2009). Συνεπώς υπό καταστάσεις στρες επάγεται η έκφραση της p16^{INK4a} (Lowe & Sherr, 2003; Zindy et al., 1997), και σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης τα επίπεδα της είναι αυξημένα (Alcorta et al., 1996; Palmero et al., 1997). Αυτή η πρωτεΐνη προσδένεται στα σύμπλοκα cyclin D/Cdk4 και cyclin D/Cdk6, αποτρέποντας με αυτό το τρόπο τη φωσφορυλίωση της pRb. Η pRb είναι μια σημαντική πρωτεΐνη που διαμεσολαβεί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς ρυθμίζει τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S (Weinberg, 1995). Υπό κανονικές συνθήκες βρίσκεται σε σύμπλοκο με το μεταγραφικό παράγοντα E2F1 εμποδίζοντας τον να μεταγράψει γονίδια απαραίτητα για τη συνέχεια του κυτταρικού κύκλου (Chellappan et al., 1991). Όταν οι CDK φωσφορυλιώνουν την pRb, αυτή αποδεσμεύεται από τον E2F1 επιτρέποντας τον έτσι να δράσει (Chellappan et al., 1991). Εφόσον η p16^{INK4a} αναστέλλει τις CDK, αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι διακόπτεται με αποτέλεσμα να γίνεται παύση του κυτταρικού κύκλου καθώς πλέον η pRb είναι στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή. Επίσης, και η p21 αποτρέπει την φωσφορυλίωση της pRb και έτσι τα δύο μονοπάτια διασταυρώνονται. Με αυτούς τους τρόπους δεν ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1 και συνεπώς δε μεταγράφονται τα γονίδια που ευθύνονται για τη μετάβαση του

κυτταρικού κύκλου στα επόμενα στάδια (Narita et al., 2003). Ακόμα, ο E2F1 επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p14^{ARF} (Bates et al., 1998) και η pRb προσδένεται στην HDM2 αποτρέποντας την από το να αναστείλει την p53 και έτσι παρατηρείται μια αλληλένδετη σχέση μεταξύ των δύο παραπάνω μονοπατιών (Yar et al., 1999). Αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια απεικονίζονται συνοπτικά στην *Εικόνα 5*.

Το μονοπάτι p16^{INK4a}-pRb ευθύνεται για τον σχηματισμό μιας δομής ετεροχρωματίνης που ονομάζεται Senescence – Associated Heterochromatin Foci (SAHFs) (Narita et al., 2003). Η pRb προκαλεί αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και επακόλουθη σίγαση γονιδίων που θα μετέγραφε κανονικά ο παράγοντας E2F και θα οδηγούσαν στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου (Narita et al., 2003). Επίσης, αυτές οι περιοχές του χρωμοσώματος, οι οποίες είναι ορατές κατά τη φάση της μεσόφασης, χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση της πρωτεΐνης HP1 και υψηλά επίπεδα τροποποιημένης ιστόνης 3 (K9M-H3), δεν είναι μεταγραφικά ενεργές και δεν έχουν τις τροποποιήσεις που φέρουν οι ιστόνες της ευχρωματίνης, με πιο γνωστές την ακετυλίωση της Lys9 της ιστόνης H3 και την μεθυλίωση της Lys4 της ιστόνης H3 (Narita et al., 2003). Οι συγγραφείς προτείνουν ότι αυτές οι περιοχές συμβάλλουν μερικώς στη διατήρηση της κατάστασης της κυτταρικής γήρανσης μέσω ελέγχου της διατήρησης της διακοπής του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 5: Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην κυτταρική γήρανση (Herranz & Gil, 2018)

2.4 Χαρακτηριστικά κυττάρων σε κατάσταση senescence

2.4.1 Μορφολογικές μεταβολές

Τα χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων που παρατηρούνται *in vitro* είναι αύξηση σε όγκο και σε πλάτος (Muller, 2009). Στα επιθηλιακά κύτταρα η αύξηση αυτή οφείλεται σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της mTOR (Bent et al., 2016), και συγκεκριμένα από την ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1 ως απόκριση σε ερεθίσματα που επάγουν κυτταρική γήρανση (Blagosklonny, 2012). Επιπλέον, οι μεταβολές της μορφολογίας των κυττάρων οφείλονται και στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, κυρίως των νηματίων βιμεντίνης των οποίων η έκφραση αυξάνεται στα γηρασμένα κύτταρα (Nishio et al., 2001), μέσω της σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα ATF6α (Activating Transcription Factor 6α) (Druelle et al., 2016). Στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, η πιο συστηματική μεταβολή στα γηρασμένα κύτταρα είναι η αυξημένη έκφραση της caveolin-1 η οποία αποτελεί βασικό συστατικό των caveolae. Η αυξημένη έκφραση της caveolin-1, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, επιφέρει την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p53 με διάφορους τρόπους, και επιφέρει μεταβολές και στη μορφολογία των κυττάρων μέσω ρύθμισης της Focal Adhesion Kinase και του σχηματισμού ινών ακτίνης. Επιπλέον αυξάνεται το λυσοσωμικό περιεχόμενο (S. Cho & Hwang, 2012; Kurz et al., 2000) καθώς και ο αριθμός των μιτοχondρίων, ένα γεγονός που αποδίδεται στην μειωμένα επίπεδα μιτοφαγίας που παρουσιάζουν τα γηρασμένα κύτταρα (Korolchuk et al., 2017).

Ακόμα, ο πυρήνας επιδέχεται μορφολογικές αλλαγές, εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης της δομικής πρωτεΐνης λαμίνη B1 (LB1) που αποτελεί βασικό στοιχείο του πυρηνικού ελάσματος (Shimi et al., 2011). Το πυρηνικό έλασμα επενδύει την εσωτερική πλευρά του πυρηνικού φακέλου. Συμβάλλει στο μέγεθος και στο σχήμα του πυρήνα καθώς και στην ακεραιότητα της δομής του. Αυτή η μειωμένη έκφραση της LB1 σύμφωνα με τους Shimi και συνεργάτες (2011), διαμεσολαβείται από την pRb, και το γονίδιο LMNB1 που κωδικοποιεί την LB1 που αποτελεί μεταγραφικό στόχο του E2F1 (Hallstrom et al., 2008). Η σίγαση της έκφρασης αυτού του γονιδίου μειώνει το ρυθμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, και οδηγεί στη πρόωρη γήρανση αυτών (Shimi et al., 2011). Η αποσταθεροποίηση του πυρηνικού ελάσματος λόγω της μείωσης των επιπέδων της LB1 επιφέρει και άλλες μεταβολές στο πυρήνα όπως διαπερατότητα του πυρηνικού φακέλου και δημιουργία χρωμοσωμικών θραυσμάτων που μεταφέρονται δια μέσω αυτού στο κυτταρόπλασμα (Cytoplasmic Chromatin Fragments, CCFs) και στη συνέχεια επεξεργάζονται από τα λυσοσώματα μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας (Ivanov et al., 2013). Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα CCFs φέρουν ιστονικές τροποποιήσεις που εμφανίζονται στις χρωμοσωμικές περιοχές όταν το DNA έχει δεχτεί πλήγμα και εκκινείται το DDR.

2.4.2 Βιοδείκτες

Όπως προτάθηκε από τους Korolchuk και συνεργάτες (2017), ως βιοδείκτης για την ανίχνευση των κυττάρων που είναι γηρασμένα χρησιμοποιείται η Εξαρτώμενη από τη γήρανση δράση της β-γαλακτοσιδάσης (Senescence-Associated β-galactosidase (SA-β-gal)). Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση των δεσμών του μορίου β-D-γαλακτοζίτη, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μονομερή β-D-γαλακτόζης. Αυτή η υδρολάση εντοπίζεται στα λυσοσώματα των κυττάρων (Muller, 2009). Όταν τα κύτταρα είναι γηρασμένα η δραστηριότητα της ανιχνεύεται σε pH 6.0 αφού γίνει χρώση τους *in situ* με κάποιο υπόστρωμα όπως είναι το X-gal, με αποτέλεσμα έπειτα από τη δράση της, τα γηρασμένα κύτταρα να φέρουν ένα μπλε χρώμα. Η αύξηση της δραστηριότητας της οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων στα γηρασμένα κύτταρα σε σύγκριση με τα νεαρά (Robbins et al., 1970). Συνεπώς η

λυσοσωματική β-γαλακτοσιδάση αποτελεί την πηγή προέλευσης της δραστηριότητας της SA-β-gal (B. Y. Lee et al., 2006). Στα γηρασμένα κύτταρα υπάρχει αύξηση της γονιδιακή έκφρασης του GBL1 που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο ένζυμο, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (B. Y. Lee et al., 2006). Ο συγκεκριμένος δείκτης, αν και βοηθητικός, δεν είναι απόλυτος για τον προσδιορισμό των κυττάρων που βρίσκονται σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης καθώς είναι μη ειδικός (Muller, 2009). Για αυτό, στηρίζομαστε και σε άλλους δείκτες που προσδιορίζουν βλάβες στο DNA, όπως είναι η γ-H2AX, τα επίπεδα των ROS, ή τα επίπεδα των πρωτεϊνών p16 και p21.

2.4.3 Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση γήρανσης επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον τους, τα γειτνιάζοντα δηλαδή κύτταρα, μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). Αυτός ο εκκριτικός φαινότυπος που ρυθμίζει την φυσιολογία των κυττάρων, προκαλείται από την αυτοκρινή και παρακρινή δράση των γηρασμένων κυττάρων που επάγεται από το DDR στο οποίο διαμεσολαβεί ο προφλεγμονώδης μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Salminen et al., 2012). Όντας ένας σύνθετος και πολύπλοκος μηχανισμός, χαρακτηρίζεται από ετερογένεια καθώς οι παράγοντες που εκκρίνονται είναι διαφορετικής φύσεως. Αυτοί επιτρέπουν τη διατήρηση της γήρανσης στα ήδη γηρασμένα κύτταρα άλλα και την επαγωγή της στα κύτταρα που βρίσκονται εγγύς σε αυτά. Με βάση τους Byun και συνεργάτες (2015), αυτοί οι παράγοντες μπορούν να διαφοροποιηθούν βασικά σε τρεις κατηγορίες με βάση το μηχανισμό με τον οποίο δρουν:

1. Παράγοντες που προσδένονται σε υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και επακολούθως ενεργοποιούν καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν ιντερλευκίνες (IL-6, IL-8 κ.α.), χημειοκίνες (GROα, GROβ κ.α.) και αναπτυξιακούς παράγοντες (TGFβ, GFG κ.α.) (Byun et al., 2015).
2. Πρωτεάσες, όπως μεταλλοπρωτεάσες (MMP-3, MMP-10 κ.α.) και πρωτεάσες σερίνης (uPA, tPA), οι οποίες καθιστούν τα γειτονικά στα γηρασμένα κύτταρα ευπαθή. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω αναδιαμόρφωσης στοιχείων της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και πέψης πρωτεϊνών που προσδένονται σε αυτή. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα γίνονται πιο επιδεκτικά σε μεταβολές, επιτρέποντας έτσι στα γηρασμένα κύτταρα να δράσουν παρακρινώς. Επιπλέον και άλλα μόρια μη πρωτεϊνικής φύσεως όπως είναι οι ROS και οι NOS, καθιστούν το μικροπεριβάλλον των γηρασμένων κυττάρων πιο ευάλωτο σε τροποποιήσεις.
3. Ρυθμιστικοί παράγοντες οι οποίοι δεν έχουν κάποια ενζυμική δράση, αλλά συμμετέχουν έμμεσα στο SASP. Προσδένονται στα παραπάνω μόρια και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν τη δράση τους. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει κυρίως αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs), έναν αναστολέα της πρωτεασών σερίνης (PAI-1/Serpine 1), αλλά και τις Insuline-like Growth Factor-Binding Proteins (IGFBPs) οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της σηματοδότησης του IGF, διαμεσολαβώντας στη μεταφορά του αλλά και στη διατήρηση του χρόνου ημιζωής αυτού του παράγοντα σε διάφορους ιστούς (Hwa et al., 1999).

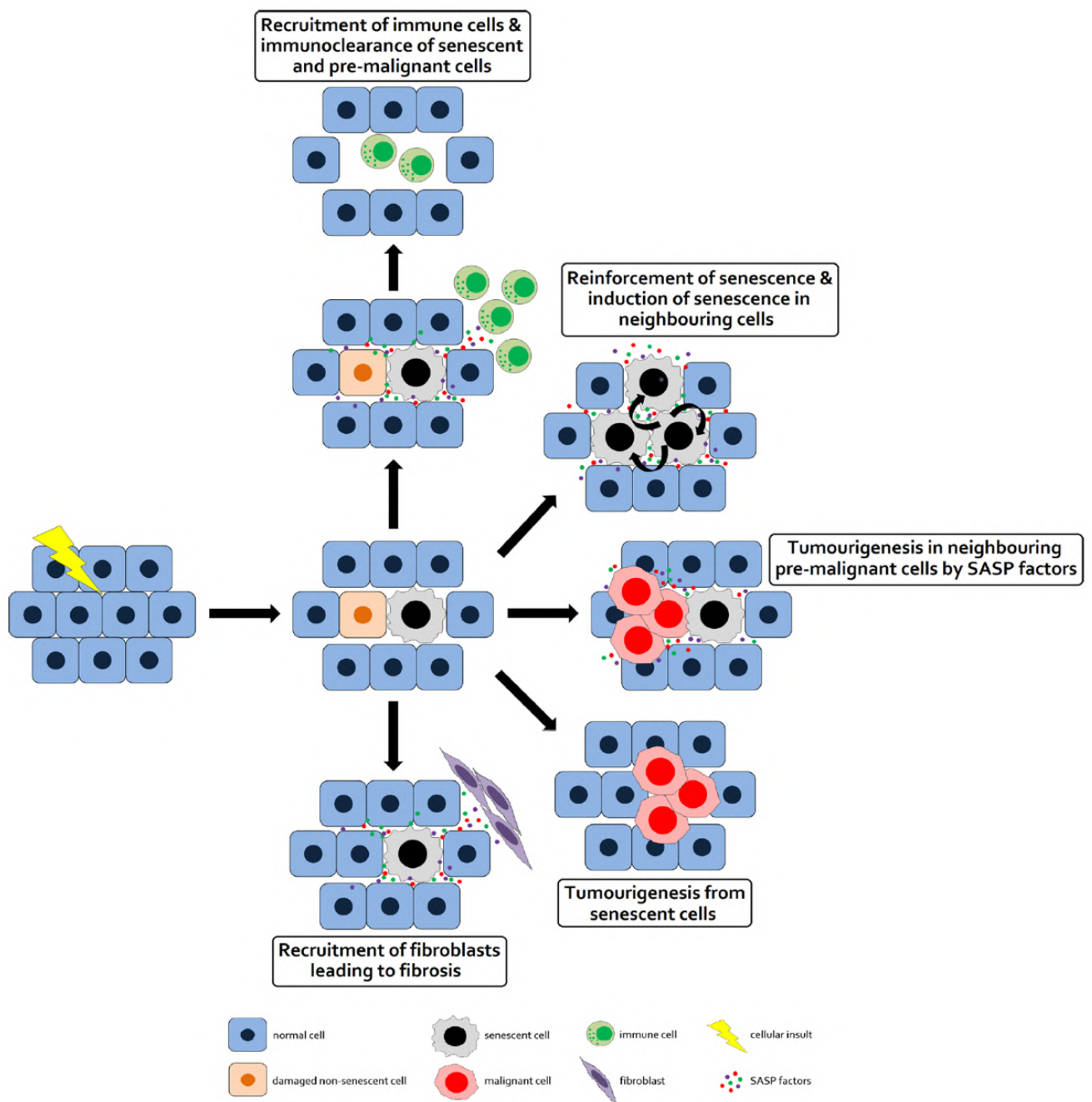
Λόγω της ετερογένειας των εκκρινόμενων παραγόντων, οι ρόλοι του SASP ποικίλλουν. Αρχικά χρησιμεύει ως ένας μηχανισμός σήμανσης στον οργανισμό καθώς οι χημειοκίνες και ιντερλευκίνες που εκκρίνονται από τα γηρασμένα κύτταρα οδηγούν στη στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος για να αντιμετωπιστεί η φλεγμονή που προκαλείται στον ιστό. Με την αναδιαμόρφωση της μεμβράνης που προκαλείται από τις πρωτεάσες και τους υπόλοιπους ρυθμιστικούς παράγοντες, επιτρέπεται η «εισβολή» των κυττάρων του ανοσοποιητικού στη φλεγμονή για την απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων, και οι αναπτυξιακοί παράγοντες συμβάλλουν στην αντικατάσταση εκείνης της περιοχής με νέα κύτταρα. Έτσι τα ίδια τα γηρασμένα κύτταρα στέλνουν το σήμα για την εξάλειψή τους. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού αυτού μειώνεται όταν ο βαθμός των ρήξεων είναι αυξημένος με αποτέλεσμα τα γηρασμένα κύτταρα να μην απομακρύνονται και να συσσωρεύονται οδηγώντας έτσι σε παθολογία του ιστού. Έτσι το SASP αναπαράγεται και «διαδίδεται» στα γειτονικά κύτταρα μεταβαίνοντας από την κυτταρική γήρανση στη γήρανση του οργανισμού, αλλά και σε ασθένειες που σχετίζονται με αυτή (de Keizer, 2017).

Επιπλέον, η διττή φύση του SASP αντικατοπτρίζεται και από τις δράσεις του ως ένας ογκο-κατασταλτικός αλλά και ογκο-προαγωγικός μηχανισμός. Το SASP προωθεί την ανάπτυξη όγκου μέσω ορισμένων εκκριτικών παραγόντων, ειδικά σε κύτταρα που έχουν προκαθορισμένη κακοήγη μοίρα (Krtolica et al., 2001; Parrinello, 2005). Οι παράγοντες αυτοί προωθούν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους, αλλά και τη μετάστασή τους, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία όγκου (Rao & Jackson, 2016). Ωστόσο, το SASP μέσω της στρατολόγησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συμβάλλει στην αντιμετώπιση των κυττάρων που φέρουν ρήξεις στο DNA και δύνανται να οδηγήσουν στη δημιουργία όγκου (Rao & Jackson, 2016). Για τον λόγο αυτό θεωρείται ότι η κυτταρική γήρανση αναπτύχθηκε ως ένας μηχανισμός αποτροπής ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων που φέρουν βλάβες.

Επιπρόσθετα, το SASP παίζει ρόλο και στην επιδιόρθωση ιστικής βλάβης καθώς συμμετέχει στην ανάπλαση του ιστού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναπρογραμματισμού των κυττάρων που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του SASP μέσω έκκρισης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι μετατρέπουν πλήρως διαφοροποιημένα ενήλικα βλαστοκύτταρα σε iPSCs. Συγκεκριμένα, οι Mosteiro και συνεργάτες (2016) έδειξαν ότι η εκτοπική έκφραση των OCT4, SOX2, KLF4 και cMYC *in vivo* επάγει τον αναπρογραμματισμό μερικών κυττάρων, αλλά επάγει και τη κυτταρική γήρανση σε μεγαλύτερο κλάσμα αυτών με έναν τρόπο που οι δύο αυτές διαδικασίες σχετίζονται. Ακόμα, έδειξαν ότι η ιντερλευκίνη IL-6 που εκκρίνεται από τα γηρασμένα κύτταρα είναι από τα μόρια που ευθύνονται για αυτή την αποδιαφοροποίηση και επιτρέπουν την ανάπλαση του ιστού. Εμφανής είναι και ο ρόλος του SASP στην επούλωση πληγών από έρευνα των Demaria και των συνεργατών του (2014). Έδειξαν ότι ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα ποντικού που είναι σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης και έχουν υποστεί πλήγμα, οδηγούν στη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε μυοβλάστες ώστε να αντικατασταθεί ο κατεστραμμένος ιστός. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω έκκρισης από τα γηρασμένα κύτταρα του παράγοντα Platelet-derived Growth Factor AA (PDGF-AA) ο οποίος είναι ένας παράγοντας του SASP που εκκρίνεται σχετικά νωρίς και οδηγεί στην επούλωση της πληγής.

