

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (microRNA) ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ»**

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΚΗ ΠΕΛΑΓΙΑ

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ Επίκ. Καθηγήτρια Ιατρικής ΠΘ (Επιβλέπουσα)

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ Καθηγήτρια Ιατρικής ΠΘ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ Αν. Καθηγητής Ιατρικής ΠΘ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«MicroRNAs and Cellular aging»

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

Ευχαριστίες

Με την παρούσα διπλωματική εργασία ολοκληρώνονται οι σπουδές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Γενετική του Ανθρώπου» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής, κυρία Τραχανά Βαρβάρα για την επιστημονική και συμβουλευτική καθοδήγηση που μου προσέφερε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας, με τις εύστοχες και πολύ εποικοδομητικές παρατηρήσεις της.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στη συντονίστρια του προγράμματος, την καθηγήτρια κυρία Τσέζου Ασπασία για την αμέριστη στήριξη της στις διάφορες δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια φοίτησης μου στο πρόγραμμα. Καθώς επίσης και τον καθηγητή κύριο Δήμα Χρήστο που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στη φίλη μου Κατσώνη Ελένη για την καθοριστική βοήθεια και στήριξη της για την περάτωση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη μου Τσουβάρα Βασιλική και το φίλο μου Καλούδη Στάθη για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, ιδιαίτερα το Ζώζο Χάρη, καθώς επίσης και το φιλικό μου περιβάλλον, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική και οικονομική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Πελαγία Σταυρουλάκη

Περίληψη

Αν και σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας, το DNA μεταγράφεται σε RNA που κατόπιν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, έχουν βρεθεί μη κωδικά μόρια RNA που πραγματοποιούν πολύ σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, π.χ. τα miRNA. Αποτελούν μετα-μεταγραφικούς ρυθμιστές-κλειδιά της γονιδιακής έκφρασης με ποικίλα mRNA-στόχους. Εκφράζονται με τρόπο ειδικό και κατ' αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν σε προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης ειδικής ανά κυτταρικό τύπο. Αλλαγές στην έκφρασή τους σχετίζονται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο. Ανεπάρκεια ή πλεόνασμα miRNA έχει συνδεθεί με πολυάριθμες κλινικά σημαντικές ασθένειες. Αυτά δείχνουν πως τα miRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση αλλά και τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Υπάρχουν δύο μονοπάτια βιογένεσης και επεξεργασίας τους, το κανονικό και αυτό μέσω του οποίου παράγονται pre-miRNA από πολύ μικρά ιντρόνια ως αποτέλεσμα ματίσματος. Η αποδόμηση τους είναι ένα εξίσου σημαντικό βήμα στη ρύθμιση της λειτουργίας τους. Πολυάριθμα miRNA εμπλέκονται στη ρύθμιση μονοπατιών σχετιζόμενων με την κυτταρική γήρανση, τη μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου η οποία διακρίνεται σε αναδιπλασιαστική που επιτυγχάνεται σε πρώιμα κύτταρα καλλιέργειας απομονωμένα από ιστούς και σε πρώιμη γήρανση, γήρανση επαγόμενη από στρες. Αυτά τα ερεθίσματα ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα γηρασμένα κύτταρα διαφέρουν από άλλα μη διαιρούμενα κύτταρα ως προς διάφορους βιοδείκτες και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Έχουν συσχετιστεί και με πολλαπλές παθολογικές διεργασίες στις οποίες η γήρανση μπορεί να έχει ωφέλιμες αλλά και καταστροφικές επιδράσεις. Προτείνεται ότι η γήρανση παίζει ένα ρόλο-κλειδί στην αναδιαμόρφωση ιστών κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη και φυσιολογία, αλλά και σε παθολογικές περιπτώσεις. Τα miRNA μπορούν ταυτόχρονα να τροποποιήσουν τα επίπεδα πολλαπλών γονιδίων και μονοπατιών. Η ανάλυση των προφίλ έκφρασης των miRNA σε διαφορετικά στάδια γήρανσης ή σύγκρισή της με άλλες συνθήκες παύσης της ανάπτυξης θα μπορούσε να αποτελέσει μια πρωταρχική προσέγγιση της κατανόησης των μοριακών μηχανισμών της κυτταρικής γήρανσης και των ρυθμιστών της ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που προωθούν τις ωφέλιμες δράσεις της και βελτιώνουν τις βλαβερές επιδράσεις της. Η κατανόηση της επίδραση των miRNA στη γήρανση και

στις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες θα οδηγήσει σε νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές δυνατότητες.

Abstract

Even though, according to the central dogma of Molecular Biology “DNA makes RNA, and RNA makes protein”, non-codingRNA molecules, e.g. miRNAs, have been found to carry important cellular processes out. MiRNAs constitute post-transcriptional key-regulators of gene expression which target various mRNAs. They are expressed in a specific manner thus contributing to cell type specific protein expression profiles. Changes in their expression are associated to a variety of pathological situations in humans. Loss or gain of miRNAs is linked to numerous clinically important diseases. Therefore, miRNAs can be used in diagnostic and therapeutic approaches. Two pathways of miRNA biogenesis and processing have been discovered, the canonical one and the one where pre-miRNAs are a result of splicing on mirtrons. Their degradation is an equally important step of their function regulation. Numerous miRNAs are involved in the regulation of pathways associated to cellular senescence, the irreversible cell cycle pause divided into two categories, replicative senescence, which is achieved in non-differentiated cultured cells isolated from tissues and premature senescence, stress-induced senescence. These stress stimuli activate numerous signaling pathways. Senescent cells differ from other non-dividing cells in a variety of biomarkers and morphological characteristics and have been associated with pathological processes on which senescence may have a beneficial or a detrimental impact. It is suggested that senescence plays a key role in tissue remodeling during natural development and physiology as well as pathological situations. MiRNA may simultaneously modify many gene expression levels and pathways. The analysis of miRNA expression profiles in different senescence stages or its comparison to other conditions of developmental pause could constitute a primary approach of understanding the molecular mechanisms of cellular senescence and its regulators. Therefore, this may provide the means to develop therapeutic approaches which promote the beneficial effects of senescence and improve its detrimental effects. Understanding the impact of miRNA on senescence and age-related diseases will finally lead to new diagnostic and therapeutic potential.

Περιεχόμενα

1. Κεφάλαιο: miRNAs.....	10
1.1. Ιστορική αναδρομή	10
1.2. Ορισμός.....	14
1.3. Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs	15
1.4. Ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής των miRNA	18
1.5. Ρύθμιση της αποικοδόμησης των miRNA.....	19
1.6. Ο ρόλος των miRNA στις ανθρώπινες ασθένειες.....	20
1.6.1. miRNA και καρκίνος.....	20
1.6.2. miRNA σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές	22
1.6.3. miRNA στην Καρδιαγγειακή Νόσο	22
1.6.4. miRNA σε αυτοάνοσα νοσήματα.....	23
1.6.5. miRNAs σε μυοσκελετικές παθήσεις.....	23
1.6.6. Τα miRNA ως διαγνωστικοί δείκτες.....	24
2. Κεφάλαιο: Κυτταρική γήρανση.....	26
2.1. Το όριο του Hayflick	27
2.2 Αναδιπλασιαστική και πρόιμη γήρανση	28
2.3 Πότε προκύπτει κυτταρική γήρανση	29
2.4. Χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων.....	30
2.5. Μηχανισμοί γήρανσης	32
2.5.1. Κόντεμα τελομερών και απόκριση στις βλάβες του DNA.....	33
2.5.2 Αναίρεση της αναστολής του CDKN2A.....	33
2.5.3. Γήρανση επαγόμενη από στρες και δραστικά είδη οξυγόνου	34
2.5.4. Γήρανση επαγόμενη από ογκογονίδια.....	34
2.5.5. Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (Senescence-associated secretory phenotype, SASP).....	35
2.6 Ο ρόλος της γήρανσης σε διάφορες ασθένειες.	36
2.6.1. Ο ωφέλιμος ρόλος της γήρανσης	37
2.6.2 Ο καταστροφικός ρόλος της γήρανσης	39
2.7. Ένα ενοποιημένο μοντέλο γήρανσης.....	40
3. Κεφάλαιο: Σχέση miRNAs και Κυτταρικής Γήρανσης.....	42
3.1 Διαφοροποιημένη έκφραση των miRNA κατά την κυτταρική γήρανση.....	42
3.2. miRNA που εμπλέκονται σε μονοπάτια-κλειδιά γήρανσης	44
3.2.1. miRNA που σχετίζονται με το μονοπάτι p53-p21.....	44

3.2.1.1. miRNA ρυθμίζουν άμεσα τη p53.....	45
3.2.1.2. miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την p53 μέσω καταστολέων της.....	45
3.2.1.3. miRNA p21.....	46
3.2.2. miRNA που σχετίζονται με το μονοπάτι p16-pRB	46
3.2.2.1 miRNA ρυθμίζουν άμεσα την p16.....	46
3.2.2.2. miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την p16.....	47
3.2.2.3 miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την RB.....	48
3.2.2.4. miRNA που σχετίζονται με τον σχετιζόμενο με τη γήρανση εκκριτικό φαινότυπο (SASP).....	48
3.2.2.5. Ιντερλευκίνες.....	50
3.2.2.6. Μεταλλοπρωτεάσες εξωκυττάριας ουσίας (MMP).....	50
3.2.2.7. Παράγοντας νέκρωσης όγκου.....	51
4. Κεφάλαιο: Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές	53
5. Βιβλιογραφία	56

Εισαγωγή

1. Κεφάλαιο: miRNAs

1.1. Ιστορική αναδρομή

Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας, η ροή της γενετικής πληροφορίας προχωράει ως εξής: το DNA μεταγράφεται σε RNA που κατόπιν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Ωστόσο, έχουν βρεθεί μόρια RNA, τα μη κωδικά μόρια RNA, τα οποία δε λειτουργούν ως ενδιάμεσοι φορείς της γενετικής πληροφορίας αλλά πραγματοποιούν πολύ σημαντικές διεργασίες μέσα στο κύτταρο.