Το SASP συμμετέχει και στην εμβρυική ανάπτυξη. Ο μηχανισμός αυτός, ταυτόχρονα με άλλους μηχανισμούς όπως η απόπτωση και η διαφοροποίηση, διαμεσολαβεί σε αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου διαμορφώνοντας τη μορφολογία του. Σύμφωνα με έρευνες (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013) γηρασμένα κύτταρα βρίσκονται σε διάφορες περιοχές του υπό ανάπτυξη εμβρύου όπως παρατηρήθηκε έπειτα από χρώση για δραστικότητα της SA-β-gal. Επιπλέον, οι Storer και συνεργάτες (2013) εστίασαν στην κορυφαία εξωδερμική ακρολοφία και στο οροφιαίο πέταλο του ρομβοειδή εγκεφάλου, τα οποία αποτελούν κέντρα με πολύ υψηλή σηματοδότηση κατά την εμβρυική ανάπτυξη, και παρατηρήθηκε ότι μερικά από τα

εκκρινόμενα μόρια που συμμετέχουν σε αυτήν, ανήκουν και στη σηματοδότηση του SASP. Επίσης προτείνουν ότι στη κορυφαία εξωδερμική ακρολοφία, τα γηρασμένα κύτταρα απομακρύνονται από μακροφάγα κύτταρα, οδηγούνται σε απόπτωση, ή αναδιανέμονται στο interdigital μεσέγχυμα, οδηγώντας έτσι στη διάπλαση του άκρου.



Εικόνα 6: Έπειτα από στρες ενεργοποιείται στο κύτταρο ο μηχανισμός *Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)* ο οποίος επηρεάζει το μικροπεριβάλλον αυτού εκκρίνοντας διάφορα μόρια. Έτσι ρυθμίζονται διάφορες διαδικασίες όπως η ογκογένεση, η επιδιόρθωση ιστικής βλάβης, η επαγωγή κυτταρικής γήρανσης στα γειτονικά κύτταρα κ.α. (Aravinthan, 2015).

3. Caveolin-1

3.1 Δομή της caveolin-1 και caveolae

Η caveolin-1 (Cav-1) είναι μια δομική πρωτεΐνη σκαλωσιάς και αποτελεί βασικό στοιχείο των caveolae (μικροσπλήλαια) που είναι εγκολπώσεις της πλασματικής μεμβράνης διαμέτρου 60 – 80 nm (Parton & Simons, 2007). Υπάρχουν δύο ισομορφές αυτής, η Cav-1α (178 αμινοξέα) και η Cav-1β (147 αμινοξέα), με μοριακά βάρη 21 και 24 kDa αντίστοιχα. Οι διαφορετικές ισομορφές προκύπτουν από εναλλακτικά σημεία έναρξης της μετάφρασης με αποτέλεσμα οι διαφορετικού μοριακού βάρους πρωτεΐνες να έχουν διαφορετικού μήκους αμινοτελικό άκρο (Scherer et al., 1995). Εκτός από την ενσωμάτωση της στη πλασματική μεμβράνη, υπάρχει και σε ελεύθερη μορφή στο κυττασόλιο καθώς και σε εκκριτική μορφή ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (P. Liu et al., 2002). Αν και η caveolin-1 εκφράζεται ευρέως σε διάφορους ιστούς, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λιπώδη κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα (Cohen et al., 2004). Επιπλέον, μέλη αυτής της οικογένειας αποτελούν η caveolin-2 (Cav-2), που εκφράζεται ευρέως σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Scherer et al., 1997), και η caveolin-3 (Cav-3) που εκφράζεται κυρίως στους μύες (Song et al., 1996).

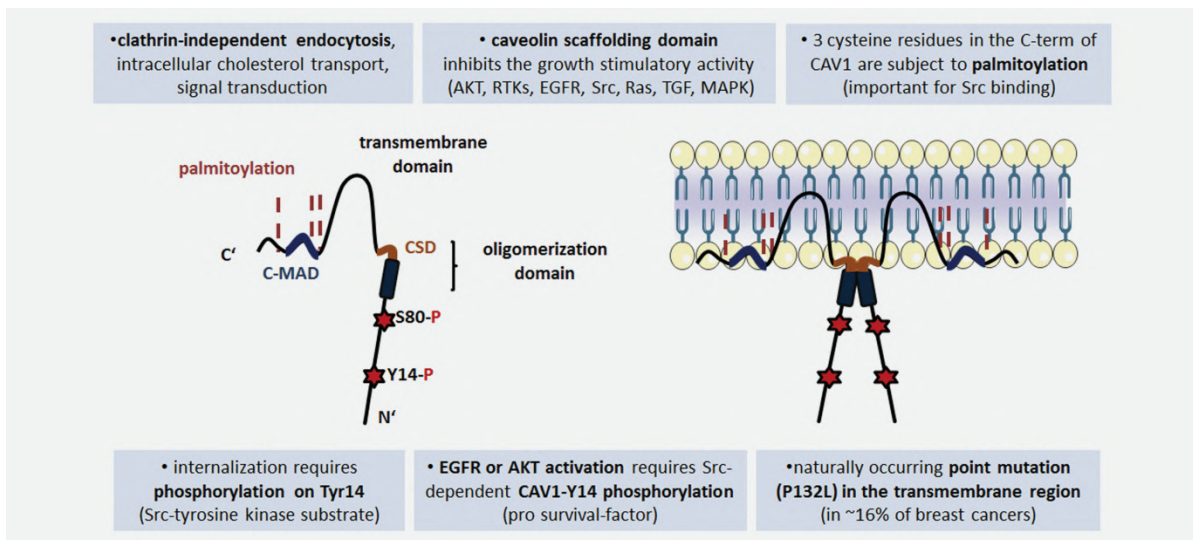


Εικόνα 7: Στη φωτογραφία, που λήφθηκε από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, απεικονίζονται οι δομές των caveolae στη πλασματική μεμβράνη ενός κυττάρου ινοβλάστη. Με κόκκινο προσδιορίζεται η εναπόθεση των πρωτεϊνών caveolin (Kovtun et al., 2015).

Η caveolin-1 εντοπίζεται κυρίως αγκυροβολημένη στη πλασματική μεμβράνη σε ολιγομερή στην εσωτερική μονοστοιβάδα λιπιδίων. Τα ολιγομερή αυτά αποτελούνται από 14-16 μονομερή (Sargiacomo et al., 1995) και μπορούν να αποτελούνται μόνο από Cav-1 ή να είναι ετεροολιγομερή που να συνίστανται και από Cav-2. Συνολικά σε ένα caveolae εντοπίζονται περίπου 144 μόρια caveolin (Pelkmans & Zerial, 2005). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8 το κάθε μονομερές χαρακτηρίζεται από διαμόρφωση φουρκέτας (hairpin). Πιο αναλυτικά, φέρει ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό άκρο που βρίσκονται προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος και παρεμβάλλονται από μια ενδιάμεση υδροφοβική αλληλουχία η οποία βρίσκεται εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, αλλά δε τη διαπερνά πλήρως. Το σημείο αλληλεπίδρασης των μονομερών για το σχηματισμό των ολιγομερών αποτελεί το διάστημα μεταξύ των αμινοξέων 61-101 (Sargiacomo et al., 1995). Μια επικράτεια της caveolin-1 που ονομάζεται Caveolin Scaffolding Domain (CSD) (82-101 αμινοξέα), επιτρέπει στη Cav-1 να αλληλοεπιδράσει με διάφορες πρωτεΐνες ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με την Cav-1 μέσω του

CSD φέρουν την αμινοξική αλληλουχία ΦxΦxxxxΦ, ΦxxxxΦxxΦ ή ΦxΦxxxxΦxxΦ όπου το «x» αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε αμινοξύ, ενώ το «Φ» αντιπροσωπεύει κάποιο αρωματικό αμινοξύ (Trp, Phe, Tyr) (Couet et al., 1997). Επίσης, για τη δημιουργία των caveolae συμμετέχουν και άλλα μόρια που αποτελούν στοιχεία των λιπιδικών σχεδίων όπως είναι η χοληστερόλη και τα σφιγγολιπίδια τα οποία αλληλοεπιδρούν με την Cav-1 μέσω της CSD επικράτειας τους (Parton et al., 2006).

Οι μεταφραστικές τροποποιήσεις που επιδέχεται η caveolin-1 επηρεάζουν και τις διαδικασίες στις οποίες συμμετέχει. Αρχικά, η Cav-1 είναι παλμυτοϋλιωμένη στο καρβοξυτελικό της άκρο σε τρία κατάλοιπα κυστεΐνης, και συγκεκριμένα στις Cys133, Cys143 και Cys156 (Dietzen et al., 1995). Σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτή η τροποποίηση δε καθορίζει την υποκυτταρική τοποθέτηση της Cav-1 στα caveolae της πλασματικής μεμβράνης (Dietzen et al., 1995). Ωστόσο, η παλμυτοϋλίωση στη Cys156 θεωρείται απαραίτητη για τη σύζευξη της με τη κινάση c-Src (H. Lee et al., 2001). Επιπλέον, η Cav-1 είναι φωσφορυλιωμένη σε δύο κατάλοιπα, στη Tyr14 και στη Ser80. Η κινάση Src φωσφορυλιώνει την caveolin-1 στο κατάλοιπο τυροσίνη 14 που βρίσκεται στο N-άκρο αυτής (S. Li et al., 1996). Ωστόσο, αυτό ισχύει μόνο για τη Cav-1α ισομορφή, καθώς λείπουν τα 31 πρώτα αμινοξέα από το N-άκρο της Cav-1β και συνεπώς δε φέρει στην αλληλουχία της αυτό το κατάλοιπο. Αυτή η τροποποίηση σύμφωνα με τους συγγραφείς πιθανώς εξυπηρετεί στη πρόσδεση πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν την SH2 επικράτεια της Cav-1α. Επιπρόσθετα, η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser40 ρυθμίζει την υποκυτταρική μεταφορά της caveolin-1 στη μήτρα του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), όπου εξωκυτταρώνεται μέσω του εκκριτικού μονοπατιού του κυττάρου (Schlegel et al., 2001).



Εικόνα 8: Η δομή της πρωτεΐνης caveolin-1, η οποία συνίσταται από ένα καρβοξυτελικό και ένα αμινοτελικό άκρο που είναι στραμμένα προς τη πλευρά του κυτταροπλάσματος και ένα ενδιάμεσο τμήμα που διαπερνά μερικώς τη μεμβράνη. Η πρωτεΐνη αυτή φέρει μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως παλμωτοϋλίωσεις και φωσφορυλιώσεις που συμμετέχουν στη ρύθμιση των λειτουργιών της. Επίσης φέρει την επικράτεια CSD μέσω της οποίας αλληλοεπιδρά με άλλα μόρια. Στο δεξιό σχήμα παρατηρείται ένα ομοδιμερές πρωτεϊνών caveolin-1 και η τοπολογία τους στη πλασματική μεμβράνη (Ketteler & Klein, 2018).

3.2 Βιοσύνθεση και μεταφορά της caveolin-1 στην πλασματική μεμβράνη

Η βιοσύνθεση των caveolin πραγματοποιείται στα ριβοσώματα που βρίσκονται προσκολλημένα στην κυτταροπλασματική πλευρά της επιφάνειας του Αδρού Ενδοπλασματικού Δικτύου με έναν τρόπο εξαρτώμενο από το Signal Recognition Particle (SRP) (Monier et al., 1995). Το Signal Recognition Particle είναι ένα σύμπλεγμα έξι πολυπεπτιδίων και ενός κυτταροπλασματικού RNA το οποίο αναγνωρίζει μια αλληλουχία σινιάλο που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της αναδυόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας και με αυτόν τον τρόπο προκαλεί προσωρινή παύση της μετάφρασης. Ανακατευθύνει την διαδικασία αυτή στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ). Αρχικά το SRP συνδέεται στον υποδοχέα του που βρίσκεται και αυτός στην επιφάνεια του ΕΔ και στη συνέχεια εκκινείται ένας μηχανισμός συν-μετάφρασης καθώς η πρωτεΐνη συνεχίζει να συντίθεται όσο εισέρχεται εσωτερικά του αυλού μέσω ενός τρανσολοκόνιου (Monier et al., 1995).

Αφού πραγματοποιηθεί η σύνθεση της caveolin-1 και λάβει τη διαμόρφωση φουρκέτας, ξεκινάει ένα πρώτο στάδιο ολιγομερισμού στο ΕΔ που συμμετέχουν 7 – 14 μόρια caveolin-1. Εάν έχουν εκφραστεί μόρια caveolin-2 τότε συμμετέχουν και αυτά στον ολιγομερισμό (Monier et al., 1995). Στη συνέχεια το ολιγομερές μεταναστεύει στο σύμπλεγμα Golgi, μέσω κυστιδίων καλυπτόμενα με Coat Protein Complex II (COPII), όπου ακολουθεί η δημιουργία μεγαλύτερων συμπλόκων caveolin με μοριακό βάρος > 400 kDa (Hayer et al., 2010). Η πρωτεΐνη αυτή υφίσταται ύστερα παλμυτοϋλίωση, μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που συμβαίνει απόμακρά από το σύμπλεγμα Golgi και δε θεωρείται απαραίτητη για τη περαιτέρω μετακίνηση της caveolin-1 στη πλασματική μεμβράνη και την εναπόθεση της στα caveolae (Parat & Fox, 2001).

Η χοληστερόλη και τα γλυκοσφιγγολίπδια φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση των ολιγομερών των μορίων caveolins από το σύμπλεγμα Golgi στη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Αυτή η μεταφορά πραγματοποιείται με κυστίδια που ονομάζονται exocytic caveolar carriers, τα οποία μεταφέρουν μόρια caveolin σε κβάντα και ουσιαστικά αποτελούν πρόδρομες δομές των στοιχείων των caveolae της πλασματικής μεμβράνης (Pol et al., 2005). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο σε αυτή τη μεταφορά έχουν και άλλες πρωτεΐνες όπως η SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment-protein receptors) πρωτεΐνη syntaxin-6 η οποία συμμετέχει στην αναγνώριση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και στη σύντηξη των exocytic caveolar carriers με αυτή (Choudhury et al., 2006). Επίσης καίριας σημασίας είναι και οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες cavin οι οποίες διαμορφώνουν ένα σύμπλοκο που αποτελείται από την cavin-1 (ή PTRF, Polymerase I and Transcript Release Factor), cavin-2 (ή SDR Serum Deprivation Response protein), cavin-3 (ή SRBC, Serum Deprivation Response factor-related gene product that Binds to C-kinase) και cavin-4 (ή MURC, Muscle-Restricted Coiled-coil protein) (Hansen & Nichols, 2010). Αυτές αλληλοεπιδρούν με τα ολιγομερή της caveolin-1 αφού εξέλθουν από το σύμπλεγμα Golgi και συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των caveolae στη μεμβράνη (Bastiani & Parton, 2010). Επίσης η αγκυροβόληση του caveolae στη πλασματική μεμβράνη βασίζεται και στην φιλαμίνη, μια F-ακτίνη που συμμετέχει στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού και αλληλοεπιδρά με την caveolin (Stahlhut & van Deurs, 2000).

3.3 Ρόλοι της caveolin-1

Οι ρόλοι της caveolin-1 ποικίλλουν και περιλαμβάνουν την ενδοκυττάρωση, τη μεταφορά των λιπιδίων και την ομοίωση της χοληστερόλης, τη διαμερισματοποίηση διαφόρων μορίων σε caveolae και την επακόλουθη μεταγωγή σήματος και ρύθμιση των σηματοδοτικών τους μονοπατιών. Επίσης προσφάτως έχει δείχθει και ο ρόλος της caveolin-1 στη διάταση της μεμβράνης του κυττάρου.

Μεταφορά λιπιδίων και Ομοιόσταση χοληστερόλης

Η Cav-1 παίζει ρόλο στη μεταφορά λιπιδίων και στην ομοιόσταση της χοληστερόλης. Η σχέση της Cav-1 με την χοληστερόλη είναι αμφίδρομη καθώς η μια ρυθμίζει τα επίπεδα της άλλης. Τα επίπεδα της χοληστερόλης επηρεάζουν τον αριθμό των caveolae στην πλασματική μεμβράνη μέσω πρόσδεσης της σε ρυθμιστικά στοιχεία στον υποκινητή της Cav-1, καθώς υπό έλλειψη ή περίσσεια αυτής μεταβάλλεται η έκφραση της Cav-1 (Bist et al., 1997; Fielding et al., 1997). Από την άλλη, η Cav-1 παίζει ρόλο στην εκροή και εισροή της χοληστερόλης από το κύτταρο. Συγκεκριμένα, η Cav-1 συμμετέχει στη μεταφορά της χοληστερόλης από το ενδοπλασματικό δίκτυο, στο οποίο συντίθεται, προς τη μεμβράνη του κυττάρου στα caveolae όπου μεταφέρεται στη συνέχεια σε High Density Lipoproteins (HDL) στο εξωκυτταρικό πλάσμα (Cohen et al., 2004). Όσον αφορά την εισροή της χοληστερόλης, έχει προταθεί ότι εκτός από το κύριο μονοπάτι αυτής που μεσολαβεί η κλαθρίνη, υπάρχει και ένα δεύτερο στο οποίο εμπλέκονται τα caveolae στα οποία συνεντοπίζεται και ο υποδοχέας scavenger receptor B1 (SR-B1) (Graf et al., 1999). Ο SR-B1 ευθύνεται για την πρόσληψη των HDL εσωτερικά του κυττάρου (Shen et al., 2018).

Ενδοκυττάρωση

Αν και ο κύριος μηχανισμός ενδοκυττάρωσης για την είσοδο διαφόρων στοιχείων στο κύτταρο είναι η ενδοκυττάρωση διαμεσολαβούμενη από κλαθρίνη, υπάρχουν και εναλλακτικοί μηχανισμοί όπως είναι η ενδοκυττάρωση μέσω των caveolae όπως φαίνεται στην *Εικόνα 9*. Το πιο καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα που χρησιμοποιείται αυτός ο μηχανισμός ενδοκυττάρωσης αφορά τον simian virus 40 (SV40) (Norkin, 1999). Αυτός ο ιός, όπως και άλλα παθογόνα, επιλέγοντας αυτόν τον τρόπο εισόδου στο κύτταρο, σε αντίθεση με την ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης, αποφεύγουν την επεξεργασία από τα λυσοσώματα και έτσι δεν υπόκεινται αποικοδόμηση από το κύτταρο. Ο SV40 πηγαίνει κατευθείαν στο ΕΔ, αποτρέποντας έτσι τη πιθανότητα να απενεργοποιηθεί η δράση του από το λυσοσωμικό περιεχόμενο (Norkin et al., 2002; Pelkmans et al., 2001).