Ως μήτρα της πρωτεϊνοσύνθεσης, τα αγγελιαφόρα RNA (messengerRNAs, mRNAs) είναι στο επίκεντρο της έρευνας εδώ και πολύ καιρό, ενώ τα μη κωδικά μόρια RNA (non-codingRNAs, ncRNAs) θεωρούνται παραπροϊόντα της μαζικής μεταγραφής μικρότερης βιολογικής σημασίας συγκριτικά με τα πρώτα. Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκαν το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA) και το μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA) στα τέλη του 1950, αναδύθηκαν στην επιφάνεια ποικίλα είδη RNA, γεγονός που αποκάλυπτε έναν ολόκληρο ανεξερεύνητο κόσμο. Ο συνδυασμός αλληλούχισης μεγάλης κλίμακας και υπολογιστικής ανάλυσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην κατανόηση του κόσμου των RNA. Στην αρχή του 21^{ου} αιώνα, η αρχική αλληλούχιση και ανάλυση του γονιδιώματος του ανθρώπου (Lander et al., 2001) και του ποντικού (Waterston et al., 2002) αποκάλυψαν ότι το 98% του «άχρηστου» DNA μπορεί να μεταγραφεί. Εκτός από τα προαναφερθέντα mRNA, τα περισσότερα μετάγραφα δε φαίνεται να κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συνεπώς, αυτά αναφέρονται συχνά ως μη κωδικά RNA (non-codingRNAs, ncRNAs) (Eddy, 2001). Λίγο αργότερα, το 2005, επιτεύχθηκε η Χαρτογράφηση του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Watson, 1990), η οποία οδήγησε στην ανίχνευση πληθώρας μακρών μη κωδικών RNA (long non-codingRNAs, lncRNAs) στα θηλαστικά (Belmont et al., 2005; Carninci et al., 2005). Αργότερα, η εκτεταμένη εφαρμογή αλληλούχισης υψηλής απόδοσης επέτρεψε να δημιουργηθεί ένα πιο ακριβές προφίλ των ncRNAs (Kaiser, 2008; Metzker, 2010). Η Εγκυκλοπαίδεια των στοιχείων του DNA (Encyclopedia of DNA, ENCODE) που ξεκίνησε το 2005 και οι πρόσφατες αναφορές της αποκάλυψαν ότι πάνω από το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει την ικανότητα να μεταγράφονται σε ncRNAs (Djebali et al., 2012; Dunham et al., 2012). Γενικά, τα ncRNAs φαίνεται

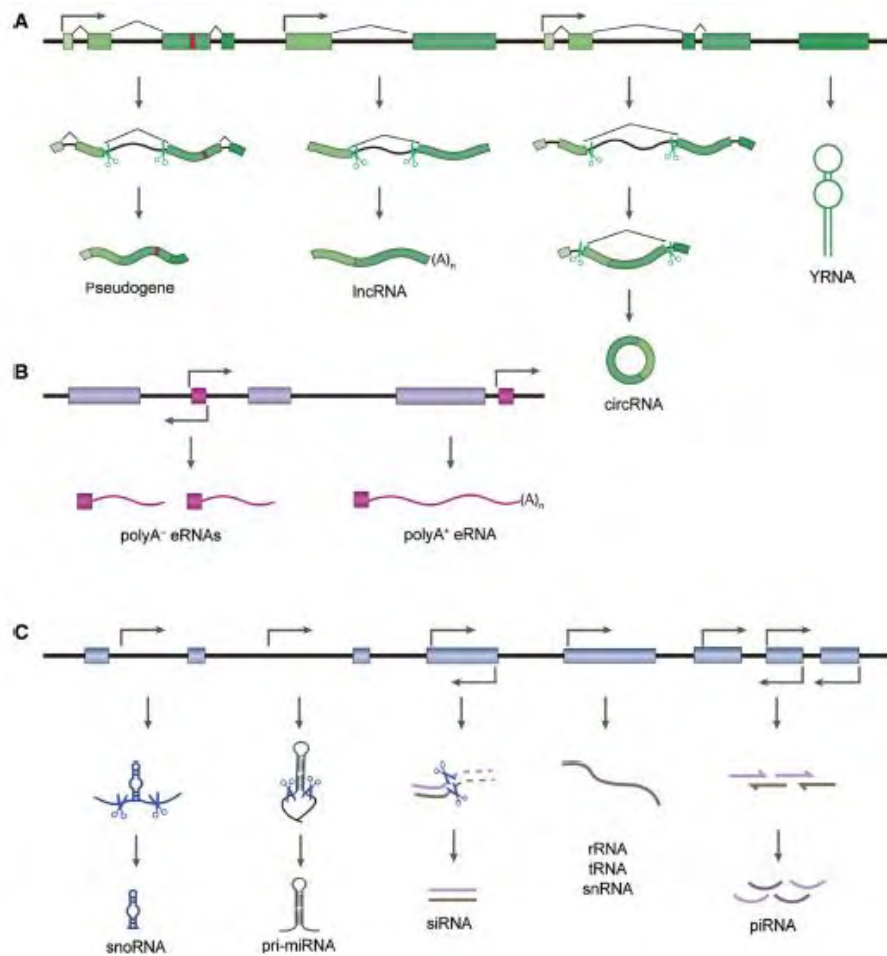
ότι συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες, ρυθμίζουν φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες ή και ασθένειες ακόμη. Έχουν αναγνωρισθεί ως ογκοκαταστολείς και ογκογόνα σε διάφορα είδη καρκίνου (Pavet et al., 2011). Στα φυτά, τα ncRNAs φαίνεται πως κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο σε αποκρίσεις στρες (Wangetal., 2017).

Στους ευκαρυώτες, η μεταγραφή διαφορετικών γενωμικών περιοχών και η επεξεργασία του RNA οδηγούν στην παραγωγή διαφόρων ειδών ncRNA. Διάφορα τμήματα DNA, παραδείγματος χάρη γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, περιοχές ενισχυτών ή μεταθετά στοιχεία, μπορούν να μεταγραφούν σε ncRNA (βλ. εικόνα 1)

Δεδομένων των ρυθμιστικών τους ρόλων, τα ncRNAs διαιρούνται σε δύο κατηγορίες (βλ. πίνακα): στα ιδιοστατικά ncRNAs (housekeepingncRNAs) που εκφράζονται συνεχώς και σε αφθονία στα κύτταρα, ρυθμίζοντας κυρίως γενικές κυτταρικές λειτουργίες και στα ρυθμιστικά ncRNA (regulatory ncRNAs) που λειτουργούν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε επιγενετικά, μεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά επίπεδα (Cech and Steitz, 2014; Peschansky and Wahlestedt, 2014; Ronjavić et al., 2007). Μεταξύ άλλων, στα ιδιοστατικά ncRNAs περιλαμβάνονται και τα miRNAs τα οποία θα αναλύσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στη συνέχεια. Παρακάτω αναφέρονται επιγραμματικά και τα υπόλοιπα είδη που περιλαμβάνονται στην κάθε κατηγορία (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 1: Κατηγορίες ncRNAs (Zhang et al., 2019).

Type	Abbreviation	Full name	Size
Housekeeping ncRNAs	rRNA	ribosomal RNA	120–4,500 nt
	tRNA	transfer RNA	76–90 nt
	snRNA	small nuclear RNA	100–300 nt
	snoRNA	small nucleolar RNA	60–400
	TERC	telomerase RNA	/
	tRF	tRNA-Derived Fragments	16–28 nt
	tiRNA	tRNA halves	29–50 nt
Regulatory ncRNAs	miRNA	microRNA	21–23 nt
	siRNA	small interfering RNA	20–25 nt
	piRNA	piwi-interacting RNA	26–32 nt
	eRNA	enhancer RNA	50–2,000 nt
	lncRNA	long non-coding RNAs	>200 nt
	circRNA	circular RNA	100–10,000 nt
	Y RNA	Y RNA	/



Εικόνα 1: Διάφορα είδη ncRNA μπορούν να μεταγραφούν από ευκαρυωτικά γονιδιώματα (Zhang *et al.*, 2019).

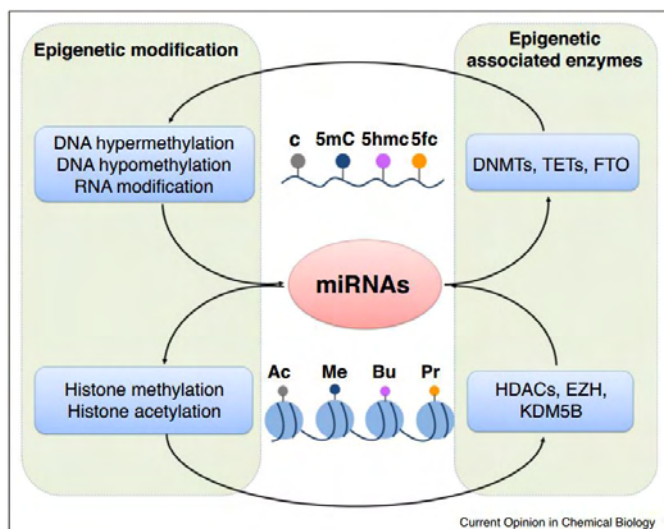
Στους ανθρώπους εκφράζονται περισσότερα από 400 διαφορετικά μόρια microRNA (miRNA) τα οποία φαίνεται ότι ρυθμίζουν τουλάχιστον το ένα τρίτο όλων των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μετά τη δημιουργία τους, τα miRNA ζευγαρώνουν σύμφωνα με τον κανόνα συμπληρωματικότητας με συγκεκριμένα mRNA και ρυθμίζουν τη σταθερότητά τους και τη μετάφρασή τους (Alberts *et al.*, 2008).

Στις αρχές της δεκαετίας του '90, ο οργανισμός στον οποίο ανακαλύφθηκε το πρώτο σχετικό παράδειγμα miRNA ήταν ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Ανακαλύφθηκε ότι το προϊόν του γονιδίου *lin4* δεν ήταν πρωτεΐνη αλλά δύο μικρά μόρια RNA. Το γονίδιο αυτό ελέγχει το χρόνο ανάπτυξης της προνύμφης του *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αργότερα απέδειξαν ότι το μεγαλύτερο μόριο RNA, μήκους 70 νουκλεοτιδίων, που παραγόταν ήταν πρόδρομο

του μικρότερου RNA, μήκους 22 νουκλεοτίδια (Lagos-Quintana et al., 2001). Το RNA του γονιδίου *lin4* αποτελεί ένα από τα πολλά παραδείγματα miRNA που απαντώνται στο συγκεκριμένο οργανισμό-μοντέλο. Τα miRNA παρουσιάζουν διάφορα πρότυπα έκφρασης κατά την ανάπτυξη και είναι κατά πάσα πιθανότητα ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Πολλά από αυτά, μάλιστα, έχουν ομόλογα στα θηλαστικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μέσω miRNA είναι διαδεδομένος ευρέως και πολύ συντηρημένος (Lewin, 2004).