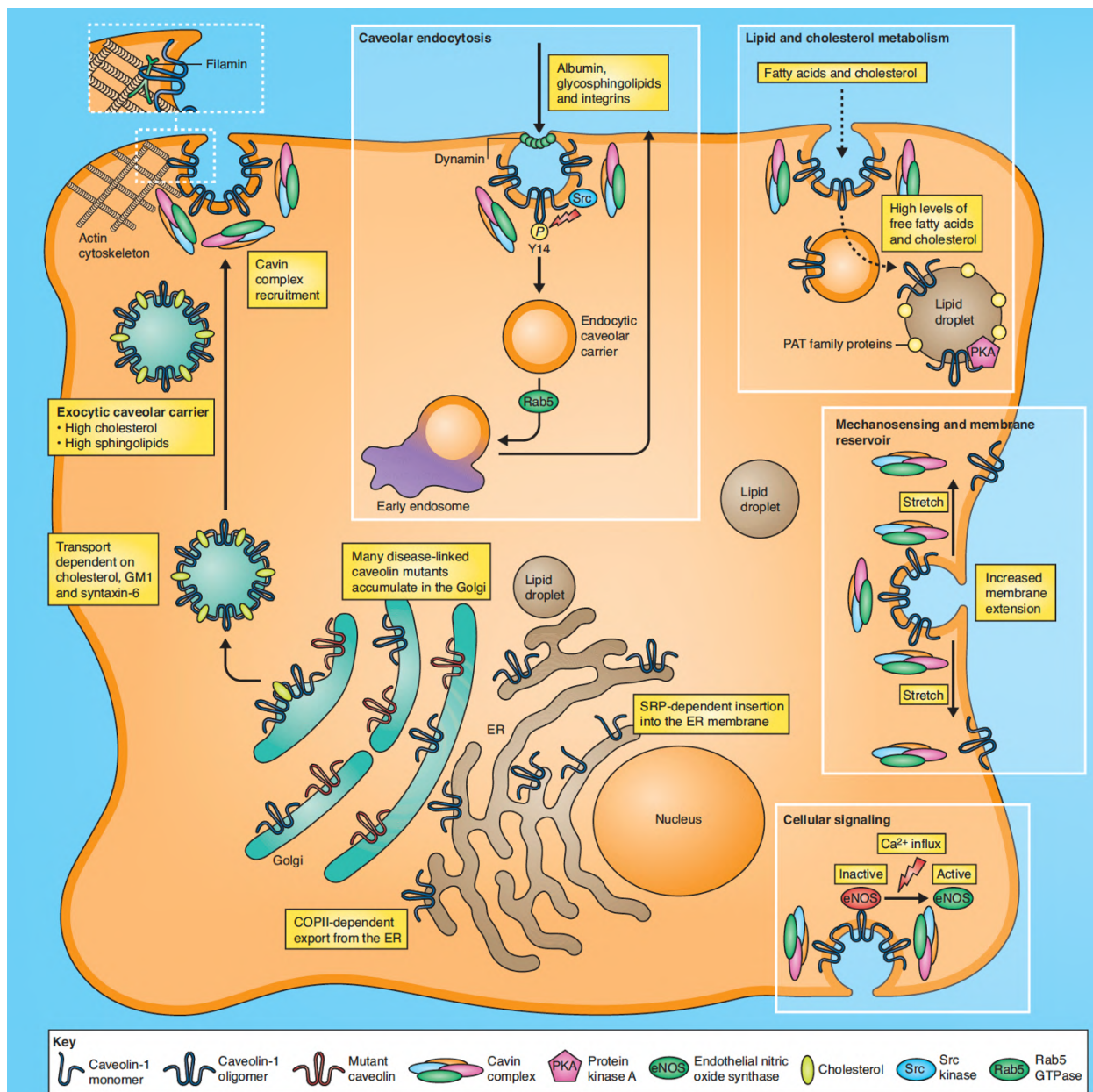
Μεταγωγή σήματος

Η caveolin-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος διαφόρων μορίων με αποτέλεσμα να ελέγχει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτό το επιτυγχάνει κυρίως μέσω της δομής Caveolin Scaffolding Domain (CSD) με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως ικρίωμα για τα μόρια με τα οποία αλληλοεπιδρά οδηγώντας στη διαμερισματοποίηση τους στα caveolae. Μερικά από αυτά τα μόρια αποτελούν οι GPCRs (G-Protein Coupled Receptors), η PKA (Protein Kinase A), κινάσες της οικογένειας Src, κανάλια ιόντων, MAPKs αλλά και υποδοχείς διάφορων αυξητικών παραγόντων όπως είναι οι FGFR, VEGFR, IGFR, PDGFR και EGF (P. Liu et al., 2002). Το πιο καλά χαρακτηρισμένο μόριο που αλληλοεπιδρά με την Cav-1 είναι η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου που εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (eNOS), όπου η Cav-1 δρα ανασταλτικά σε αυτήν διατηρώντας τη σε μια ανενεργή κατάσταση (Z. Chen et al., 2012; Quest et al., 2008). Αντιθέτως, έχει δείχθει ότι η Cav-1 ρυθμίζει θετικά τη σηματοδότηση κάποιων μορίων όπως είναι ο υποδοχέας της ινσουλίνης (Yamamoto et al., 1998).

Ανίχνευση σημάτων μηχανικής φύσεως (Mechanosensing)

Έχει προταθεί ότι η caveolin-1 και τα caveolae ανιχνεύουν σήματα μηχανικής φύσεως στη κυτταρική μεμβράνη και μεταβάλλουν την τάση αυτής προκειμένου να μην υποστεί ρήξη. Αυτό πιθανώς το καταφέρνει μέσω μεταβολής του λόγου όγκου προς επιφάνειας του κυττάρου και έτσι δεν γίνεται λύση αυτού (Parton

& Simons, 2007). Τα caveolae χάνουν τη κυκλική τους μορφή και οι εγκολπώσεις παύουν να υπάρχουν με αποτέλεσμα σε εκείνο το σημείο η μεμβράνη να γίνεται πιο επίπεδη ως απόκριση στη διάταση (Dulhunty & Franzini-Armstrong, 1975; J. Lee & Schmid-Schönbein, 1995; Sinha et al., 2011). Η αποσυναρμολόγηση που υφίστανται το σύμπλοκο των caveolae με τις cavin συμβαίνει σε αρχικό στάδιο αυτής της διαδικασίας, με αποτέλεσμα τα μόρια της caveolin να παραμένουν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, ενώ τα μόρια cavin να απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 9* (Sinha et al., 2011). Αυτή η απόκριση πιθανώς οφείλεται στη φωσφορυλίωση της Cav-1 στη Tyr14 από την κινάση Src, μια τροποποίηση που επάγεται από διάφορα μηχανικά ερεθίσματα (Joshi et al., 2012; Zhang et al., 2007). Αυτό συνεπάγεται την αλληλεπίδραση της Cav-1 με διάφορους τελεστές ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο σηματοδοτικά μονοπάτια που αναδιαμορφώνουν τον κυτταροσκελετό του κυττάρου.



Εικόνα 9: Τα caveolae με μια ματιά: το βασικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των caveolae καθώς και μερικές από τις βασικές τους λειτουργίες (Bastiani & Parton, 2010)

3.4 Caveolin-1 και παθήσεις σχετιζόμενες με τη γήρανση

Η caveolin-1 μεσολαβεί σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Μερικές από αυτές είναι το πνευμονικό εμφύσημα, η αθηροσκλήρωση, η οστεοαρθρίτιδα, ο καρκίνος καθώς και νευροεκφυλιστικές νόσοι.

Πνευμονικό Εμφύσημα

Το πνευμονικό εμφύσημα προκαλείται κυρίως από χρόνια έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, ο οποίος εμπεριέχει πολλά οξειδωτικά που προκαλούν οξειδωτικό στρες το οποίο θεωρείται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη παθογένεση αυτής της ασθένειας. Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, ο καπνός του τσιγάρου οδηγεί σε πρόωρη γήρανση ινοβλαστών, καθώς η προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών έδειξε ότι αυτή η κατάσταση δύναται να αποτραπεί (Nyunoya et al., 2006; Volonte et al., 2009). Επιπλέον, ινοβλάστες πνευμόνων από ασθενείς που πάσχουν από αυτήν τη νόσο χαρακτηρίζονται από μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό (Holz et al., 2004) καθώς και αυξημένη ενεργότητα του δείκτη SA-β-gal (Müller et al., 2006). Σε ινοβλάστες ποντικών που δεν εκφράζεται η Cav-1 τα γηρασμένα κύτταρα είναι πολύ λιγότερα σε αριθμό (Volonte et al., 2009), και σε συνεχή έκθεση τέτοιων ποντικών σε καπνό τσιγάρου για 6 μήνες, αυτά δεν αναπτύσσουν πνευμονικό εμφύσημα (Volonte et al., 2009). Συνεπώς η Cav-1 πιθανώς συσχετίζεται με τη πρόωρη γήρανση των ινοβλαστών και την επακόλουθη παθογένεση αυτής της ασθένειας.

Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια φλεγμονώδη νόσο που χαρακτηρίζει τη γήρανση των αγγείων του αίματος, όπου εσωτερικά αυτών συσσωρεύονται υψηλές συγκεντρώσεις διαφόρων κατάλοιπων λιπιδίων καθώς και θραυσμάτων του κυττάρου. Η Cav-1 καθώς εκφράζεται ευρέως σε ενδοθηλιακά κύτταρα και συμμετέχει στη μεταφορά της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, εμπλέκεται σε διαδικασίες που οδηγούν στην ανάπτυξη αυτής της καρδιαγγειακής νόσου. (Ross, 1999). Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η Cav-1 επισπεύδει το φαινότυπο της παθολογικής αυτής κατάστασης με δύο τρόπους. Ρυθμίζει τη διακυττάρωση των LDL στον έσω χιτώνα των αιμοφόρων αγγείων, αλλά μετέχει και στην ενίσχυση της φλεγμονής σε μακροφάγα κύτταρα οδηγώντας έτσι στην ενίσχυση της δημιουργίας πλάκας στα αγγεία (Frank, 2010; Jasmin et al., 2012). Επίσης έχει δειχθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νόσων όπως είναι η αθηροσκλήρωση. Έρευνα έχει δείξει ότι τα επίπεδα της Cav-1 ενδοθηλιακών κυττάρων καπνιστών με πρόωρο στάδιο αθηροσκλήρωσης είναι αυξημένα συγκριτικά με αυτά μη καπνιστών. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έφεραν φαινότυπο γηρασμένων κυττάρων και αυξημένο φορτίο οξειδωτικών (Farhat et al., 2008).

Οστεοαρθρίτιδα

Θεωρείται ότι τα γηρασμένα χονδροκύτταρα των αρθρώσεων συντελούν στην αυξημένη συχνότητα της οστεοαρθρίτιδας σε συνάρτηση με την ηλικία. Διάφορες μορφές στρες για το κύτταρο, όπως είναι ο αυξημένος αριθμός κυτοκινών και το οξειδωτικό στρες διαμεσολαβούν στη παθογένεση αυτής της ασθένειας (J. A. Martin & Buckwalter, 2001). Η Cav-1 συμμετέχει σε αυτή τη διαμεσολάβηση καθώς υπό την επίδραση των κυττάρων με IL-1β και H₂O₂, αυξάνονται τα επίπεδα του mRNA της και τα πρωτεϊνικά της επίπεδα και επάγεται πρόωρη γήρανση των χονδροκυττάρων των αρθρώσεων (Dai et al., 2006). Αυτό

επιβεβαιώθηκε από τους ερευνητές με τη χρήση μιας αντινοσηματικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της έκφρασης της Cav-1 και αποτράπηκε η πρόωρη γήρανση τους.

Νευροεκφυλιστικές νόσοι

Ο σχηματισμός των συνάψεων είναι απαραίτητος για την φυσιολογική ανάπτυξη των νευρώνων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Η χοληστερόλη αποτελεί βασικό στοιχείο των λιπιδικών σχεδίων των μεμβρανικών συνάψεων και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτών καθώς και στη διαβίβαση των νευροδιαβιβαστών (Mauch et al., 2001). Βλάβες στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, στην πρόσληψη της από το κύτταρο ή στην εναπόθεση της στις λιπιδικές σχεδίες μπορούν να οδηγήσουν σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως είναι η Alzheimer's Disease (AD) (Alessandro Peri & Mario Serio, 2008; Bulloj et al., 2008; Cecchi et al., 2008; Crameri et al., 2006; Wisniewski et al., 2013). Η AD αποτελεί μια νόσο που μαστίζει τον ηλικιωμένο πληθυσμό, καθώς προσβάλλει σε ποσοστό 47% άτομα άνω των 85 ετών (Yankner et al., 2008). Εφόσον στη μεταφορά και οργάνωση της χοληστερόλης στη μεμβράνη διαμεσολαβεί η caveolin-1 είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι αποτελεί σημαντική πρωτεΐνη για την ακεραιότητα των συνάψεων. Πράγματι, ερευνητές έδειξαν ότι τα επίπεδα της Cav-1 είναι μειωμένα σε ιππόκαμπο ηλικιωμένων ποντικών σε σύγκριση με ιππόκαμπο νεαρών ποντικών (Head et al., 2010). Επίσης σε νεαρά ποντίκια στα οποία πραγματοποίησαν knock-out του γονιδίου της Cav-1, παρουσιάστηκε επίσπευση της γήρανσης αλλά και εκφυλισμός των νευρώνων. Τα ποντίκια αυτά εμφάνισαν νευροπαθολογία αντίστοιχη της AD με αποτέλεσμα να συμπεραίνουμε τη σημασία της Cav-1 στις νευροεκφυλιστικές νόσους. Συνεπώς, οι λιπιδικές σχεδίες και η caveolin-1 είναι απαραίτητες για τη δημιουργία, τη διατήρηση και τη σταθεροποίηση των συνάψεων.

Καρκίνος

Ο αριθμός των μεταλλάξεων που συσσωρεύονται στους ιστούς με το πέρασμα των ετών, οδηγεί σε αυξημένους ρυθμούς καρκινογένεσης στους ηλικιωμένους (de Magalhães, 2013). Αρχικά υπήρχε η υπόθεση ότι η Cav-1 αποτελεί μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη καθώς το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται σε μια γονιδιακή περιοχή που θεωρείται ότι είναι ογκοκατασταλτική (de Magalhães, 2013; Williams & Lisanti, 2005). Ωστόσο στη συνέχεια έγινε εμφανές ότι η Cav-1 εμφανίζει διττό ρόλο στη καρκινογένεση καθώς έχει και την ικανότητα ογκογένεσης, ενώ τα επίπεδα της μπορεί να αυξάνονται, να μειώνονται ή και να παραμένουν αμετάβλητα αναλόγως με τον καρκινικό τύπο ή το στάδιο αυτού (Sohn et al., 2016). Για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών μειώνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης Cav-1, ενώ στον καρκίνο του οισοφάγου και του προστάτη τα επίπεδα της αυξάνονται (Williams & Lisanti, 2005). Συγκεκριμένα, όσον αφορά το ρόλο της Cav-1 στην ανάπτυξη όγκου, αυτή διαμεσολαβεί στο μηχανισμό αυτόν μέσω αναστολής της απόπτωσης (Goetz et al., 2008), μέσω διευκόλυνσης της ανάπτυξης ανεξάρτητη από προσφύσεις (Faggi et al., 2015), μέσω ανθεκτικότητας σε φαρμακευτικές ουσίες (Ho et al., 2008; Z. Wang et al., 2015), καθώς και μέσω της μετάστασης (Ting Tse et al., 2012). Επιπλέον, κατά την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, η Cav-1 εκκρίνεται και συνεπώς αφού είναι αυξημένα τα επίπεδα της, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας πιθανός διαγνωστικός δείκτης (L. Li et al., 2005; Yang et al., 1999).

Επιπλέον έχει εντοπιστεί η έκφραση ενός υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, του TIE2 σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του γλοιώματος (V. Martin et al., 2008). Με ιονίζουσα ακτινοβολία, ο TIE2 που βρίσκεται στη μεμβράνη του κυττάρου μετατοπίζεται στον πυρήνα και φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στο κατάλοιπο Tyr51 (Hossain et al., 2016). Έτσι συμμετέχει στο μηχανισμό DDR, μέσω στρατολόγησης της

κινάσης ABL-1 στα σύμπλοκα επιδιόρθωσης του DNA τα οποία συμμετέχουν στο NHEJ (Nonhomologous end-joining) (Hossain et al., 2016). Αυτό έχει σημασία για τη θεραπεία του καρκίνου, καθώς ο TIE2 συσχετίζεται με τη ραδιοαντίσταση και συνεπώς τα καρκινικά κύτταρα δεν είναι επιδεκτικά σε θεραπεία. Σε επόμενα πειράματα που έγιναν από τους ίδιους ερευνητές αποδείχθηκε ότι ο TIE2 βρίσκεται στη μεμβράνη του κυττάρου σε σύμπλοκο με την caveolin-1, και έπειτα από τη φωσφορυλίωση της Cav-1 στο κατάλοιπο Tyr14 το σύμπλοκο αυτό μεταφέρεται στο πυρήνα (Hossain et al., 2017). Η caveolin-1 υπερεκφράζεται σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος εγκεφάλου και έχει προταθεί ότι τα επίπεδα της αυξάνονται έπειτα από ιονίζουσα ακτινοβολία σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και αυτό επιφέρει ανθεκτικότητα στις ρήξεις στο DNA, μέσω ρύθμισης του μηχανισμού NHEJ (Zhu et al., 2010).

4. Σηματοδότηση και caveolin-1 στη κυτταρική γήρανση

4.1 Μεταβολή των επιπέδων της caveolin-1 από το οξειδωτικό στρες

- Τα επίπεδα της caveolin-1, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο, αυξάνονται όταν πραγματοποιείται έκθεση ινοβλαστών ποντικού (κυτταρική σειρά NIH 3T3) σε υπεριώδες φως ή επώαση αυτών σε υποκυτταροτοξικά επίπεδα H_2O_2 , καταστάσεις οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα σε πρόωρη γήρανση (Volonte et al., 2002). Το οξειδωτικό στρες επάγει την αυξημένη έκφραση της Cav-1 μέσω των p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) και Sp1. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 προσδένεται σε δύο στοιχεία «εμπλουτισμένα» με επαναλήψεις GC που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου της Cav-1, και τον ενεργοποιεί οδηγώντας στη μεταγραφή της. Η $p38^{MAPK}$, η οποία ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες, είναι το μόριο που ευθύνεται για την ενεργοποίηση της Sp1, καθώς έχει αποδειχθεί ότι με μόρια αναστολές που αναστέλλουν τη δράση της $p38^{MAPK}$ διακόπτεται η πρόσδεση της Sp1 σε αυτές τις θέσεις και δεν επάγεται πρόωρη γήρανση στους ινοβλάστες (Dasari et al., 2006).
- Επιπλέον, σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες έχει παρατηρηθεί έπειτα από οξειδωτικό στρες, αύξηση των επιπέδων της Cavin-1 (Volonte & Galbiati, 2011). Η αύξηση του αριθμού των ελευθέρων ριζών οδηγεί στην αύξηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της Cavin-1 και της Cav-1 με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός των caveolae (Volonte & Galbiati, 2011). Η Cavin-1 θεωρείται απαραίτητο μόριο για την πρόωρη γήρανση που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες καθώς η μείωση των μεταγραφικών της επιπέδων μέσω antisense RNA αναστέλλει τη πρόωρη γήρανση (Volonte & Galbiati, 2011). Το αποτέλεσμα αυτό απεικονίζεται και στην *Εικόνα 10*.
- Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) ενεργοποιείται έπειτα από τη παρουσία ROS και οδηγεί στη μεταγραφή διάφορων προφλεγμονωδών γονιδίων όπως είναι η κύκλο-οξυγενάση 2 (COX2) (Chung et al., 2002). Το ένζυμο αυτό, που μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη H_2 , φαίνεται να παίζει ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης καθώς έχει αποδειχθεί ότι η εφαρμογή ειδικών αναστολέων της COX2 αποτρέπει την αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της Cav-1 σε Human Dermal Fibroblasts (HDFs) με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διάρκεια της ζωής τους (Kim et al., 2008). Αυτή η μείωση των

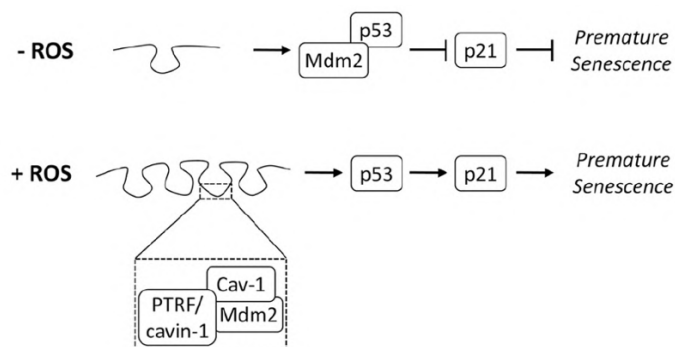
επιπέδων της Cav-1 πιθανώς οφείλεται στην αποτροπή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στα Sp1 sites του υποκινητή του γονιδίου της Cav-1 (GC rich regions) λόγω του αναστολέα της COX2 και επακολούθως τα κύτταρα δεν οδηγούνται σε πρόωρη γήρανση επαγόμενη από οξειδωτικό στρες (Wu et al., 2008). Ακόμα, σε ιντρονική αλληλουχία του γονιδίου της Cav-1 υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης και πρόσδεσης του NF-κΒ, ο οποίος μεσολαβεί στη μεταγραφή της Cav-1 (Tiruppathi et al., 2008). Συνεπώς, αφού τα επίπεδα του NF-κΒ αυξάνονται έπειτα από οξειδωτικό στρες, είναι πολύ πιθανό να συμμετέχει στην μεσολαβούμενη από την Cav-1 επαγωγή του SIPS.

- Το ένζυμο οξειδάση του NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) παράγει ως προϊόν ρίζα υπεροξειδίου και συνεπώς αυξάνεται το οξειδωτικό φορτίο του κυττάρου. Δεδομένα δείχνουν ότι η οξειδωμένη-χαμηλής πυκνότητας- λιποπρωτεΐνη (oxLDL) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της Cav-1 σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού και προωθεί τη μεταφορά της καταλυτικής υπομονάδας p47phox του NADPH σε caveolae (J. Wang et al., 2018). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται εξαιτίας των ROS σε πρόωρη γήρανση.

4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδικά της caveolin-1 στο SIPS

Η caveolin-1 ρυθμίζει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια κυρίως με τη δέσμευση μορίων που συμμετέχουν σε αυτά, μέσω της επικράτειας CSD, και την επακόλουθη απομάκρυνση τους σε caveolae, αποτρέποντας τα να αλληλοεπιδράσουν με τα μόρια-στόχους τους. Η Cav-1 αυξάνει τα επίπεδα της p53, μέσω αλληλεπίδρασης με μόρια που συμμετέχουν στη ρύθμιση της σηματοδότησης της, οδηγώντας σε πρόωρη γήρανση του κυττάρου μέσω του μηχανισμού SIPS.

- Συγκεκριμένα, αλληλοεπιδρά με την MDM2 η οποία αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, μια E3 λιγάση της ουβικουιτίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται τα διαθέσιμα επίπεδα της MDM2 που μπορούν να δράσουν και άρα να αυξάνονται τα επίπεδα της p53 καθώς δεν οδηγείται στα πρωτεασώματα προς αποδόμηση (Bartholomew et al., 2009). Να σημειωθεί ότι η αλληλουχία σύνδεσης της Cav-1 με την MDM2 παρεμβάλλεται εντός της αλληλουχίας που συνδέεται η MDM2 με την p53 (Bartholomew et al., 2009). Σημαντικό ρόλο παίζει και η Cavin-1 καθώς συγκρατεί μαζί με την Cav-1 την MDM2 στα caveolae, μη επιτρέποντας την να κατευθυνθεί στον πυρήνα για να αναστείλει την p53 (Volonte & Galbiati, 2011). Το σύμπλοκο αυτών των πρωτεϊνών αναπαρίσταται στην *Εικόνα 10*.



Εικόνα 10. Έπειτα από οξειδωτικό στρες οι πρωτεΐνες Cav-1 και Cavin-1 στρατολογούν την Mdm2 και τη δεσμεύουν μακριά από την p53, επιτρέποντας την έτσι να δράσει και να επάγει πρόωρη κυτταρική γήρανση (Volonte & Galbiati, 2011).

- Επιπλέον η Cav-1 αλληλοεπιδρά με το αντιοξειδωτικό ένζυμο αναγωγάση της θειορεδοξίνης 1 (Thioredoxin Reductase 1, TrxR1). Αυτό το ένζυμο συμμετέχει στην αντιμετώπιση του πλεονάζοντος οξειδωτικού φορτίου καθώς είναι δότης ηλεκτρονίων σε διάφορα οξειδοαναγωγικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών, αλλά δρα και μέσω της άμεσης αναγωγής δραστικών μορίων που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες (Γιαννακοπούλου, 2007). Έχει δειχθεί ότι η TrxR1 εντοπίζεται στα caveolae και αλληλοεπιδρά με την Cav-1 μέσω του CSD ασκώντας ανασταλτική δράση σε αυτή (Volonte & Galbiati, 2009). Η μείωση της δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου TrxR1 εξαιτίας της Cav-1, θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της p53 καθώς θα αυξηθεί το οξειδωτικό φορτίο στο κύτταρο επιφέροντας με αυτόν τον τρόπο SIPS.
- Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί σε ινοβλάστες ότι η Cav-1 αυξάνει τη δράση της κινάσης ATM, η οποία είναι από τα πρώτα μόρια που ενεργοποιείται η δραστηριότητα τους όταν υπάρξουν ρήξεις στο DNA. Αυτή η ρύθμιση πραγματοποιείται μέσω ελέγχου της καταλυτικής υπομονάδας PP2A-C της φωσφατάσης PP2A, η οποία αποφωσφορυλιώνει την κινάση ATM με αποτέλεσμα να μη μπορεί να είναι ενεργή και να συνεχίσει το σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά αυτής. Έτσι η Cav-1 συνδέεται με την PP2A-C και την απομονώνει σε caveolae, ώστε η ATM να είναι ελεύθερη να δράσει και να οδηγήσει τα κύτταρα σε SIPS (Volonte et al., 2009)
- Η SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1) είναι μια αποακετυλάση των ιστονών της τάξης III η οποία εκτός της δράσης της σε διαδικασίες ρύθμισης της γονιδιακής μεταγραφής, αποακετυλιώνει και την πρωτεΐνη p53 με αποτέλεσμα να την απενεργοποιεί (Volonte & Galbiati, 2020). Συνεπώς η p53 για να είναι ενεργή πρέπει να είναι και φωσφορυλιωμένη και ακετυλιωμένη. Έχει δειχθεί σε πείραμα (Volonte et al., 2015) ότι μετά από επαγωγή οξειδωτικού στρες σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών, η Cav-1 δεσμεύει την SIRT1 και συνεπώς την απομακρύνει από τον στόχο της, με αποτέλεσμα να μην αποακετυλιώνεται η p53 και άρα να μένει ενεργή οδηγώντας σε επακόλουθη πρόωρη γήρανση. Αυτή η απομάκρυνση της SIRT1 σε caveolae οφείλεται με βάση τους συγγραφείς σε μια μεταμεταφραστική τροποποίηση της Cav-1, και συγκεκριμένα φωσφορυλίωση του καταλοίπου Tyr14, η οποία προκαλείται από το οξειδωτικό στρες με έναν τρόπο που εξαρτάται από την p38^{MAPK}. Συνεπώς προτείνεται σύμφωνα και με τα παραπάνω ότι η p38^{MAPK} επιδρά στην Cav-1 τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο.
- Ο μεταγραφικός παράγοντας nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (NRF2) συμμετέχει στη προστασία του κυττάρου έναντι στο οξειδωτικό στρες καθώς ρυθμίζει μέσω μεταγραφής την ενεργοποίηση γονιδίων που συνιστούν στο αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου (Wakabayashi et al., 2010). Σε κατάσταση που δεν υπάρχει στρες στο κύτταρο, δηλαδή σε κατάσταση ηρεμίας, ο NRF2 δεσμεύεται από την πρωτεΐνη Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) και οδηγείται στα πρωτεασώματα για πρωτεόλυση, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της να είναι χαμηλά στο κύτταρο (Itoh et al., 2004). Επιπλέον, σε κατάσταση ηρεμίας, ο NRF2 εντοπίζεται μερικώς στα caveolae όπου αλληλοεπιδρά με την Cav-1 μέσω του CSD, όπου τον αποτρέπει από το να εισέλθει στον πυρήνα και να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω της αναγνώρισης των Antioxidant Response Elements (AREs) (Volonte et al., 2013). Συνεπώς η Cav-1 αποτελεί έναν καταστολέα του NRF2 καθώς αποτρέπει τη

σηματοδότηση του, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του μονοπατιού p53-p21 και επακολούθως στο SIPS (Volonte et al., 2013).

- Το MTH1 (MutT homolog 1) είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στο αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου. Υδρολύει οξειδωμένες πουρίνες, και συγκεκριμένα τις 8-oxo-dGTP, διατηρώντας έτσι σε χαμηλά επίπεδα την 8-οξογουανίνη από το pool των dNTPs του κυττάρου και συνεπώς εμποδίζει την ενσωμάτωση τους στο DNA, αποτρέποντας την εκκίνηση του μηχανισμού DDR και επακολούθως της πρόωρης γήρανσης (Rai et al., 2009). Η πρωτεΐνη K-Ras, μια GTPase, όταν μεταλλάσσεται, μετατρέπεται σε μια ογκογενής μορφή της η οποία την καθιστά συνεχώς ενεργή με αποτέλεσμα να επάγει τη δημιουργία όγκων (Volonte et al., 2018). Έχειδειχθεί από τους Volonte και συνεργάτες (2018) ότι η K-Ras επάγει την αλληλεπίδραση της Cav-1 με την MTH1 με αποτέλεσμα να μη μπορεί το ένζυμο αυτό να δράσει ως αντιοξειδωτικός μηχανισμός και έτσι το κύτταρο να οδηγείται στη πρόωρη γήρανση.

Επιπλέον, υπάρχουν έρευνες (K. A Cho et al., 2004; Kyung A. Cho et al., 2003; Park et al., 2000; Teixeira et al., 1999) που υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση της Cav-1 με τον Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), τη Focal Adhesion Kinase (FAK) και τις Rho GTPases, επηρεάζοντας τη σηματοδότηση τους και τη μορφολογία των κυττάρων με αποτέλεσμα αυτό να οδηγείται στη κυτταρική γήρανση μέσω της διάβρωσης των τελομερών (Replicative Senescence).

5. Σκοπός Εργασίας

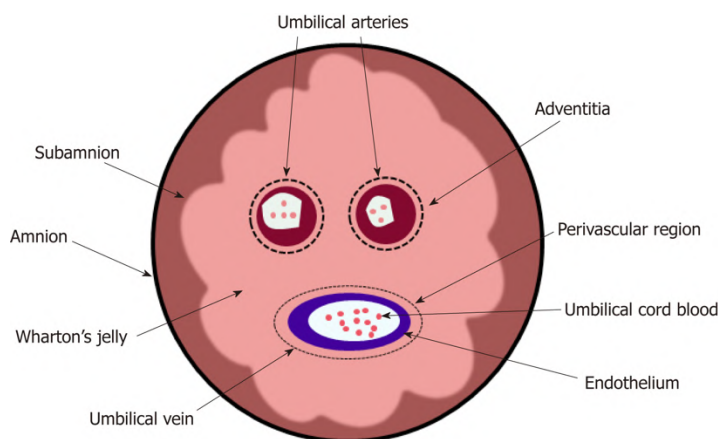
Βάσει δημοσιευμένων ερευνών έχουμε ενδείξεις για τις δράσεις της caveolin-1 και τη σχέση της με τη κυτταρική γήρανση. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν να μελετηθεί το πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής σε κύτταρα στα οποία έχει γίνει επίδραση H_2O_2 προκειμένου να προκληθεί οξειδωτικό στρες, σε νεαρά κύτταρα (early passage) και μεγαλύτερης ηλικίας (late passage). Αρχικά έγινε καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων και ακολούθησαν ανακαλλιέργειες αυτών μέχρι να φτάσουν τα κύτταρα σε συγκεκριμένα passages (p7 p15 και p33 όπου p:passage). Εν συνεχεία, έγινε απομόνωση πρωτεϊνών και μελέτη των επιπέδων έκφρασης της caveolin-1. Επιπλέον, σκοπός ήταν να προσδιοριστεί η συμπεριφορά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην πρόκληση οξειδωτικού στρες σε early και late passage κύτταρα μέσω προσδιορισμού του υποκυτταρικού της εντοπισμού με μικροσκόπιο φθορισμού.

Πειραματικό μέρος

6. Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Δείγματα Κυττάρων

Τα κύτταρα πάνω στα οποία διεξήχθησαν τα πειράματα αυτή της πτυχιακής ήταν ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) προερχόμενα από το Wharton's Jelly (WJ) του ομφάλιου λώρου δύο δοτών. Το Wharton's Jelly περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Thomas Wharton το 1656 ως ένας βλεννώδης συνδετικός ιστός του ομφάλιου λώρου που εντοπίζεται ενδιάμεσα από το αμνιωτικό επιθήλιο και από τα ομφάλια αγγεία όπως απεικονίζεται και στην *Εικόνα 11*. Τα WJ-MSCs έχουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό και μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και λιποκύτταρα. Επίσης χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα προσκόλλησης στον πάτο της επιφάνειας που αναπτύσσεται η κυτταροκαλλιέργεια στη φλάσκα. Η χρήση των WJ-MSCs σε πειράματα δε «γεννά» ηθικά και νομικά διλλήματα καθώς υπό κανονικές συνθήκες τα κύτταρα αυτά θα απορρίπτονταν.



Εικόνα 11: Απεικόνιση διατομής του ομφάλιου λώρου (Yin et al., 2019).

6.2 Καλλιέργειες Wharton's Jelly Derived – Mesenchymal Stem Cells

6.2.1 Υλικά καλλιέργειας

- **Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας**

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της Gibco. Σε αυτό, προκειμένου να είναι πλήρες και έτοιμο προς χρήση, προστέθηκαν 10% v/v ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS) το οποίο προσφέρει κυρίως αναπτυξιακούς παράγοντες, και 1% v/v Penicillin – Streptomycin (Pen – Strep) τα οποία ως αντιβιοτικά συμβάλλουν στην προστασία του θρεπτικού μέσου από επιμολύνσεις από βακτήρια και μύκητες. Συγκεκριμένα, σε 500 ml θρεπτικού μέσου DMEM, προστέθηκαν 50 ml FBS και 5 ml Pen – Strep.

Το πλήρες θρεπτικό διατηρείται στο ψυγείο στους 4°C και όταν πρέπει να χρησιμοποιηθεί τοποθετείται στο υδατόλουτρο για να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία του στους 37°C.

- **Διάλυμα *Hank's Balanced Solution***

Το Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco) είναι ένα ισοτονικό διάλυμα αλάτων το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πλύσεις στις κυτταροκαλλιέργειες και δεν επηρεάζει το pH αυτής αλλά αντιθέτως συμβάλει στη διατήρηση αυτού. Το PBS φυλάσσεται και χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

- **Θρυψίνη**

Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο της φλάσκας καθώς τα WJ-MSCs προσκολλώνται σε αυτόν. Έτσι η θρυψίνη διασπά τους συνδέσμους που αναπτύσσονται μεταξύ των καλλιεργούμενων κυττάρων και του πολυστυρένιου. Αποθηκεύεται στους 4°C, ωστόσο πρέπει να χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία 37°C, για αυτό και πρώτα τοποθετείται στο υδατόλουτρο για να φτάσει αυτή τη θερμοκρασία.

6.2.2 Πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των WJ-MSCs πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες πολυστυρένιου με φίλτρο χρησιμοποιώντας πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε κλίβανο επώασης στον οποίο οι συνθήκες ήταν ιδανικές για την επιτυχή ανάπτυξη των κυττάρων. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 37°C, και υπήρχε σταθερή συγκέντρωση υγρασίας. Επιπλέον, στο εσωτερικό του κλιβάνου διατηρούνταν σταθερή η παροχή 5% CO₂. Με τον ανεμιστήρα στο εσωτερικό του κλιβάνου πραγματοποιούνταν ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας και του CO₂. Επιπρόσθετα, ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε σε στείρο χώρο σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής τάξης II, ώστε να γίνει αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων κυρίως από το εξωτερικό περιβάλλον στις καλλιέργειες των κυττάρων. Οι κυτταροκαλλιέργειες παρατηρούνταν σε καθημερινή βάση σε ανάστροφο μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί η αναμενόμενη ανάπτυξη τους και η απόκλιση ανεπιθύμητων επιμολύνσεων.

6.2.3 Πρωτόκολλο απόψυξης και ανακαλλιέργειας κυττάρων

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μετά από την απομόνωση τους από τον ομφάλιο λώρο εμβρύων μπορούν να αποθηκευτούν και να καταψυχθούν στους -150 °C σε τράπεζα αζώτου για μελλοντική τους χρήση. Για την κατάψυξη τους, χρησιμοποιούνται ειδικά φιαλίδια που ονομάζονται cryovials. Σε αυτά προστίθενται τα βλαστικά κύτταρα σε συγκέντρωση 4 x 10⁶ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού DMEM αλλά και 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) και 30% Fetal Bovine Serum (FBS). Το DMSO χρησιμοποιείται για την διαδικασία της ψύξης, ώστε τα αυτά να γίνει σταδιακά και να μην δημιουργηθούν κρύσταλλοι πάγου οι οποίοι θα κατέστρεφαν τα κύτταρα.

Για την χρήση των κυττάρων σε μελέτες, πρέπει να ακολουθήσει απόψυξη αυτών η οποία πραγματοποιείται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής και η διαδικασία είναι η εξής:

1. Προσθήκη 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM σε falcon των 15 ml
2. Μεταφορά του cryovial που περιέχει τα κατεψυγμένα κύτταρα στο υδατόλουτρο (37°C) και ανακίνηση του για 10 – 15 δευτερόλεπτα.
3. Μεταφορά του περιεχομένου του cryovial με απόχυση στο falcon που περιέχει το θρεπτικό
4. Φυγοκέντρηση του falcon στις 1800 rpm για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου με πιπέτα και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml PBS
6. Φυγοκέντρηση του falcon στις 1800 rpm για 5-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
7. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου
8. Μεταφορά του περιεχομένου του falcon σε φλάσκα πολυστυρένιου και συμπλήρωση με 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου
9. Επώαση της κυτταροκαλλιέργειας σε κλίβανο επώασης (Συνθήκες: 37 °C, 5% CO₂)

Τα κύτταρα αφού φτάσουν περίπου 80% confluency, δηλαδή καλύψουν το 80% του διαθέσιμου όγκου θρεπτικού της φλάσκας, πρέπει να γίνει ανακαλλιέργεια (passage) αυτών σε δύο νέες φλάσκες με νέο θρεπτικό προκειμένου να συνεχίσουν να αναπτύσσονται κανονικά. Η διαδικασία πραγματοποιείται στο θάλαμο νηματικής ροής και είναι η εξής:

1. Απομάκρυνση του παλαιού θρεπτικού από τη φλάσκα
2. Ξέπλυμα των κυττάρων με 5 ml PBS δύο φορές
3. Προσθήκη 1,5 ml θρυψίνη και επώαση στον κλίβανο επώασης για τουλάχιστον 3,5 λεπτά προκειμένου να «σηκωθούν» τα κύτταρα
4. Παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο πως έχουν ξεκολλήσει επιτυχώς τα κύτταρα προκειμένου να συνεχίσουμε
5. Προσθήκη 5 ml νέου θρεπτικού μέσου για να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης
6. Μεταφορά όλου του περιεχομένου της φλάσκας σε falcon των 15 ml
7. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 rpm για 5 – 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
8. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
9. Προσθήκη 5 ml PBS και επαναιώρηση του pellet
10. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 rpm για 5 – 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
11. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
12. Προσθήκη 10 ml νέου θρεπτικού μέσου και επαναιώρηση των κυττάρων
13. Μεταφορά από 5 ml των κυττάρων σε κάθε φλάσκα
14. Συμπλήρωση σε κάθε φλάσκα με θρεπτικό μέσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 ml
15. Τοποθέτηση των φλασκών στον κλίβανο επώασης (Συνθήκες: 37 °C, 5% CO₂)

6.3 Προσδιορισμός δραστηριότητας SA-β-gal

Διαλύματα

- A. Διάλυμα μονιμοποίησης: 2 % φορμαλδεΰδη/ 0,2 % γλουταραλδεΰδη σε PBS
- B. Διάλυμα χρώσης:
 - 1. Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM κιτρικό οξύ/ Φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) σε pH 6.0
 - 2. 5 mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$
 - 3. 5 mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$
 - 4. 150 mM NaCl
 - 5. 2 mM MgCl_2
 - 6. 1 mg/ml 5-βρώμο-4-χλώρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοζίτης (X-gal)

Διαδικασία

- 1. Ανάπτυξη $0,3 - 2 \times 10^5$ κυττάρων σε καλλιέργεια σε τρυβλίο Petri
- 2. Απομάκρυνση θρεπτικού μέσου από τη κυτταροκαλλιέργεια
- 3. Δύο πλύσεις με κρύο PBS
- 4. Προσθήκη διαλύματος μονιμοποίησης
- 5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 6. Δύο πλύσεις με κρύο PBS
- 7. Προσθήκη 1-2 ml διαλύματος χρώσης
- 8. Επώαση στους 37 °C για 6 – 24 ώρες
- 9. Απομάκρυνση διαλύματος χρώσης
- 10. Τρεις πλύσεις με κρύο PBS
- 11. Λήψη φωτογραφιών σε οπτικό μικροσκόπιο

6.4 Επίδραση στα κύτταρα με H_2O_2 σε 6-well plates και Ανοσοφθορισμός

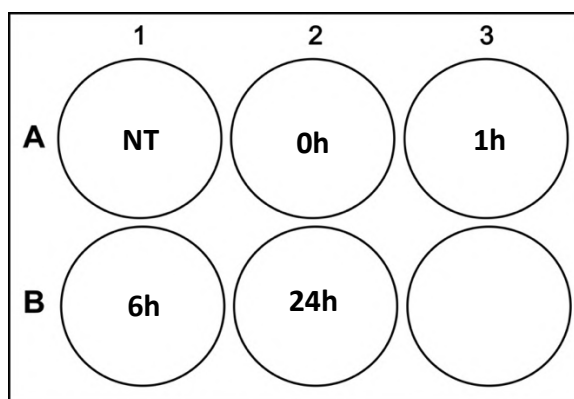
Μετά τη πλήρη κάλυψη της φλάσκας όπου το confluency είναι 100%, τα κύτταρα μεταφέρονται σε 6-well plate το οποίο φέρει έξι πηγαδάκια (wells). Τα κύτταρα στο 6-well plate θα συνεχίσουν να διαιρούνται με τον ίδιο τρόπο που διαιρούσαν στη φλάσκα. Το πλεονέκτημα της χρήσης του 6-well plate είναι ότι μας επιτρέπει να εφαρμόζουμε διαφορετικές συνθήκες στα κύτταρα που προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια. Δηλαδή μπορούμε να επιδράσουμε με διαφορετικές ουσίες, διαφορετικές συγκεντρώσεις μιας ουσίας, ή διαφορετικούς χρόνους επώασης αυτής.