1.2. Ορισμός

Τα miRNA αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μικρών μορίων RNA, μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων, που έχουν προκύψει ως μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές-κλειδιά της γονιδιακής έκφρασης στα μετόζωα και στα φυτά. Εμπλέκονται στην επιγενετική, δηλαδή στην κληρονομική μεταβίβαση αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης ή του κυτταρικού φαινοτύπου χωρίς ταυτόχρονη αλλαγή στην αντίστοιχη αλληλουχία DNA (Bird, 2007; Goldberg et al., 2007). Τα miRNA εμπλέκονται σε έναν από τους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, στην παρεμβολή RNA (RNAi), μέσω της πρόσδεσής τους στις αμετάφραστες περιοχές (UTRs) του mRNA με σκοπό να καταστείλουν την πρωτεϊνική μετάφραση ή την αποικοδόμηση του mRNA (Lujambio and Lowe, 2012). Υπάρχουν αναφορές ότι κάθε μόριο miRNA μπορεί να έχει πολλά mRNA-στόχους (Baek et al., 2008). Τα miRNA μπορούν να λειτουργήσουν ως επιγενετικοί ρυθμιστές στοχεύοντας ένζυμα υπεύθυνα για επιγενετικές αντιδράσεις όπως οι μεθυλοτρανσφεράσες DNA (DNMTs), οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) και οι μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών (EZH) (Kwa and Jackson, 2018; Li et al., 2019; Sato et al., 2016). Επιπλέον, η έκφραση των miRNA ρυθμίζεται μέσω επιγενετικών μηχανισμών π.χ. μεθυσίωσης DNA, τροποποίησης RNA και ιστονών. Η αμοιβαία σχέση μεταξύ των μορίων miRNA και της επιγενετικής ρύθμισης φαίνεται στην Εικόνα 2, όπου απεικονίζεται ο βρόγχος ανατροφοδότησης miRNA-επιγενετικών μηχανισμών. Φαίνεται πως με τον τρόπο αυτό ρυθμίζονται κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι η κυτταρική διαίρεση (Kiga et al., 2014), η απόπτωση (Matsushima et al., 2011) και η διαφοροποίηση (Chen et al., 2006). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNA συμμετέχουν στη ρύθμιση όλων σχεδόν των κυτταρικών διεργασιών, που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής, κι ότι αλλαγές στην έκφρασή τους σχετίζονται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο (Krol et al., 2010). Συνεπώς, η κατανόηση της απορρύθμισης αυτού του μηχανισμού, κατά την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, μπορεί δυνητικά να βοηθήσει στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων για τις ασθένειες αυτές (Yao et al., 2019).

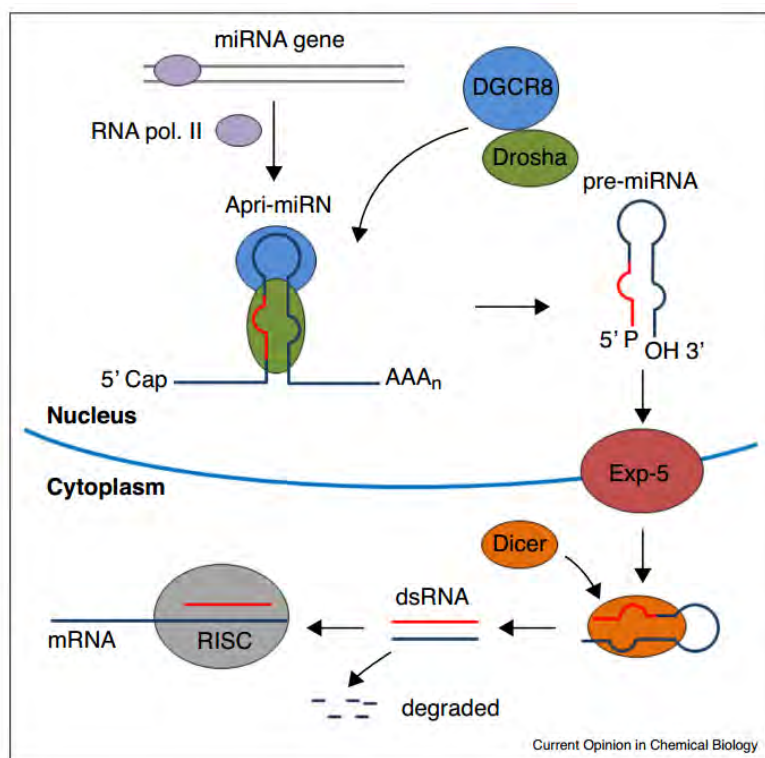


Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του βρόγχου ανατροφοδότησης Επιγενετικής-miRNA (Yao et al., 2019).