Προετοιμασία (Σε συνθήκες εκτός θαλάμου καθέτου νηματικής ροής)

1. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων στο 6-well για αποστείρωση στο θάλαμο νηματικής ροής για 30 λεπτά
2. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού και 2×10^5 κύτταρα σε κάθε well
3. Επιστροφή του 6-well plate στον κλίβανο, ώστε τα κύτταρα να είναι έτοιμα για τον ανοσοφθορισμό την επόμενη ημέρα

Επιδράσεις

1. Αφαίρεση του θρεπτικού από το 6-well plate, εκτός από το πρώτο well που έχει το NT (No Treatment)
2. Πλύση με 1 ml PBS σε κάθε well
3. Προσθήκη σε falcon των 50 ml: 50 ml θρεπτικό όχι πλήρες (δηλαδή χωρίς το FBS και τα αντιβιοτικά) και 1,5 μL H_2O_2 , και ανάδευση του περιεχομένου
4. Προσθήκη 2 ml από το διάλυμα του falcon σε κάθε well, τόσο ώστε να καλύπτεται ο πάτος του (Δε γίνεται προσθήκη στο πηγαδάκι NT)
5. Σήμανση στο 6-well plate για κάθε well: NT, 0h, 1h, 6h, 24h (όπου h=hours) (Εικόνα 12)
6. Τοποθέτηση του 6-well plate στον κλίβανο για 30 λεπτά, που αποτελεί το χρόνο επίδρασης του H_2O_2
7. Μετά το πέρας του χρόνου, απομάκρυνση του διαλύματος H_2O_2
8. Πλύση δύο-τρεις φορές με 1 ml PBS
9. Μεταφορά καλυπτρίδων της 0h σε νέο αποστειρωμένο 6-well plate για τη διαδικασία της μονιμοποίησης
10. Προσθήκη στα υπόλοιπα wells νέο πλήρες θρεπτικό από 2 ml
11. Χρονομέτρηση χρόνου ανάκαμψης για 1h, 6h και 24h
12. Μετά το πέρας της 1h, επανάληψη διαδικασίας μονιμοποίησης



Εικόνα 12: Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στο 6-well plate που χρησιμοποιήθηκε για τις επιδράσεις με το H_2O_2 . Οι συνθήκες αφορούν το χρόνο ανάκαμψης μετά τη προσθήκη και απομάκρυνση του H_2O_2 για 0h, 1h, 6h, 24h καθώς και το NT (No Treatment) στο οποίο δεν έγινε κάποια επίδραση.

Μονιμοποίηση κυττάρων

1. Πλύση με 1 ml στα wells που περιέχουν τις καλυπτρίδες
2. Προσθήκη 300 μ L μεθανόλης (η οποία αποθηκεύεται στους -20°C) σε κάθε well
3. Μεταφορά του 6-well plate στους -20°C για >10 λεπτά
4. Αφαίρεση μεθανόλης
5. Πλύση με 1 ml PBS και καλή απομάκρυνση του
6. Κάλυψη του 6-well plate με αλουμινόχαρτο και αποθήκευση στους -20°C μέχρι τη στιγμή του ανοσοφθορισμού

Ανοσοφθορισμός

Διαλύματα

- A. 1% Triton-X-100 σε PBS
- B. 0,02% Tween20 σε PBS
- Γ. 0,02% Tween20 σε PBS και 1% BSA

Διαδικασία

1. Τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με 1 ml PBS χωρίς ανάδευση στα wells
2. Προσθήκη 50 μ L στα wells από το διάλυμα Α και παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Πλύση με 1 ml από το διάλυμα Β για 5 λεπτά
4. Blocking (δέσμευση με την αλβουμίνη των μη ειδικών θέσεων, ώστε τα αντισώματα να προσδεθούν μόνο στις ειδικές θέσεις) με 1 ml από το διάλυμα Γ για 10 λεπτά και επακόλουθη απομάκρυνση του
5. Προσθήκη 50 μ L του πρωτοταγούς αντισώματος για 60 λεπτά και επακόλουθη απομάκρυνση του
6. Πλύση με 1 ml από το διάλυμα Β για 5 λεπτά σε rocking platform shaker
7. Προσθήκη 50 μ L του δευτεροταγούς αντισώματος για 45 – 60 λεπτά στο σκοτάδι
8. Πλύση 1 ml με το διάλυμα Β για 5 λεπτά σε rocking platform shaker
9. Πλύση με σκέτο PBS για 5 λεπτά σε rocking platform shaker
10. Απομάκρυνση των καλυπτρίδων από το 6-well plate και στέγνωμα αυτών
11. Προσθήκη 10 μ L χρωστικής DAPI στη καλυπτρίδα
12. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων ανάποδα σε αντικειμενοφόρες πλάκες
13. Σφράγιση των άκρων
14. Αποθήκευση των αντικειμενοφόρων πλακών στους 4°C στο σκοτάδι

6.5 Επίδραση στα κύτταρα με H₂O₂ σε 6-well plates και απομόνωση πρωτεϊνών

Προετοιμασία (Σε συνθήκες εκτός θαλάμου καθετού νηματικής ροής)

1. Προσθήκη 2 ml θρεπτικού και 3×10^5 κύτταρα σε κάθε well
2. Επιστροφή του 6-well plate στον κλίβανο, ώστε τα κύτταρα να είναι έτοιμα για τον ανοσοφθορισμό την επόμενη ημέρα

Επιδράσεις

1. Αφαίρεση του θρεπτικού από το 6-well plate, εκτός από το πρώτο well που έχει το NT (No Treatment)
2. Πλύση με 1 ml PBS σε κάθε well
3. Προσθήκη σε falcon των 50 ml: 50 ml θρεπτικό όχι πλήρες (δηλαδή χωρίς το FBS και τα αντιβιοτικά) και 1,5 mL H₂O₂, και ανάδευση του περιεχομένου
2. Προσθήκη 2 ml από το διάλυμα του falcon σε κάθε well, τόσο ώστε να καλύπτεται ο πάτος του (Δε γίνεται προσθήκη στο πηγαδάκι NT)
3. Σήμανση στο 6-well plate για κάθε well: NT, 0h, 1h, 6h (όπου h=hours) (Εικόνα)
4. Τοποθέτηση του 6-well plate στον κλίβανο για 30 λεπτά, που αποτελεί το χρόνο επίδρασης του H₂O₂
5. Μετά το πέρας του χρόνου, απομάκρυνση του διαλύματος H₂O₂
6. Πλύση δύο-τρεις φορές με 1 ml PBS
7. Απομόνωση των πρωτεϊνών από το well 0h
8. Προσθήκη στα υπόλοιπα wells νέο πλήρες θρεπτικό από 2 ml
9. Χρονομέτρηση χρόνου ανάκαμψης για 1h και 6h
10. Μετά το πέρας της 1h, επανάληψη διαδικασίας απομόνωσης των πρωτεϊνών

Υλικά για την απομόνωση των πρωτεϊνών

1. Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων (Lysis buffer)
 - A. 30 mM Tris (Invitrogen)
 - B. 10% Glycerol (Invitrogen)
 - Γ. 150 mM NaCl (Sharlau)
 - Δ. 1% NP40 (Ambion)
2. Αναστολείς πρωτεασών

Απομόνωση των πρωτεϊνών

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τα wells του 6-well plate
2. Πλύση των κυττάρων δύο φορές με 2 ml PBS σε κάθε well
3. Τοποθέτηση του 6-well plate στον πάγο
4. Προσθήκη 100 μ L από το Lysis Buffer (στο οποίο προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών σε αναλογία 1:7) για κάθε 10^6 κύτταρα σε κάθε well και vortex
5. Επώαση στο πάγο για 5 λεπτά
6. Επανάληψη vortex κάθε 5 λεπτά για συνολικό χρόνο 30 – 40 λεπτά
7. Μεταφορά των περιεχομένων των well σε Eppendorf tubes
8. Φυγοκέντρηση των Eppendorf tube για 15 λεπτά στις 13000 rpm στους 4 °C
9. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέο Eppendorf tube
10. Αποθήκευση του Eppendorf tube στους -20°C

6.6 Μέθοδος Bradford - Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι άγνωστες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Έγινε χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία όταν προσδεθεί σε μια πρωτεΐνη, μεταβάλλει το μέγιστο απορρόφησης της από 460 nm στα 595 nm. Με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίζοντας τις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών γνωστής συγκέντρωσης και με την επακόλουθη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, είναι δυνατό να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Αυτό γίνεται μέσω προσδιορισμού της απορρόφησης που προκύπτει από τα 5 μ L της άγνωστης πρωτεΐνης τα οποία είναι διαλυμένα σε 495 μ L διαλύματος Bradford (5%). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μέθοδο είναι της εταιρίας Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ήταν η εξής:

1. Ποσότητες αλβουμίνης του ορού του βοός (Bovine Serum Albumin- BSA) από 1 μ g έως 20 μ g, διαλύθηκαν σε 800 μ L ddH₂O
2. Προσθήκη 200 μ L χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε κάθε δείγμα
3. Επώαση μείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Ήπια ανάδευση των δειγμάτων αρκετές φορές
5. Μεταφορά των δειγμάτων σε 96-well plate
6. Φωτομέτρηση στα 595 nm
7. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

6.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS – PAGE)

Η τεχνική SDS – PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, αλλά και άλλων μακρομορίων όπως DNA και RNA, με βάση αποκλειστικά το μοριακό τους βάρος, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Καθώς το μείγμα πρωτεϊνών που «τρέχει» σε μια πηκτή περιέχει πρωτεΐνες διαφορετικών διαμορφώσεων, χρησιμοποιείται ο αποδιατακτικός παράγοντας SDS ώστε αυτές να αποκτήσουν μια γραμμική διαμόρφωση, δηλαδή να είναι στη πρωτοταγή τους δομή. Επιπλέον αυτός ο παράγοντας προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα όλες να είναι αρνητικά φορτισμένες και να μη διαφοροποιούνται με βάση το συνολικό τους φορτίο. Έτσι με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στη πηκτή, όλες οι πρωτεΐνες θα κατευθυνθούν προς το θετικό πόλο. Η πηκτή που αποτελείται από πολυμερή ακρυλαμιδίου δημιουργεί πόρους που επιτρέπουν τη διέλευση των πρωτεϊνών δια μέσω αυτών. Πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος θα κινηθούν ταχύτερα συγκριτικά με πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους και συνεπώς θα βρίσκονται πιο καθοδικά στη πηκτή και άρα εγγύτερα στο θετικό πόλο της συσκευής. Η ταχύτητα (U) με την οποία μετακινείται μια πρωτεΐνη στη πηκτή πολυακρυλαμιδίου εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E) που εφαρμόζεται σε αυτή, από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και από το συντελεστή τριβής (f). Αυτές οι μεταβλητές συνδέονται με την ακόλουθη σχέση:

$$U = E z / f$$

6.7.1 Υλικά για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών

1. Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer, Invitrogen)
2. Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer, Invitrogen)
3. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS (NuPage Novex Tris – Acetate Mini Gels, Invitrogen)
4. Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific)
5. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer, Invitrogen)
6. Δις απεσταγμένο H₂O (DEMO_{S.A.})

6.7.2 Αποδιάταξη πρωτεϊνών

Πριν γίνει ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot), πραγματοποιείται αποδιάταξη ώστε να γίνει διαχωρισμός αυτών με ηλεκτροφόρηση. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 μgr.

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών περιείχε:

1. ddH₂O: x μL, ώστε V_{τελ} = 20 μL
2. Πρωτεΐνη : y μL
3. Sample buffer 6x (Reducing buffer και Loading Buffer) : 4 μL

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή, για να γίνει αποδιάταξη των πρωτεϊνών, στους 95° C για 5-10 λεπτά

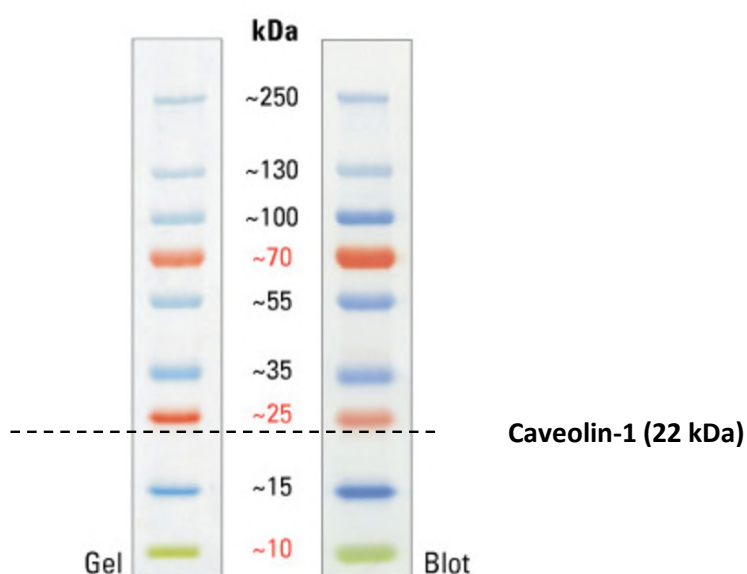
6.7.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για την κατασκευή ενός gel πολυακρυλαμίδιου ακολουθήθηκε η εξής σύσταση αντιδραστηρίων:

Πίνακας 1: Για το separating gel (12% final concentration of acrylamide):	
30% acrylamide/0,8% bisacrylamide	2 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	1,25 ml
H ₂ O	1,75 ml
10% (w/v) ammonium persulfate	0,017 ml
TEMED	0,003 ml

Πίνακας 2: Για το stacking gel (3,9% acrylamide):	
30% acrylamide/0,8% bisacrylamide	0,65 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 6.8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
10% (w/v) ammonium persulfate	25 µL
TEMED	5 µL

Ο ladder (μάρτυρας με γνωστά μοριακά βάρη πρωτεϊνών) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa) της Thermo Fisher Scientific™ (Εικόνα 13). Ως loading control χρησιμοποιήθηκαν η GAPDH και η β-actin.



Εικόνα 13: Στον PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, εμφανίζονται οι ζώνες με μοριακό βάρος από 10 έως 250 kDa. Για την caveolin-1 περιμένουμε να εμφανιστεί μια ζώνη στα 22 kDa περίπου, για τη GAPDH στα 36 kDa και για τη β-actin στα 42 kDa (Thermo Fisher Scientific, n.d.)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ήταν η εξής:

1. Στήσιμο της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad)
2. Προσθήκη 600 ml (50 ml Running buffer σε 950 ml ddH₂O) στο μπροστινό και στο οπίσθιο μέρος της συσκευής. Στο μεσαίο τμήμα της συσκευής προστίθενται 200 ml Running buffer
3. Φόρτωση των δειγμάτων στη πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Συγκεκριμένα, στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνεται ο ladder
4. Ενεργοποίηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης στα 70 Volt για 15 λεπτά και στη συνέχεια στα 180 Volt για 40 λεπτά

6.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Στόχος της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών είναι η οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Προκειμένου να γίνει αυτό, απαιτείται η χρήση ενός αντισώματος που θα αναγνωρίζει την υπό μελέτη πρωτεΐνη και θα προσδεθεί σε αυτήν. Στη συνέχεια προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα φέρει το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP), το οποίο έπειτα από αυτοραδιογραφία, δημιουργεί σκοτεινές γραμμές σε film ακτινών X οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε πάνω σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene difluoride), η επιφάνεια της οποίας συμβάλει στη σύνδεση των αντισωμάτων με την υπό μελέτη πρωτεΐνη.

6.8.1 Υλικά για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών

1. Transfer buffer (διάλυμα μεταφοράς) (1000 ml)
 - A. 100 ml 5% Transfer buffer 10x (NuPage Transfer buffer, Invitrogen)
 - B. 200 ml 1% Μεθανόλη (Applichem)
 - Γ. 700 ml H₂O
2. Χαρτί Whitman
3. Μεμβράνη PVDF
4. Χρωστική μεμβράνης
5. Διάλυμα πλύσης (TBT-T)
 - A. 100 ml TBS 10x
 - B. 900 ml H₂O
 - Γ. 1 ml Tween20
6. Σκόνη μπλοκαρίσματος
7. Ορός αλβουμίνης βοοειδών (BSA, Invitrogen)
8. Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare, Thermo Scientific)
9. Rabbit polyclonal anti-caveolin-1, 1:500

10. Rabbit monoclonal anti-actin, 1:3000
11. Goat anti-rabbit HRP, 1:10000, #196832 (Thermo Scientific)

6.8.2 Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

Προκειμένου να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από τη πηκτή στη μεμβράνη, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Trans-Blot Wet Transfer Cell (Bio-Rad). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης PVDF σε διάλυμα μεθανόλης για 15 λεπτά προκειμένου να ενεργοποιηθεί
2. Έπειτα από την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών, επάζονται στο Transfer buffer για 20 λεπτά η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, τα δύο χαρτάκια Whitman, η μεμβράνη PVDF και τα σφουγγαράκια
3. Στήνεται το “sandwich” και τα υλικά τοποθετούνται με την εξής σειρά: σφουγγαράκι, χαρτάκι Whitman, μεμβράνη PVDF, χαρτάκι Whitman, σφουγγαράκι
4. Μεταφορά του “sandwich” στη συσκευή και ενεργοποίηση αυτής στα 400 mA για 90 λεπτά
5. Μετά το πέρας του χρόνου, γίνεται προσεκτική αποσυναρμολόγηση του “sandwich”, ώστε η μεμβράνη PVDF να παραμείνει άθικτη. Γίνεται χρώση της μεμβράνης με Ponceau προκειμένου να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Περιμένουμε να δούμε μια μπάντα στα 22 kDa για τη πρωτεΐνη caveolin-1. Επιπλέον γίνεται και χρώση της πηκτής με Coomassie για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών από τη πηκτή στη μεμβράνη
6. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 φορές) υπό ανάδευση
7. Μεταφορά της μεμβράνης σε blocking solution (διάλυμα 5% σκόνη μπλοκαρίσματος σε TBS-T) υπό ανάδευση για 60 λεπτά
8. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 φορές) υπό ανάδευση
9. Επώαση της μεμβράνης με το 1^ο αντίσωμα (σε διάλυμα blocking BSA, 1:500) στους 4°C υπό ανάδευση ολονύκτια. Το αντίσωμα έχει διαλυθεί πρώτα σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5%.
10. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 φορές) υπό ανάδευση
11. Επώαση της μεμβράνης με το 2^ο αντίσωμα (σε διάλυμα 5% σκόνη μπλοκαρίσματος σε TBS-T) για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση
12. Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά (3 φορές) υπό ανάδευση

Έπειτα ακολουθεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων μέσω αυτοραδιογραφίας, προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση των επιπέδων της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης PVDF σε ενισχυτικό σήματος ECL (peroxide και luminol) για 3 λεπτά (Το ECL είναι ένα μη ραδιενεργό υπόστρωμα βασιζόμενο στο luminol, το οποίο ανιχνεύει το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP). Συγκεκριμένα το HRP διαμεσολαβεί στην οξείδωση του αντιδραστηρίου luminol παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου με αποτέλεσμα να παράγεται ένα ιριδίζον φως κατά τη μετατροπή της χημικής ενέργειας σε φωτεινή).

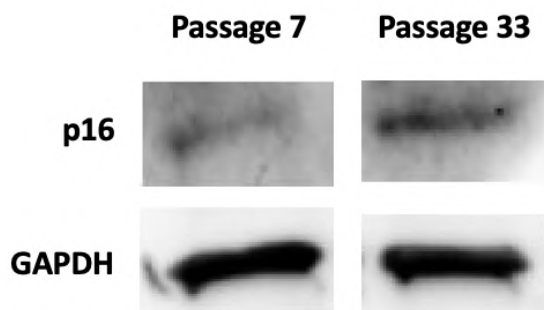
2. Απομάκρυνση του ενισχυτικού με διηθητικό χαρτί
3. Μεταφορά της μεμβράνης PVDF σε ειδικό μηχάνημα (UVITEC Alliance), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή
4. «Τρέξιμο» του ανάλογου προγράμματος από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή και αναγνώριση του σήματος των ζωνών της πρωτεΐνης
5. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης μέσω του προγράμματος IMAGE J

7. Αποτελέσματα

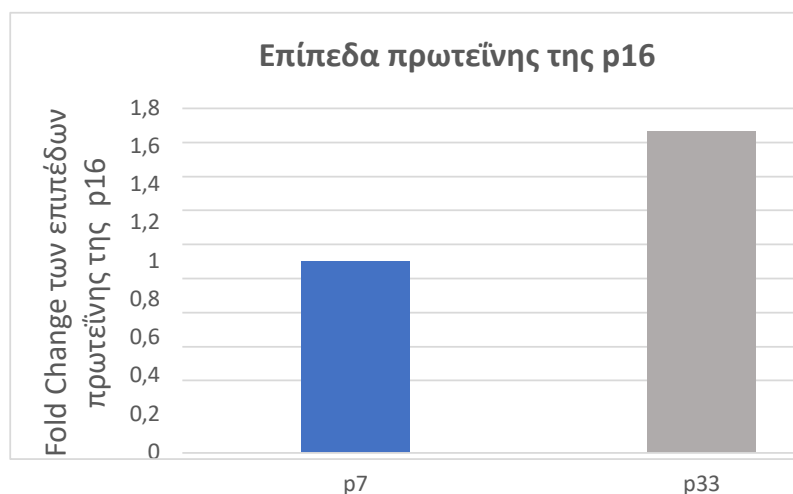
7.1 Βιοδείκτες για την ένδειξη κυτταρικής γήρανσης

Προκειμένου να μπορούμε να συγκρίνουμε τα επίπεδα της Caveolin-1 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα WJ-hMSC, πρέπει να επιβεβαιωθεί ότι έχουμε ενδείξεις κυτταρικής γήρανσης σε ανακαλλιέργεια κυττάρων η οποία έχει υποστεί περισσότερα population doublings. Συγκεκριμένα, στο passage 33 (p33) χρησιμοποιήθηκαν δύο βιοδείκτες. Πρώτον, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης της p16 με ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με την βοήθεια ειδικού λογισμικού (UVITEC alliance) και του προγράμματος IMAGE J, και δεύτερον πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με X-gal για να προσδιοριστεί η δραστικότητα της SA-β-gal. Με αυτό το τρόπο, παρατηρήθηκε ότι αρκετά κύτταρα στο p33 είχαν γεράσει.

Συγκεκριμένα, στην ανοσοαποτύπωση κατά Western ως control χρησιμοποιήθηκε η GAPDH (Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης) γνωστό «housekeeping» γονίδιο. Δηλαδή είναι ένα γονίδιο βασικής κυτταρικής λειτουργίας που εκφράζεται ιδιосύστατα. Η GAPDH χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των επιπέδων της υπό μελέτης πρωτεΐνης, δηλαδή της caveolin-1, καθώς τα επίπεδα της δε μεταβάλλονται ιδιαίτερα σε πληθυσμό κυττάρων ενός ιστού και ουσιαστικά επιβεβαιώνει ότι έχουν φορτωθεί ίσες ποσότητες των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής.



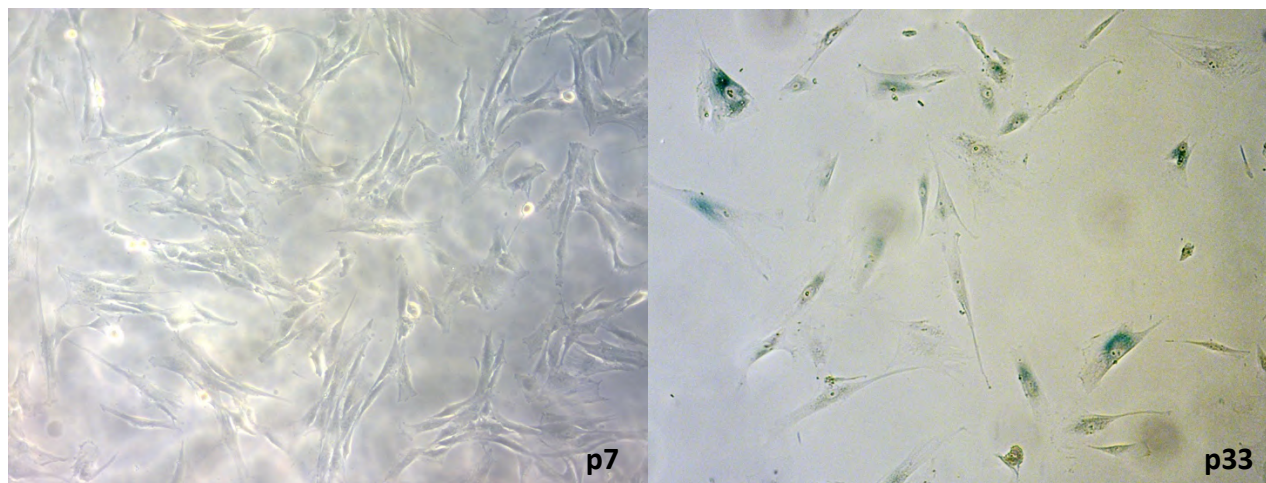
Εικόνα 14. Western blot για τη πρωτεΐνη p16 και το control GAPDH



Διάγραμμα 1. Τα επίπεδα πρωτεΐνης της p16 στα passages 7 και 33.

Παρατηρούμε έπειτα από τη ποσοτικοποίηση των ζωνών με το πρόγραμμα IMAGE J, ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης p16 είναι αυξημένα στο p33 συγκριτικά με το p7.

Η χρώση X-gal που ακολούθησε για τα κύτταρα σε passage 7 και passage 33 συμφωνεί με την αύξηση των επιπέδων της p16 καθώς τα κύτταρα εμφανίζονται γηρασμένα (μπλε) κατά ποσοστό περίπου 50% (Εικόνα 15).

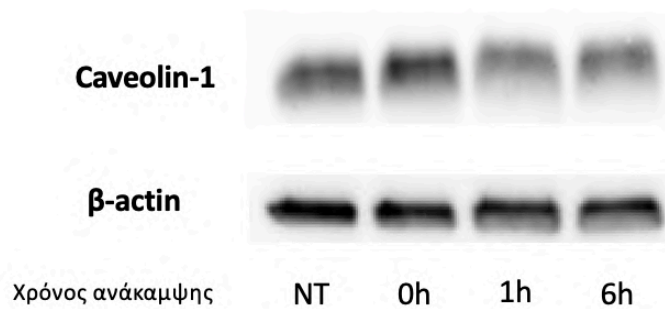


Εικόνα 15: Χρώση κυττάρων σε p7 και p33 με υπόστρωμα X-gal. Παρατήρηση δραστηριότητας SA-β-gal σε ποσοστό 50%.

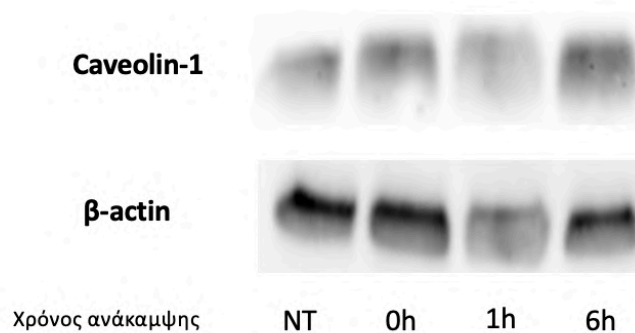
Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p16 και η εμφάνιση μπλε χρωματισμένων κυττάρων με τη χρώση SA-β-gal στο p33 υποδηλώνει την είσοδο των κυττάρων αυτών σε κυτταρική γήρανση.

7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων πρωτεΐνης της Caveolin-1 έπειτα από επίδραση με H_2O_2

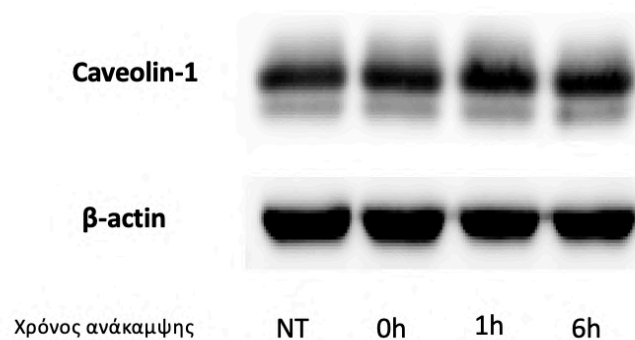
Σε κύτταρα WJ-MSCs p7, p15 και p33 πραγματοποιήθηκε επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) για μισή ώρα (300 μ M, 30 min) ώστε να προκληθεί εξωγενές οξειδωτικό στρες. Έπειτα ακολούθησε ανάκαμψη αυτών για 1h και 6h. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών των κυττάρων και προσδιορίστηκαν μέσω Western Blot τα επίπεδα πρωτεΐνης της Cav-1 Right After, δηλαδή στη χρονική στιγμή 0h, καθώς και στα διαφορετικά διαστήματα ανάκαμψης (1h, 6h). Με ειδικό λογισμικό λήφθηκε φωτογραφία των ζωνών (UVITEC alliance) (Εικόνες 16, 17, 18 για τα passages 7, 15, 33 αντίστοιχα) και έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών με το πρόγραμμα IMAGE J. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά στάδια ανακαλλιεργειών (passages), ώστε να παρατηρηθεί πώς μεταβάλλεται η συμπεριφορά της caveolin-1 σε κύτταρα σε διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξης τους. Ως control γονίδιο χρησιμοποιήθηκε η β -actin.



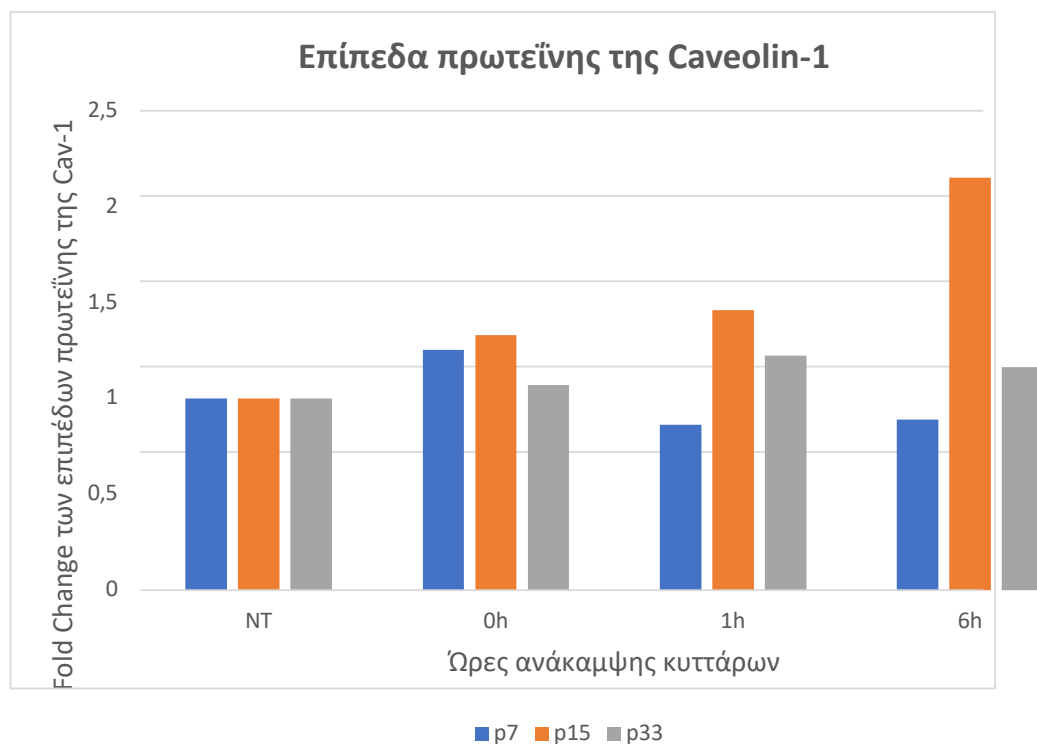
Εικόνα 16: Western blot για τη caveolin-1 και το control β-actin στο **Passage 7**



Εικόνα 17: Western blot για τη caveolin-1 και το control β-actin στο **Passage 15**



Εικόνα 18: Western blot για τη caveolin-1 και το control β-actin στο **Passage 33**

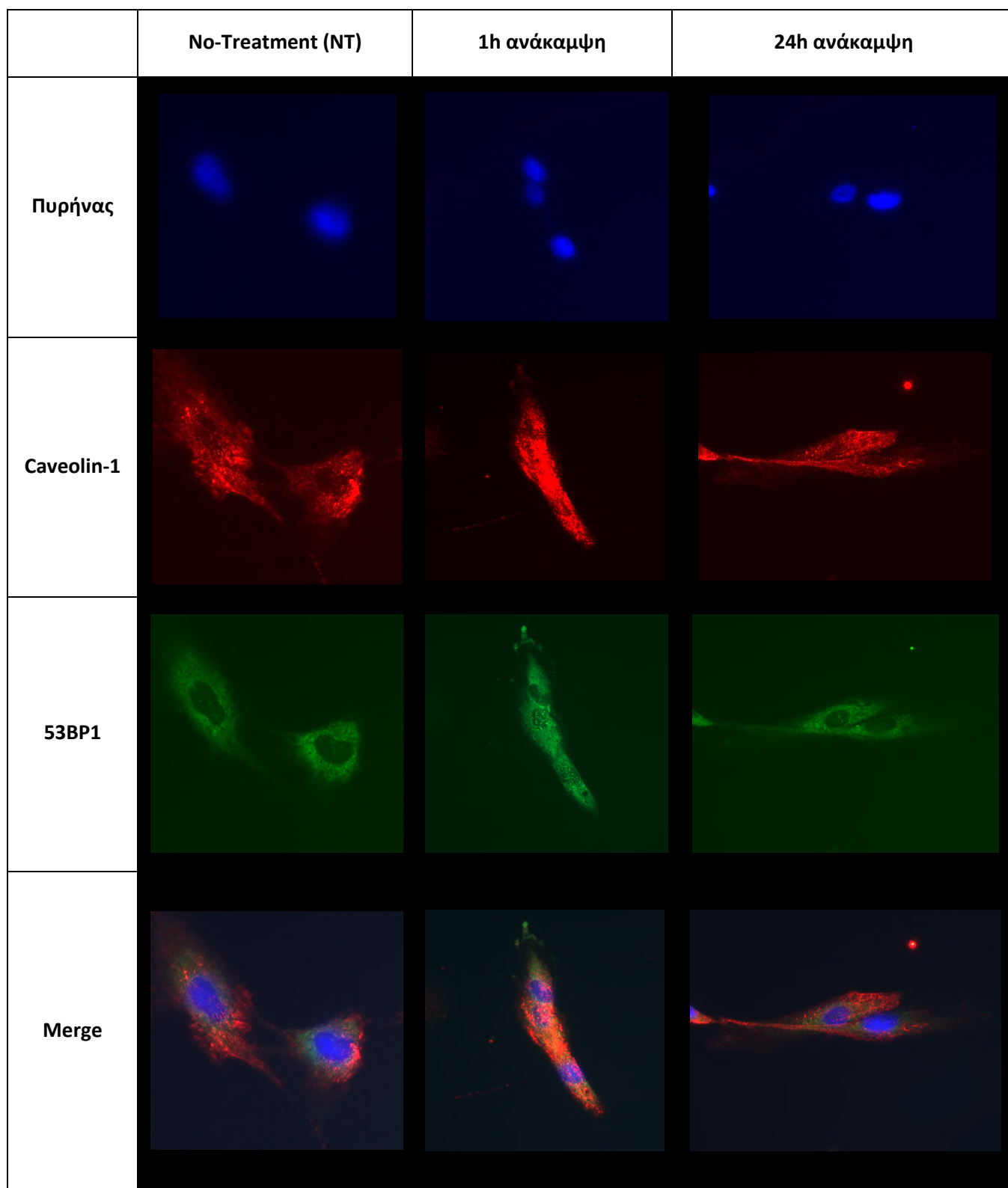


Διάγραμμα 2: Τα επίπεδα της πρωτεΐνης caveolin-1 στα passages 7, 15 και 33. Ο χ άξονας περιγράφει τις ώρες ανάκαμψης των κυττάρων έπειτα από επαγωγή H_2O_2 σε αυτά, ενώ ο γ άξονας περιγράφει το fold change των επιπέδων πρωτεΐνης της Cav-1 σε αυτές τις συνθήκες. Όπου NT: No-Treatment.

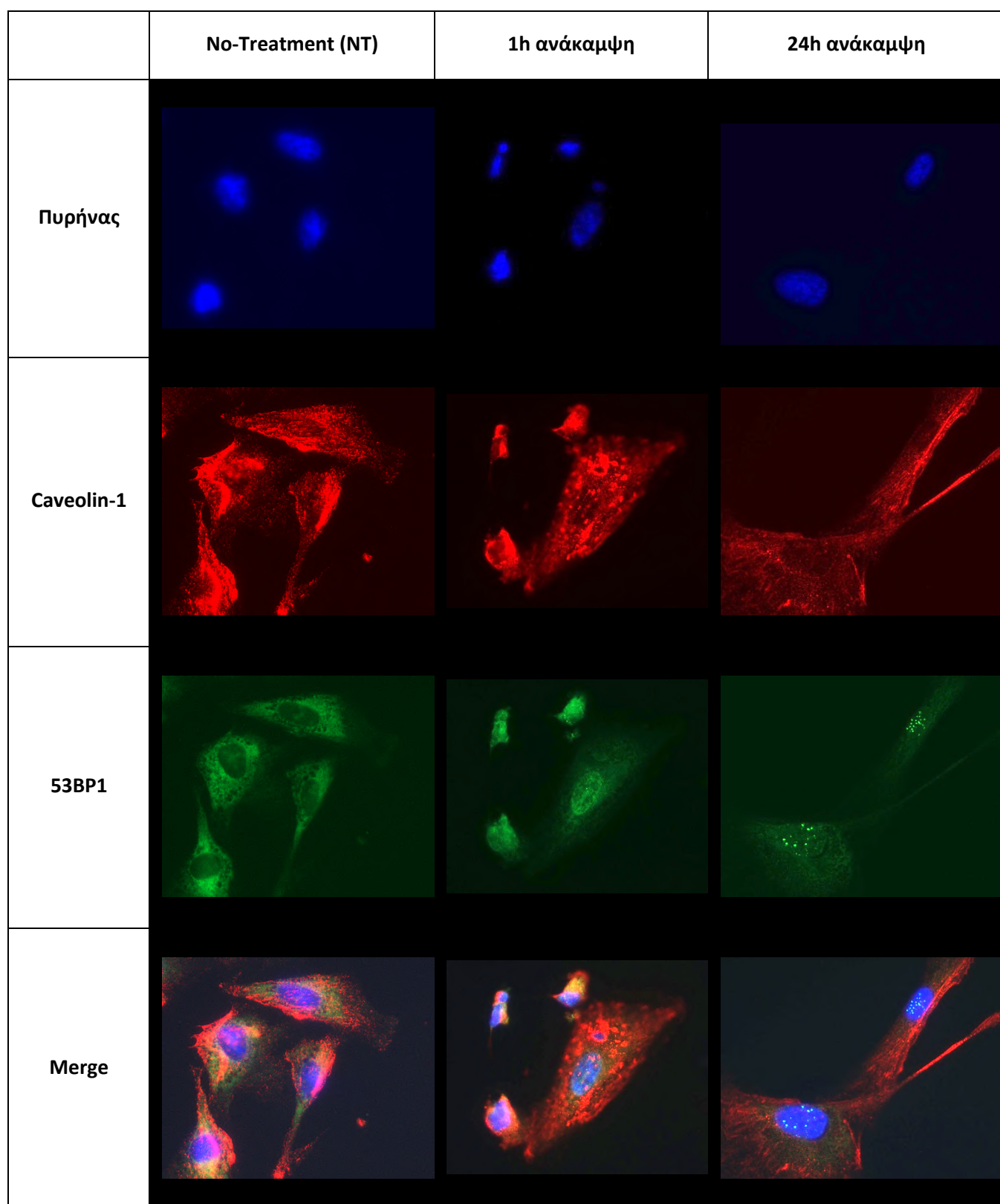
Όπως παρατηρούμε στο Διάγραμμα 2, μετά την επίδραση με H_2O_2 παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης της Caveolin-1 και στα τρία passages. Ωστόσο, αυτή η αύξηση στα νεαρά κύτταρα (p7) συμβαίνει άμεσα, δηλαδή την χρονική στιγμή 0h, και ακολουθείται από μείωση στα αρχικά της επίπεδα μετά από 1h ανάκαμψης, ενώ στα μεγαλύτερα passages (p15 και p33) καθυστερεί να αυξηθεί και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα ακόμη και έπειτα από 6 ώρες ανάκαμψης.