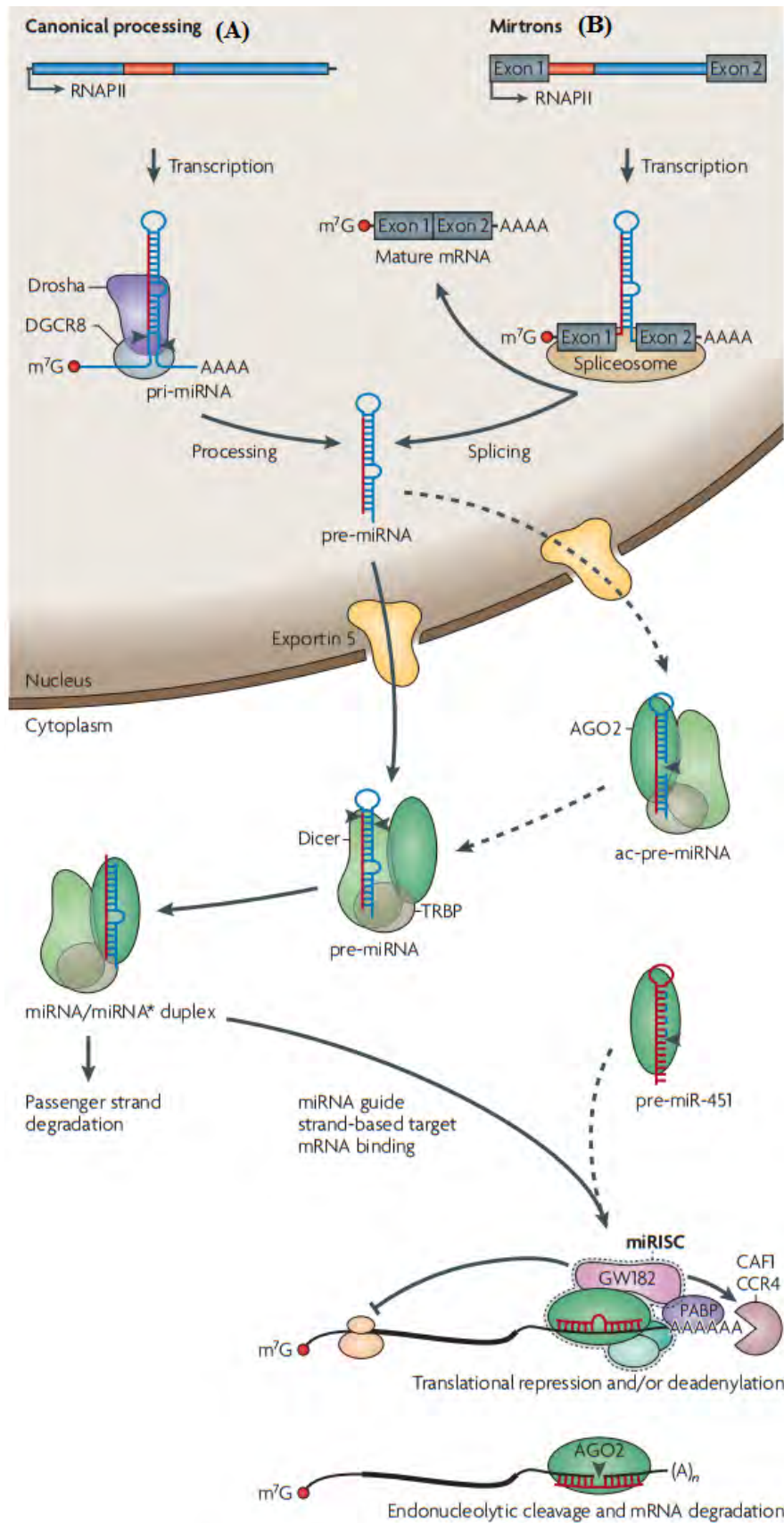
1.3. Βιογένεση και λειτουργία των miRNAs

Τα τελευταία χρόνια έχει αναδυθεί μεγάλος όγκος γνώσης σχετικά με τους βασικούς μηχανισμούς της βιογένεσης και της λειτουργίας των miRNA (Bartel, 2009; Carthew and Sontheimer, 2009; Chekulaeva and Filipowicz, 2009; Fabian et al., 2010; Kim et al., 2009). Ωστόσο, πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι τα miRNA υφίστανται σύνθετο έλεγχο, που λαμβάνει χώρα στο επίπεδο του μεταβολισμού αλλά και της λειτουργίας τους. Ο αριθμός των miRNA που εκφράζονται σε διαφορετικούς οργανισμούς είναι παρόμοιος με αυτόν των μεταγραφικών παραγόντων ή των πρωτεϊνών που προσδένονται σε αλληλουχίες RNA. Πολλά από τα miRNA εκφράζονται με τρόπο ειδικό, ανάλογα με τον τύπο του ιστού ή το αναπτυξιακό στάδιο, και κατ' αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν σε προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης ειδικής ανά κυτταρικό τύπο. Η φύση της αλληλεπίδρασης του miRNA με το mRNA-στόχο του, που πραγματοποιείται μέσω αλληλουχιών μικρού μήκους, τα καθιστά κατάλληλα στη συνδυαστική και αποτελεσματική αλληλεπίδραση με άλλα miRNA ή πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης RNA (RBP) που σχετίζονται με το συγκεκριμένο μόριο miRNA. Έχοντας τη δυνατότητα να στοχεύουν πολλά διαφορετικά mRNA, τα miRNA μπορούν να συντονίσουν την πρωτεϊνική έκφραση μέσα σε ένα κύτταρο. Όλα τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα και η δραστηριότητα των μορίων miRNA υφίστανται πολύ αυστηρή και δυναμική ρύθμιση, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια ταχύτατων αναπτυξιακών μεταβάσεων ή αλλαγών του κυτταρικού περιβάλλοντος (Krol et al., 2010).

Η βιογένεση των miRNA ξεκινά από την RNA πολυμεράση II, η οποία μεταγράφει τα γονίδια των miRNA παράγοντας μεγάλου μήκους, πολυαδενυλιωμένα μόρια RNA που φέρουν το 5'-κάλυμμα (cap) και ονομάζονται αρχικά μόρια RNA (pri-miRNA) (βλ. Εικόνα 3) (Lujambio and Lowe, 2012). Τα pri-miRNA αναγνωρίζονται από ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει τη Drosha, μια ριβονουκλεάση ειδική για RNA, καθώς και τη DGCR8, την πρωτεΐνη στην οποία προσδένεται στον πυρήνα. Αυτό το σύμπλοκο κόβει τα pri-miRNA σε RNA μήκους 60-100 νουκλεοτιδίων με δομή φουρκέτας, τα οποία είναι γνωστά ως πρόδρομα μόρια miRNA (pre-miRNA) (Denli et al., 2004). Τα pre-miRNA μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη Exportin 5 (Bohnsack et al., 2004). Από τη στιγμή που μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα, τα pre-miRNA υφίστανται επεξεργασία από τη Dicer, μια ενδονουκλεάση της οικογένειας των RNAsών III, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δίκλινα μόρια RNA 18-25 νουκλεοτιδίων (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Έχει αναφερθεί ότι τα miRNA παράγονται επίσης και μέσω ενός μονοπατιού, το οποίο είναι ανεξάρτητο της Dicer, κατά το οποίο λαμβάνει χώρα κατάλυση από πρωτεΐνες-αργοναύτες (AGO). Παρακάτω, το μονοπάτι αυτό παρουσιάζεται με περισσότερες λεπτομέρειες (βλ. Εικόνα 4) (Cheloufi et al., 2010).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της βιογένεσης των miRNA (Yao et al., 2019).