7.3 Ανοσοφθορισμός

Προκειμένου να μελετηθεί πώς συμπεριφέρεται η Cav-1 και πού βρίσκεται υποκυτταρικά έπειτα από πρόκληση οξειδωτικού στρες, πραγματοποιήθηκαν ομοίως επιδράσεις σε WJ-MSCs, με H_2O_2 για μισή ώρα (300 μM , 30 min) στα passages 7 και 16 και ακολούθησε το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού που περιγράφεται στην παράγραφο 6.4. Με DAPI έχει γίνει η χρώση του πυρήνα, ενώ η Cav-1 ανιχνεύτηκε μέσω ειδικού αντισώματος και δευτερογενούς αντισώματος που εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα. Προκειμένου να γίνει ανίχνευση των θραύσεων στο DNA χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα εναντίον της πρωτεΐνης 53BP1 - η οποία αποτελεί δείκτη για τις ρήξεις στη διπλή έλικα του DNA - και ειδικό δευτερογενές αντίσωμα που εμφανίζεται με πράσινο (Εικόνες 19 και 20).



Εικόνα 19: Ανοσοφθορισμός για το passage 7



Εικόνα 20: Ανοσοφθορισμός για το passage 16

Συγκρίνοντας τις εικόνες, που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο φθορισμού, για το passage 7 και για το passage 16 παρατηρούμε κάποιες σημαντικές διαφορές. Αρχικά, υπό κανονικές συνθήκες (No Treatment), στα νεαρά κύτταρα, η Caveolin-1 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και στην πλασματική μεμβράνη, ενώ στα μεγαλύτερα κύτταρα εντοπίζεται και στον πυρήνα του κυττάρου. Επιπλέον, έπειτα από μία ώρα (1h ανάκαμψη), η Caveolin-1 στα νεαρά κύτταρα εμφανίζεται μετατοπισμένη στον πυρήνα. Στη συνέχεια ύστερα από 24 ώρες ανάκαμψης επιστρέφει στον αρχικό της εντοπισμό ενώ παρατηρείται ότι έχουν αποκατασταθεί και οι ρήξεις του DNA. Αντίθετα, στα μεγαλύτερα κύτταρα (passage 16), πέρα του ότι δεν παρατηρείται η μετατόπιση της Caveolin-1, φαίνεται να μην έχουν αποκατασταθεί οι βλάβες ούτε και έπειτα από 24h ανάκαμψης.

Τέλος, έπειτα από καταμέτρηση των στιγμάτων (dots), που αντιπροσωπεύουν τη 53BP1, από τις φωτογραφίες που λήφθηκαν από τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, διαπιστώθηκε ότι το 50% των κυττάρων έπειτα από 24h ανάκαμψης από το H₂O₂ στο passage 7 φέρουν κατά μέσο όρο 3 dots ενώ το 100% των κυττάρων στο passage 16 φέρουν κατά μέσο όρο 10 dots. Συμπερασματικά, μπορούμε να καταλάβουμε ότι τα κύτταρα στο passage 16 φέρουν πολύ περισσότερες ρήξεις συγκριτικά με τα πιο νεαρά κύτταρα (passage 7) και αυτό ίσως αποτελεί σημάδι ότι το οξειδωτικό στρες και συγκεκριμένα το υπεροξείδιο του υδρογόνου δημιουργεί βλάβες στον ίδιο βαθμό σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα αλλά αυτές δεν φαίνεται να μπορούν να επιδιορθωθούν από τα γηρασμένα, όπως παλιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν άλλωστε δείξει (Trachana et al., 2017).

8. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση και συμπεριφορά της Caveolin-1 έπειτα από την επίδραση εξωγενούς οξειδωτικού στρες σε νεαρά και γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Παρατηρήθηκε διαφορετική απόκριση των νεαρών κυττάρων και γηρασμένων κυττάρων στο οξειδωτικό στρες αναφορικά με την αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης της Caveolin-1. Συγκεκριμένα, στα νεαρά κύτταρα η αύξηση αυτή συμβαίνει αμέσως μετά την απομάκρυνση του H_2O_2 , δηλαδή τη χρονική στιγμή 0h, ενώ στα μεγαλύτερα passages (p15, p33) η αύξηση αυτή παρατηρείται σε επόμενες ώρες ανάκαμψης (1 ώρα και 6 ώρες). Στο passage 15, μετά την επώαση των κυττάρων με H_2O_2 , τα επίπεδα της Cav-1 αυξάνονται σταδιακά και η μεγαλύτερη μεταβολή παρατηρείται στις 6 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων. Την ίδια πορεία ακολουθούν και τα επίπεδα της Cav-1 για το passage 33, τα οποία ωστόσο δε μεταβάλλονται ιδιαίτερα. Επιπλέον, στις εικόνες που λάβαμε από το μικροσκόπιο παρατηρούμε διαφορές στη συμπεριφορά της Caveolin-1 έπειτα από την επίδραση των κυττάρων με H_2O_2 . Συγκεκριμένα στα νεαρά κύτταρα (p7) η Caveolin-1 εμφανίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ στα μεγαλύτερα κύτταρα (p16) εμφανίζεται και στον πυρήνα του κυττάρου. Έπειτα από μια ώρα ανάκαμψης, στα νεαρά κύτταρα, η Caveolin-1 μετατοπίζεται στο πυρήνα ενώ παράλληλα παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης 53BP1. Η πρωτεΐνη 53BP1, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί δείκτη για τις ρήξεις στη διπλή έλικα του DNA καθώς είναι από τα πρώτα μόρια που στρατολογούνται όταν το DNA υποστεί ρήξεις, και συμμετέχει στην απόκριση στις βλάβες του DNA, προάγοντας τον επιδιορθωτικό μηχανισμό του Nonhomologous End-joining (NHEJ). Έπειτα από 24 ώρες ανάκαμψης των κυττάρων του passage 7φ, τα στίγματα αυτά έχουν μειωθεί σε αριθμό και η Caveolin-1 έχει επιστρέψει στον αρχικό της εντοπισμό. Αντιθέτως, στα κύτταρα στο passage 16, η caveolin-1 εντοπίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στον πυρήνα στη No-Treatment συνθήκη και διατηρεί αυτόν τον υποκυτταρικό εντοπισμό σε όλα χρονικά σημεία μετά την επίδραση της οξειδωτικής προσβολής. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης 53BP1 παρατηρούνται εμφανώς αυξημένα και μετά από 24 ώρες ανάκαμψης, καθώς δεν έχει μειωθεί ο αριθμός των στιγμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει επιδιόρθωση των ρήξεων στο DNA.

Η αδυναμία των γηρασμένων κυττάρων να επιδιορθώσουν τις βλάβες, που είχε διαπιστωθεί και από παλιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας (Trachana et al., 2017), πιθανώς οφείλεται στον λανθασμένο εντοπισμό της Caveolin-1 στα γηρασμένα κύτταρα καθώς και στην αδυναμία τους να αυξήσουν τα επίπεδα της άμεσα ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες και να τα επαναφέρουν στη συνέχεια στα αρχικά επίπεδα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η ρύθμιση της caveolin-1 γίνεται με λανθασμένο τρόπο λόγω του ήδη αυξημένου οξειδωτικού φορτίου των γηρασμένων κυττάρων.

Προηγούμενη μελέτη έδειξε, ότι η Caveolin-1 είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης TIE2 στο πυρήνα του κυττάρου έπειτα από ακτινοβολήση καρκινικών κυττάρων, όπου για πρώτη φορά διαπιστώθηκε και μετακίνηση της πρωτεΐνης αυτής στον πυρήνα του κυττάρου (Hossain et al., 2016). Εφόσον ο TIE2 συμμετέχει στην επιδιόρθωση των ρήξεων του DNA μέσω του μηχανισμού NHEJ, η Caveolin-1 αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή αυτής της διαδικασίας. Οι παρατηρήσεις της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν την αναγκαιότητα της αύξησης των επιπέδων Caveolin-1 ως απόκριση στις βλάβες του DNA καθώς και το σημαντικό ρόλο που παίζει η μετακίνησή της στον πυρήνα για την αποκατάσταση των βλαβών στο DNA που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Συμπερασματικά, θεωρούμε ότι περισσότερες μελέτες πρέπει να γίνουν προκειμένου να διαλευκανθεί απολύτως ο ρόλος της Caveolin-1 στο DDR και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των βλαβών προκειμένου να διαπιστωθεί επακριβώς και η συμβολή της στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης.

9. Βιβλιογραφία

- Agger, K., Cloos, P. A. C., Rudkjær, L., Williams, K., Andersen, G., Christensen, J., & Helin, K. (2009). The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A–ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes & Development*, 23(10), 1171–1176. <https://doi.org/10.1101/gad.510809>
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., & Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13742. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13742>
- Alessandro Peri, & Mario Serio. (2008). Neuroprotective effects of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(5), 251–261. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0071>
- Alison, M. R., Poulson, R., Forbes, S., & Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells. *The Journal of Pathology*, 197(4), 419–423. <https://doi.org/10.1002/path.1187>
- Aravinthan, A. (2015). Cellular senescence: A hitchhiker's guide. *Human Cell*, 28(2), 51–64. <https://doi.org/10.1007/s13577-015-0110-x>
- Atoui, R., & Chiu, R. C. J. (2012). Mesenchymal stromal cells as universal donor cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(10), 1293–1297. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.711307>
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Banfi, A., Bianchi, G., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R., & Quarto, R. (2002). Replicative Aging and Gene Expression in Long-Term Cultures of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Engineering*, 8(6), 901–910. <https://doi.org/10.1089/107632702320934001>
- Barradas, M., Anderton, E., Acosta, J. C., Li, S., Banito, A., Rodriguez-Niedenführ, M., Maertens, G., Banck, M., Zhou, M.-M., Walsh, M. J., Peters, G., & Gil, J. (2009). Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes & Development*, 23(10), 1177–1182. <https://doi.org/10.1101/gad.511109>
- Bartholomew, J. N., Volonte, D., & Galbiati, F. (2009). Caveolin-1 Regulates the Antagonistic Pleiotropic Properties of Cellular Senescence through a Novel Mdm2/p53-Mediated Pathway. *Cancer Research*, 69(7), 2878–2886. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2857>
- Bastiani, M., & Parton, R. G. (2010). Caveolae at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(22), 3831–3836. <https://doi.org/10.1242/jcs.070102>
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L., & Vousden, K. H. (1998). P14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, 395(6698), 124–125. <https://doi.org/10.1038/25867>
- Baxter, M. A., Wynn, R. F., Jowitt, S. N., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J., & Bellantuono, I. (2004). Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. *STEM CELLS*, 22(5), 675–682. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-675>
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>
- Bent, E. H., Gilbert, L. A., & Hemann, M. T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes & Development*, 30(16), 1811–1821. <https://doi.org/10.1101/gad.284851.116>
- Bist, A., Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10693–10698. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10693>
- Blagosklonny, M. V. (2012). Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: Terminology for TOR-driven aging. *Aging*, 4(3), 159–165. <https://doi.org/10.18632/aging.100443>
- Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., & Guarente, L. (2003). Superoxide Dismutase 1

- Knock-down Induces Senescence in Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38966–38969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307146200>
- Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J.-C., Hansen, K. H., & Helin, K. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & Development*, 21(5), 525–530. <https://doi.org/10.1101/gad.415507>
- Bragança, J., Lopes, J. A., Mendes-Silva, L., & Santos, J. M. A. (2019). Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World Journal of Stem Cells*, 11(7), 421–430. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i7.421>
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., & Haynesworth, S. E. (1997). *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. 17.
- Bulloj, A., Leal, M. C., Surace, E. I., Zhang, X., Xu, H., Ledesma, M. D., Castaño, E. M., & Morelli, L. (2008). Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to Abeta and insulin degradation. *Molecular Neurodegeneration*, 3, 22–22. PubMed. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-22>
- Byun, H.-O., Lee, Y.-K., Kim, J.-M., & Yoon, G. (2015). From cell senescence to age-related diseases: Differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Reports*, 48(10), 549–558. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.10.122>
- Campagnoli, C., Roberts, I. A. G., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., & Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396–2402. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2396>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cecchi, C., Rosati, F., Pensalfini, A., Formigli, L., Nosi, D., Liguri, G., Dichiarà, F., Morello, M., Danza, G., Pieraccini, G., Peri, A., Serio, M., & Stefani, M. (2008). Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against Abeta toxicity by increasing membrane cholesterol content. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5B), 1990–2002.
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., & Halazonetis, T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes & Development*, 14(3), 278–288. PubMed.
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., & Nevins, J. R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65(6), 1053–1061. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90557-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90557-F)
- Chen, J.-H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S. E., Williams, G. H., & Hales, C. N. (2004). Loss of Proliferative Capacity and Induction of Senescence in Oxidatively Stressed Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49439–49446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409153200>
- Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4130–4134. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4130>
- Chen, Z., Bakhshi, F. R., Shajahan, A. N., Sharma, T., Mao, M., Trane, A., Bernatchez, P., van Nieuw Amerongen, G. P., Bonini, M. G., Skidgel, R. A., Malik, A. B., & Minshall, R. D. (2012). Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. *Molecular Biology of the Cell*, 23(7), 1388–1398. PubMed. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0811>
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H.-P., Kim, K. T., Jang, I. S., & Park, S. C. (2004). Morphological Adjustment of Senescent Cells by Modulating Caveolin-1 Status. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42270–42278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402352200>
- Cho, Kyung A., Ryu, S. J., Park, J. S., Jang, I. S., Ahn, J. S., Kim, K. T., & Park, S. C. (2003). Senescent Phenotype Can Be Reversed by Reduction of Caveolin Status. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27789–

27795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208105200>

- Cho, S., & Hwang, E. S. (2012). Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Molecules and Cells*, 33(6), 597–604. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-0042-1>
- Choudhury, A., Marks, D. L., Proctor, K. M., Gould, G. W., & Pagano, R. E. (2006). Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface. *Nature Cell Biology*, 8(4), 317–328. <https://doi.org/10.1038/ncb1380>
- Chung, H. Y., Kim, H. J., Kim, K. W., Choi, J. S., & Yu, B. P. (2002). Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscopy Research and Technique*, 59(4), 264–272. <https://doi.org/10.1002/jemt.10203>
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M. P. (2004). Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 84(4), 1341–1379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2003>
- Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., & Lisanti, M. P. (1997). Identification of Peptide and Protein Ligands for the Caveolin-scaffolding Domain: IMPLICATIONS FOR THE INTERACTION OF CAVEOLIN WITH CAVEOLAE-ASSOCIATED PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6525–6533. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6525>
- Cramer, A., Biondi, E., Kuehnle, K., Lütjohann, D., Thelen, K. M., Perga, S., Dotti, C. G., Nitsch, R. M., Ledesma, M. D., & Mohajeri, M. H. (2006). The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo. *The EMBO Journal*, 25(2), 432–443. PubMed. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600938>
- Dai, S.-M., Shan, Z.-Z., Nakamura, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., & Yudoh, K. (2006). 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 & Rheumatism*, 54(3), 818–831. <https://doi.org/10.1002/art.21639>
- Dasari, A., Bartholomew, J. N., Volonte, D., & Galbiati, F. (2006). 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 Research*, 66(22), 10805–10814. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1236>
- de Keizer, P. L. J. (2017). The Fountain of Youth by Targeting Senescent Cells? *Trends in Molecular Medicine*, 23(1), 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.11.006>
- de Magalhães, J. P. (2013). How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(5), 357–365. <https://doi.org/10.1038/nrc3497>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., de Bruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Dietzen, D. J., Hastings, W. R., & Lublin, D. M. (1995). Caveolin Is Palmitoylated on Multiple Cysteine Residues: PALMITOYLATION IS NOT NECESSARY FOR LOCALIZATION OF CAVEOLIN TO CAVEOLAE. *Journal of Biological Chemistry*, 270(12), 6838–6842. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6838>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., & Howard, G. A. (1999). Age-Related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells from Human Vertebral Bone Marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), 1115–1122. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1115>
- Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., Vercamer, C., Hot, D., Pourtier, A., Chevet, E., Abbadie, C., & Pluquet, O. (2016). ATF6α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget*; Vol 7, No 42. <https://www.oncotarget.com/article/11505/text/>
- Dulhunty, A. F., & Franzini-Armstrong, C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *The Journal of*

- Physiology*, 250(3), 513–539. PubMed. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp011068>
- Faggi, F., Chiarelli, N., Colombi, M., Mitola, S., Ronca, R., Madaro, L., Bouche, M., Poliani, P. L., Vezzoli, M., Longhena, F., Monti, E., Salani, B., Maggi, D., Keller, C., & Fanzani, A. (2015). Cavin-1 and Caveolin-1 are both required to support cell proliferation, migration and anchorage-independent cell growth in rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation*, 95(6), 585–602. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.45>
- Farhat, N., Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Villeneuve, L., Mamarbachi, M., Perrault, L. P., Carrier, M., & Thorin, E. (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(11), 761–769. PubMed. <https://doi.org/10.1139/Y08-082>
- Fielding, C. J., Bist, A., & Fielding, P. E. (1997). Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3753–3758. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3753>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Fortier, L. A. (2005). Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>
- Frank, P. G. (2010). Endothelial caveolae and caveolin-1 as key regulators of atherosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 544–546. PubMed. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100247>
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C. M., Herbig, U., Longhese, M. P., & d'Adda di Fagagna, F. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*, 14(4), 355–365. <https://doi.org/10.1038/ncb2466>
- Goetz, J. G., Lajoie, P., Wiseman, S. M., & Nabi, I. R. (2008). Caveolin-1 in tumor progression: The good, the bad and the ugly. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(4), 715–735. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9160-9>
- Graf, G. A., Connell, P. M., van der Westhuyzen, D. R., & Smart, E. J. (1999). The Class B, Type I Scavenger Receptor Promotes the Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesterol Ethers into Caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 12043–12048. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.12043>
- Halleux, C., Sottile, V., Gasser, J. A., & Seuwen, K. (2001). *Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion*. 6.
- Hallstrom, T. C., Mori, S., & Nevins, J. R. (2008). An E2F1-Dependent Gene Expression Program that Determines the Balance between Proliferation and Cell Death. *Cancer Cell*, 13(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.031>
- Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2010). Exploring the caves: Cavins, caveolins and caveolae. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.005>
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C., & Helenius, A. (2010). Biogenesis of Caveolae: Stepwise Assembly of Large Caveolin and Cavin Complexes. *Traffic*, 11(3), 361–382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01023.x>
- Hayes, M., Curley, G., Ansari, B., & Laffey, J. G. (2012). Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Critical Care*, 16(2), 205. <https://doi.org/10.1186/cc10570>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Head, B. P., Peart, J. N., Panneerselvam, M., Yokoyama, T., Pearn, M. L., Niesman, I. R., Bonds, J. A., Schilling, J. M., Miyanochara, A., Headrick, J., Ali, S. S., Roth, D. M., Patel, P. M., & Patel, H. H. (2010). Loss of Caveolin-1 Accelerates Neurodegeneration and Aging. *PLoS ONE*, 5(12), e15697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015697>

- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Ho, C.-C., Kuo, S.-H., Huang, P.-H., Huang, H.-Y., Yang, C.-H., & Yang, P.-C. (2008). Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. *Lung Cancer*, 59(1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.07.024>
- Holz, O., Zühlke, I., Jaksztat, E., Müller, K. C., Welker, L., Nakashima, M., Diemel, K. D., Branscheid, D., Magnussen, H., & Jörres, R. A. (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *European Respiratory Journal*, 24(4), 575. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00143703>
- Hossain, M. B., Shifat, R., Johnson, D. G., Bedford, M. T., Gabrusiewicz, K. R., Cortes-Santiago, N., Luo, X., Lu, Z., Ezhilarasan, R., Sulman, E. P., Jiang, H., Li, S. S. C., Lang, F. F., Tyler, J., Hung, M.-C., Fueyo, J., & Gomez-Manzano, C. (2016). TIE2-mediated tyrosine phosphorylation of H4 regulates DNA damage response by recruiting ABL1. *Science Advances*, 2(4), e1501290. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501290>
- Hossain, M. B., Shifat, R., Li, J., Luo, X., Hess, K. R., Rivera-Molina, Y., Puerta Martinez, F., Jiang, H., Lang, F. F., Hung, M.-C., Fueyo, J., & Gomez-Manzano, C. (2017). TIE2 Associates with Caveolae and Regulates Caveolin-1 To Promote Their Nuclear Translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 37(21), e00142-17, e00142-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00142-17>
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *The Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629. PubMed. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003008>
- Hwa, V., Oh, Y., & Rosenfeld, R. G. (1999). The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily*. *Endocrine Reviews*, 20(6), 761–787. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.6.0382>
- Itahana, K., Dimri, G., & Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53: P53 and cellular senescence. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2784–2791. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02228.x>
- Itoh, K., Tong, K. I., & Yamamoto, M. (2004). Molecular mechanism activating nrf2–keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1208–1213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.075>
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *Journal of Cell Biology*, 202(1), 129–143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Iwasa, H., Han, J., & Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(2), 131–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00620.x>
- Jasmin, J.-F., Frank, P. G., & Lisanti, M. P. (Eds.). (2012). *Caveolins and caveolae: Roles in signaling and disease mechanisms*. Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience.
- Joshi, B., Bastiani, M., Strugnell, S. S., Boscher, C., Parton, R. G., & Nabi, I. R. (2012). Phosphocaveolin-1 is a mechanotransducer that induces caveola biogenesis via Egr1 transcriptional regulation. *The Journal of Cell Biology*, 199(3), 425–435. PubMed. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207089>
- Juven-Gershon, T., & Oren, M. (1999). Mdm2: The ups and downs. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 5(2), 71–83. PubMed.
- Kasper, G., Mao, L., Geissler, S., Draycheva, A., Trippens, J., Kühnisch, J., Tschirschmann, M., Kaspar, K., Perka, C., Duda, G. N., & Klose, J. (2009). Insights into Mesenchymal Stem Cell Aging: Involvement of Antioxidant Defense and Actin Cytoskeleton. *STEM CELLS*, 27(6), 1288–1297. <https://doi.org/10.1002/stem.49>
- Ketteler, J., & Klein, D. (2018). Caveolin-1, cancer and therapy resistance. *International Journal of Cancer*, 143(9), 2092–2104. <https://doi.org/10.1002/ijc.31369>
- Kim, S. R., Park, J. H., Lee, M. E., Park, J. S., Park, S. C., & Han, J. A. (2008). Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner.

- Mechanisms of Ageing and Development*, 129(12), 706–713. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.09.003>
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10711–10716. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10711>
- Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine*, 21, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020>
- Kovtun, O., Tillu, V. A., Ariotti, N., Parton, R. G., & Collins, B. M. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *Journal of Cell Science*, 128(7), 1269. <https://doi.org/10.1242/jcs.167866>
- Kretlow, J. D., Jin, Y.-Q., Liu, W., Zhang, W. J., Hong, T.-H., Zhou, G., Baggett, L. S., Mikos, A. G., & Cao, Y. (2008). Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biology*, 9(1), 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-60>
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- Kurata, S. (2000). Selective Activation of p38 MAPK Cascade and Mitotic Arrest Caused by Low Level Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23413–23416. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000308200>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113(20), 3613.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Lee, H., Woodman, S. E., Engelman, J. A., Volonte', D., Galbiati, F., Kaufman, H. L., Lublin, D. M., & Lisanti, M. P. (2001). Palmitoylation of Caveolin-1 at a Single Site (Cys-156) Controls Its Coupling to the c-Src Tyrosine Kinase: TARGETING OF DUALY ACYLATED MOLECULES (GPI-LINKED, TRANSMEMBRANE, OR CYTOPLASMIC) TO CAVEOLAE EFFECTIVELY UNCOUPLES c-Src AND CAVEOLIN-1 (TYR-14). *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 35150–35158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104530200>
- Lee, H.-J., Kang, K.-S., Kang, S.-Y., Kim, H.-S., Park, S.-J., Lee, S.-Y., Kim, K.-D., Lee, H.-C., Park, J.-K., Paik, W.-Y., Lee, L., & Yeon, S.-C. (2016). Immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *J Vet Sci*, 17(3), 289–297.
- Lee, J., & Schmid-Schönbein, G. W. (1995). Biomechanics of skeletal muscle capillaries: Hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. *Annals of Biomedical Engineering*, 23(3), 226–246. <https://doi.org/10.1007/BF02584425>
- Li, L., Ittmann, M. M., Ayala, G., Tsai, M.-J., Amato, R. J., Wheeler, T. M., Miles, B. J., Kadmon, D., & Thompson, T. C. (2005). The emerging role of the PI3-K-Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 8(2), 108–118. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500776>
- Li, S., Seitz, R., & Lisanti, M. P. (1996). Phosphorylation of Caveolin by Src Tyrosine Kinases: THE α -ISOFORM OF CAVEOLIN IS SELECTIVELY PHOSPHORYLATED BY v-Src *IN VIVO*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3863–3868. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3863>
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 3–32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>
- Liu, J., Ding, Y., Liu, Z., & Liang, X. (2020). Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 258. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>
- Liu, M., Lei, H., Dong, P., Fu, X., Yang, Z., Yang, Y., Ma, J., Liu, X., Cao, Y., & Xiao, R. (2017). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. *Cell Transplantation*, 26(9), 1505–1519.

<https://doi.org/10.1177/0963689717721221>

- Liu, P., Rudick, M., & Anderson, R. G. W. (2002). Multiple Functions of Caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41295–41298. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200020200>
- Lowe, S. W., & Sherr, C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: Progress and puzzles. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(1), 77–83. PubMed. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00013-8)
- Mah, L.-J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>
- Martin, J. A., & Buckwalter, J. A. (2001). Telomere Erosion and Senescence in Human Articular Cartilage Chondrocytes. *The Journals of Gerontology: Series A*, 56(4), B172–B179. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.4.B172>
- Martin, V., Liu, D., Fueyo, J., & Gomez-Manzano, C. (2008). Tie2: A journey from normal angiogenesis to cancer and beyond. *Histology and Histopathology*, 23(6), 773–780. PubMed. <https://doi.org/10.14670/hh-23.773>
- Matsumura, T., Zerrudo, Z., & Hayflick, L. (1979). Senescent Human Diploid Cells in Culture: Survival, DNA Synthesis and Morphology1. *Journal of Gerontology*, 34(3), 328–334. <https://doi.org/10.1093/geronj/34.3.328>
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., & Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10389–10394. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.190030497>
- Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E.-C., Otto, A., & Pfrieder, F. W. (2001). CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science*, 294(5545), 1354. <https://doi.org/10.1126/science.294.5545.1354>
- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor–oncoprotein network. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 462–467. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02166-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02166-7)
- Meek, D. (2004). The p53 response to DNA damage. *DNA Repair*, 3, 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.027>
- Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., & Kurzchalia, T. V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Molecular Biology of the Cell*, 6(7), 911–927. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.7.911>
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P. J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gómez-López, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., & Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*, 354(6315), aaf4445. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4445>
- Müller, K.-C., Welker, L., Paasch, K., Feindt, B., Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., Krug, N., Nakashima, M., Branscheid, D., Magnussen, H., Jörres, R. A., & Holz, O. (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respiratory Research*, 7(1), 32–32. PubMed. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-32>
- Muller, M. (2009). Cellular Senescence: Molecular Mechanisms, In Vivo Significance, and Redox Considerations. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(1), 59–98. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2104>
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell*, 155(5), 1104–1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., & Mimura, A. (2001). Senescence and cytoskeleton: Overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology*, 116(4), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s004180100325>

- Norkin, L. C. (1999). Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunological Reviews*, 168(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01279.x>
- Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A., & Oppenheim, A. (2002). Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of Virology*, 76(10), 5156–5166. PubMed. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.5156-5166.2002>
- Nyunoya, T., Monick, M. M., Klingelutz, A., Yarovsky, T. O., Cagley, J. R., & Hunninghake, G. W. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(6), 681–688. PubMed. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0169OC>
- Pacheco-Rivera, R., Arellanes-Robledo, J., García de León, M. C., Shibayama, M., & Serrano-Luna, J. (2017). The Role of Senescence in Hepatic Diseases. In *Liver Pathophysiology* (pp. 295–308). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00023-0>
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P., & Peters, G. (1997). Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene*, 15(5), 495–503. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201212>
- Panier, S., & Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Parat, M.-O., & Fox, P. L. (2001). Palmitoylation of Caveolin-1 in Endothelial Cells Is Post-translational but Irreversible. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15776–15782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006722200>
- Park, W.-Y., Park, J.-S., Cho, K.-A., Kim, D.-I., Ko, Y.-G., Seo, J.-S., & Park, S. C. (2000). Up-regulation of Caveolin Attenuates Epidermal Growth Factor Signaling in Senescent Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20847–20852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908162199>
- Parrinello, S. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of Cell Science*, 118(3), 485–496. <https://doi.org/10.1242/jcs.01635>
- Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M., & Hancock, J. F. (2006). Biogenesis of caveolae: A structural model for caveolin-induced domain formation. *Journal of Cell Science*, 119(5), 787. <https://doi.org/10.1242/jcs.02853>
- Parton, R. G., & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 185–194. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, 3(5), 473–483. <https://doi.org/10.1038/35074539>
- Pelkmans, L., & Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*, 436(7047), 128–133. <https://doi.org/10.1038/nature03866>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., & Parton, R. G. (2005). Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Trafficking through the Golgi Complex and between the Cell Surface and Lipid Bodies. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 15.
- Poyton, R. O., Ball, K. A., & Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.001>
- Quest, A. F. G., Gutierrez-Pajares, J. L., & Torres, V. A. (2008). Caveolin-1: An ambiguous partner in cell signalling and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(4), 1130–1150. PubMed. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00331.x>
- Rai, P., Onder, T. T., Young, J. J., McFaline, J. L., Pang, B., Dedon, P. C., & Weinberg, R. A. (2009). Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 169–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809834106>
- Rao, S. G., & Jackson, J. G. (2016). SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends in Cancer*, 2(11), 676–

687. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.001>
- Riley, P. A. (1994). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27–33. <https://doi.org/10.1080/09553009414550041>
- Robbins, E., Levine, E. M., & Eagle, H. (1970). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 131(6), 1211–1222. PubMed. <https://doi.org/10.1084/jem.131.6.1211>
- Robles, S. J., & Adami, G. R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 16(9), 1113–1123. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201862>
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis—An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
- Roth, S. (1974). Tissue Culture. Methods and Applications. Paul F. Kruse, Jr., M. K. Patterson, Jr. *The Quarterly Review of Biology*, 49(2), 150–151. <https://doi.org/10.1086/408024>
- Rubin, H. (2002). The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nature Biotechnology*, 20(7), 675–681. <https://doi.org/10.1038/nbt0702-675>
- Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, 24(4), 835–845. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.006>
- Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C., & Lisanti, M. P. (1995). Oligomeric structure of caveolin: Implications for caveolae membrane organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9407–9411. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9407>
- Sart, S., Song, L., & Li, Y. (2015). Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 105135. <https://doi.org/10.1155/2015/105135>
- Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonté, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D. S., van Donselaar, E., Peters, P., & Lisanti, M. P. (1997). Cell-type and Tissue-specific Expression of Caveolin-2: CAVEOLINS 1 AND 2 CO-LOCALIZE AND FORM A STABLE HETERO-OLIGOMERIC COMPLEX IN VIVO. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 29337–29346. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29337>
- Scherer, P. E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H. F., & Lisanti, M. P. (1995). Caveolin Isoforms Differ in Their N-terminal Protein Sequence and Subcellular Distribution. IDENTIFICATION AND EPITOPE MAPPING OF AN ISOFORM-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY PROBE. *Journal of Biological Chemistry*, 270(27), 16395–16401. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.16395>
- Schlegel, A., Arvan, P., & Lisanti, M. P. (2001). 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4398–4408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005448200>
- Shen, W.-J., Azhar, S., & Kraemer, F. B. (2018). SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annual Review of Physiology*, 80(1), 95–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121550>
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2)
- Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Hamanaka, R. B., Goldman, A. E., Lucas, C. A., Shumaker, D. K., Kosak, S. T., Chandel, N. S., & Goldman, R. D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes & Development*, 25(24), 2579–2593. <https://doi.org/10.1101/gad.179515.111>
- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y., & Okamoto, K. (2003). Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene*, 22(55), 8870–8880. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207176>
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., & Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402–413. PubMed.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>

- Sohn, J., Brick, R. M., & Tuan, R. S. (2016). From embryonic development to human diseases: The functional role of caveolae/caveolin: Caveolae and Caveolins in Development and Disease. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 108(1), 45–64. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21121>
- Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S., & Lisanti, M. P. (1996). 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. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15160–15165. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15160>
- Stahlhut, M., & van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: Evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), 325–337. PubMed. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.325>
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., & Keyes, W. M. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell*, 155(5), 1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Teixeira, A., Chaverot, N., Schröder, C., Strosberg, A. D., Couraud, P.-O., & Cazaubon, S. (1999). Requirement of Caveolae Microdomains in Extracellular Signal-Regulated Kinase and Focal Adhesion Kinase Activation Induced by Endothelin-1 in Primary Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 72(1), 120–128. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720120.x>
- Ting Tse, E. Y., Fat Ko, F. C., Kwan Tung, E. K., Chan, L. K., Wah Lee, T. K., Wai Ngan, E. S., Man, K., Tsai Wong, A. S., Ng, I. O.-L., & Ping Yam, J. W. (2012). Caveolin-1 overexpression is associated with hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis. *The Journal of Pathology*, 226(4), 645–653. <https://doi.org/10.1002/path.3957>
- Tiruppathi, C., Shimizu, J., Miyawaki-Shimizu, K., Vogel, S. M., Bair, A. M., Minshall, R. D., Predescu, D., & Malik, A. B. (2008). Role of NF-κB-dependent Caveolin-1 Expression in the Mechanism of Increased Endothelial Permeability Induced by Lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4210–4218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703153200>
- Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., & Kessler, P. D. (2002). Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation*, 105(1), 93–98. <https://doi.org/10.1161/hc0102.101442>
- Trachana, V., Petrakis, S., Fotiadis, Z., Siska, E. K., Balis, V., Gonos, E. S., Kaloyianni, M., & Koliakos, G. (2017). Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage. *Cytotherapy*, 19(7), 808–820. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.078>
- Volonte, D., & Galbiati, F. (2009). Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Reports*, 10(12), 1334–1340. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.215>
- Volonte, D., & Galbiati, F. (2011). Polymerase I and Transcript Release Factor (PTRF)/Cavin-1 Is a Novel Regulator of Stress-induced Premature Senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 28657–28661. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.235119>
- Volonte, D., & Galbiati, F. (2020). Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09875-w>
- Volonte, D., Kahkonen, B., Shapiro, S., Di, Y., & Galbiati, F. (2009). Caveolin-1 Expression Is Required for the Development of Pulmonary Emphysema through Activation of the ATM-p53-p21 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5462–5466. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800225200>
- Volonte, D., Liu, Z., Musille, P. M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., Di, Y.-P., Lisanti, M. P., Kensler, T. W., & Galbiati, F. (2013). Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1

- promotes stress-induced premature senescence. *Molecular Biology of the Cell*, 24(12), 1852–1862. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0666>
- Volonte, D., Vyas, A. R., Chen, C., Dacic, S., Stabile, L. P., Kurland, B. F., Abberbock, S. R., Burns, T. F., Herman, J. G., Di, Y. P., & Galbiati, F. (2018). Caveolin-1 promotes the tumor suppressor properties of oncogene-induced cellular senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1794–1809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.815902>
- Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P., & Galbiati, F. (2002). 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. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7), 2502–2517. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-11-0529>
- Volonte, D., Zou, H., Bartholomew, J. N., Liu, Z., Morel, P. A., & Galbiati, F. (2015). Oxidative Stress-induced Inhibition of Sirt1 by Caveolin-1 Promotes p53-dependent Premature Senescence and Stimulates the Secretion of Interleukin 6 (IL-6). *Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 4202–4214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598268>
- Von Zglinicki, T. (2006). Role of Oxidative Stress in Telomere Length Regulation and Replicative Senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1), 99–110. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06639.x>
- Wakabayashi, N., Slocum, S. L., Skoko, J. J., Shin, S., & Kensler, T. W. (2010). When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1649–1663. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3216>
- Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Li, X., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Lu, L., Gilkeson, G. S., Silver, R. M., Chen, W., Shi, S., & Sun, L. (2013). Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Severe and Refractory Systemic Lupus Erythematosus: 4 Years of Experience. *Cell Transplantation*, 22(12), 2267–2277. <https://doi.org/10.3727/096368911X582769c>
- Wang, J., Bai, Y., Zhao, X., Ru, J., Kang, N., Tian, T., Tang, L., An, Y., & Li, P. (2018). OxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae. *Bioscience Reports*, 38(3), BSR20180283. <https://doi.org/10.1042/BSR20180283>
- Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S., & Sun, P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), 3389–3403. PubMed. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.10.3389-3403.2002>
- Wang, Z., Wang, N., Liu, P., Peng, F., Tang, H., Chen, Q., Xu, R., Dai, Y., Lin, Y., Xie, X., Peng, C., & Situ, H. (2015). Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. *Oncotarget; Vol 6, No 35*. <https://www.oncotarget.com/article/5789/text/>
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Williams, T. M., & Lisanti, M. P. (2005). Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(3), C494–C506. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00458.2004>
- Wisniewski, T., Newman, K., & Javitt, N. B. (2013). Alzheimer's disease: Brain desmosterol levels. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 33(3), 881–888. PubMed. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121453>
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. 7.
- Wu, C.-C., Lin, J.-C., Yang, S.-C., Lin, C.-W., Chen, J. J. W., Shih, J.-Y., Hong, T.-M., & Yang, P.-C. (2008). Modulation of the expression of the invasion-suppressor CRMP-1 by cyclooxygenase-2 inhibition via reciprocal regulation of Sp1 and C/EBP α . *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(6), 1365–1375. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0091>
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., & Ishikawa, Y. (1998). Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26962–26968. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26962>
- Yang, G., Truong, L. D., Wheeler, T. M., & Thompson, T. C. (1999). Caveolin-1 Expression in Clinically Confined

Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, 59(22), 5719.

- Yankner, B. A., Lu, T., & Loerch, P. (2008). The Aging Brain. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044>
- Yannakopoulou, E. (2009). Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications. *Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(1):23–35.
- Yap, D. B., Hsieh, J.-K., Chan, F. S., & Lu, X. (1999). mdm2: A bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene*, 18(53), 7681–7689. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202954>
- Yin, F., Wang, W.-Y., & Jiang, W.-H. (2019). Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis in vitro and in vivo: From biological characteristics to therapeutic mechanisms. *World Journal of Stem Cells*, 11(8), 548–564. PubMed. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i8.548>
- Yu, J. M., Wu, X., Gimble, J. M., Guan, X., Freitas, M. A., & Bunnell, B. A. (2011). Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell*, 10(1), 66–79. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00646.x>
- Zhang, B., Peng, F., Wu, D., Ingram, A. J., Gao, B., & Krepinsky, J. C. (2007). Caveolin-1 phosphorylation is required for stretch-induced EGFR and Akt activation in mesangial cells. *Cellular Signalling*, 19(8), 1690–1700. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.03.005>
- Zhu, H., Yue, J., Pan, Z., Wu, H., Cheng, Y., Lu, H., Ren, X., Yao, M., Shen, Z., & Yang, J.-M. (2010). Involvement of Caveolin-1 in Repair of DNA Damage through Both Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining. *PLOS ONE*, 5(8), e12055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012055>
- Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 15(2), 203–211. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201178>