Εικόνα 4: Περιγραφή των μονοπατιών βιογένεσης των μορίων miRNA (Lujambio and Lowe, 2012).

Στην Εικόνα 4, φαίνονται τα μονοπάτια βιογένεσης και επεξεργασίας των μορίων miRNA. Η περίπτωση του κανονικού μονοπατιού επεξεργασίας (A), περιγράφηκε λεπτομερώς παραπάνω. Στην περίπτωση (B), κάποια pre-miRNA παράγονται από πολύ μικρά ιντρόνια (mirtrons) ως αποτέλεσμα ματίσματος, παρακάμπτοντας το στάδιο που αναφέρθηκε προηγουμένως στο οποίο εμπλέκεται το σύμπλοκο Drosha-DGCR8. Σε οποιαδήποτε από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, χάρη στη διάσπαση του pre-miRNA από τη Dicer, που υποβοηθάται από την πρωτεΐνη TRBP, παράγεται στο κυτταρόπλασμα ένα διπλό μόριο miRNA μήκους περίπου 20 ζευγών βάσεων (bp). Στη συνέχεια, ο ένας κλώνος αυτού του διπλού μορίου, που αναπαριστά το ώριμο πλέον miRNA, ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RISC, ένα σύμπλοκο αποσιώπησης που επάγεται από RNA, και το καθοδηγεί προς το mRNA-στόχο (Martinez et al., 2002). Ως μέρος του συμπλόκου αυτού, το miRNA ζευγαρώνει συμπληρωματικά με μόρια mRNA με αποτέλεσμα να επάγει τη μεταγραφική του καταστολή ή την αποαδενυλίωση και αποδόμησή του (Krol, Loedige, et al., 2010). Παράλληλα, ο άλλος κλώνος απελευθερώνεται και διασπάται.

Τα miRNA, όπως η αποσιώπηση RNA (RNAi) και τα μικρά παρεμβατικά μόρια RNA (siRNA) από εννοιολογικής και μηχανιστικής άποψης, μπορούν να κατευθύνουν την καταστολή γονιδίων-στόχων. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιείται η καταστολή ποικίλλουν (Bartel, 2009). Σε κάποιες περιπτώσεις, το miRNA προσδένεται συμπληρωματικά σε περιοχές του μορίου mRNA προκαλώντας διάσπαση κι επακόλουθη αποδόμηση του μορίου mRNA. Αυτού του είδους η αποδόμηση εξαρτάται από την υδρόλυση του RNA κι έχει σαν αποτέλεσμα ισχυρή αποσιώπηση (Dykxhoorn et al., 2003).

1.4. Ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής των miRNA

Η μεταγραφή των γονιδίων miRNA ρυθμίζεται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, δηλαδή μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης ή αναστολής, επιγενετικής καταστολής και ελεγχόμενων ρυθμών αποικοδόμησης (Mohr and Mott, 2015). Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης μέσω αυτορρυθμιστικών βρόγχων ανατροφοδότησης είναι ένας κοινός ρυθμιστικός μηχανισμός που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια του καθορισμού της κυτταρικής μοίρας και της ανάπτυξης. Τα miRNA είναι κατάλληλα στο να συμμετέχουν σε τέτοιου είδους διεργασίες. Έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν μόρια mRNA, που κωδικοποιούν

παράγοντες, που συμμετέχουν στη βιογένεση και λειτουργία των ίδιων των μορίων miRNA ζευγαρώνοντας συμπληρωματικά μαζί τους (Krol et al., 2010).

1.5. Ρύθμιση της αποικοδόμησης των miRNA

Σε αντίθεση με τη βιογένεση των miRNA, η αποδόμηση τους δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Υπάρχει η γενική θεώρηση, ότι τα miRNA αποτελούν πολύ σταθερά μόρια και πράγματι, μετά την πραγματοποίηση πειραμάτων με χρήση αναστολέων RNA πολυμεράσης II ή με μείωση των ενζύμων που επεξεργάζονται τα μόρια miRNA, αποδείχτηκε ότι η διάρκεια ημιζωής των μορίων αυτών σε κυτταρικές σειρές ή σε όργανα, όπως το συκώτι και η καρδιά, αντιστοιχεί σε πολλές ώρες ή ακόμη και ημέρες (Gatfield et al., 2009; Krol et al., 2010; Van Rooij et al., 2007). Ωστόσο, τόσο μεγάλος χρόνος αποδόμησης είναι απίθανο να είναι καθολικό χαρακτηριστικό των μορίων miRNA, καθώς παίζουν συχνά ρόλο σε αναπτυξιακές μεταβάσεις ή δρουν σαν διακόπτες on-off σε συνθήκες που απαιτούν πιο ενεργό μεταβολισμό (Krol et al., 2010).

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε πρόοδος ως προς την ανακάλυψη των ενζύμων που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των miRNA. Στην *Arabidopsis thaliana*, η διεργασία αυτή μεσολαβείται από μια οικογένεια 3'-5' εξωριβονουκλεασών, τις SDN1, SDN2 και SDN3 (Ramachandran and Chen, 2008). Απενεργοποίηση των γονιδίων *SDN* καταλήγει σε σταθεροποίηση διαφόρων miRNA και σχετίζεται με αναπτυξιακούς φαινοτύπους. Στον *C. elegans*, το ένζυμο XRN-2 με δραστηριότητα 5' – 3' εξωνουκλεάσης καταλύει την αποικοδόμηση των ώριμων miRNA (Chatterjee and Grosshans, 2009). Για να είναι εφικτή η αποσύνθεση του miRNA πρέπει να απελευθερωθεί από το σύμπλοκο miRISC ώστε να είναι σε θέση το ένζυμο να προσεγγίσει το 5' άκρο του. Ουσιαστικά, η ευπάθεια του miRNA στο XRN-2 εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του στόχου, καθώς η σύνδεση του miRISC με το mRNA αποτρέπει την αποδόμηση του miRNA (Chatterjee and Grosshans, 2009). Συνεπώς, απουσία των συμπληρωματικών του στόχων, το miRNA θα απελευθερωθεί ειδικά από το miRISC, καθιστώντας τις πρωτεΐνες - αργοναύτες (AGO) διαθέσιμες ώστε να φορτώσουν νέα miRNA. Οι πρωτεΐνες AGO, που συνδέονται άμεσα με τα μόρια miRNA, αποτελούν κύρια δομικά στοιχεία του συμπλόκου miRISC και φαίνεται πως τα περισσότερα είδη εκφράζουν πολλαπλά ομόλογα πρωτεϊνών AGO. Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι η αποδόμηση των miRNA είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα

στη ρύθμιση της λειτουργίας τους, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που έχει εδραιωθεί στα mRNA (Krol et al., 2010).

1.6.Ο ρόλος των miRNA στις ανθρώπινες ασθένειες

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα miRNA φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο σε μεγάλο εύρος αναπτυξιακών διεργασιών, όπως ο μεταβολισμός, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η ανάπτυξη και η κυτταρική μοίρα (Bartel, 2005; Berezikov and Plasterk, 2005; Croce and Calin, 2005; Mattick and Makunin, 2005; Zamore and Haley, 2005). Λόγω του πιθανού ρόλου των miRNA ως ρυθμιστικοί παράγοντες της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, έχουν προταθεί ως επικρατείς υποψήφιοι για τη θεραπεία κατά του καρκίνου (Bartel, 2004; Szymanski et al., 2005).

Ανεπάρκεια ή πλεόνασμα miRNA έχει συνδεθεί με πολυάριθμες κλινικά σημαντικές ασθένειες όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου ή τα αυτοάνοσα νοσήματα. Σημειακές μεταλλάξεις των miRNA ή των στόχων τους, καθώς και επιγενετική αποσιώπηση των μονάδων μεταγραφής των miRNA αποτελούν μηχανισμούς μέσω των οποίων οι λειτουργίες του miRNA στο κύτταρο επηρεάζονται (Soifer et al., 2007). Αυτά δείχνουν πως τα miRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση αλλά και τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Ardekani and Naeini, 2010; Mohr and Mott, 2015). Παρακάτω θα αναφερθεί επιγραμματικά ο ρόλος των miRNA ως σημαντικά νέα ρυθμιστικά μόρια σε διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο (Li et al., 2009).

1.6.1. miRNA και καρκίνος

Έχει καταγραφεί ότι σε πολλά είδη ανθρώπινου καρκίνου λαμβάνει χώρα θετική ή αρνητική ρύθμιση των miRNA (Naeini and Ardekani, 2009). MiRNA που υπερεκφράζονται μπορούν να λειτουργήσουν ως ογκογονίδια ή/και ως ρυθμιστές κυτταρικών διεργασιών, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση (He et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Μοναδικά προφίλ έκφρασης miRNA έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου. Παρακάτω, στους πίνακες 2 και 3, φαίνεται μία λίστα τέτοιων προφίλ σε περιπτώσεις αναπαραγωγικών καρκίνων (μαστού, ωοθηκών και ενδομητριοειδούς αδενοκαρκινώματος) (πίνακας 2) και σε περιπτώσεις καρκίνου του παγκρέατος, αιματολογικών καρκίνων (ΟΜΛ, ΟΛΛ, ΧΜΛ, ΧΛΛ), καρκίνου του οισοφάγου, του

γαστρεντερικού συστήματος, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης και όγκων του θυρεοειδή (πίνακες 3 και 4) (Naeini and Ardekani, 2009).

Πίνακας 2: miRNA σε αναπαραγωγικούς καρκίνους (Naeini and Ardekani, 2009).

Cancer type	miRNA	Up/Down Regulation
Breast		
	miR-21, miR-155, miR-23, and miR-191	Up
	miR-205, miR-145, miR-10b, and miR-125b	Down
Ovary		
	miR-200a, miR-200c, and miR-141	Up
	miR-199a, miR-140, miR-145, and miR-125bl	Down
Endometrioid adenocarcinoma		
	miR-205, miR-155, miR-200a, 200b, 200c	Up
	miR-193a, 193b	Down

Πίνακας 3: miRNA σε διάφορους τύπους καρκίνου (Naeini and Ardekani, 2009).

Cancer type	miRNA	Up/Down Regulation
Colon		
	miR-let 7g, miR-21, miR-20a, miR-17-19 family, miR-31, miR-135, miR-181b, and miR-200c	Up
	miR-34, miR-let7, miR-143, miR-145, miR-133b, and miR-126	Down
AML		
	Has-miR-191, 199a, miR-155	Up
CML		
	miR-17-5p, miR-173p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a and miR-92a-1	Up
CLL		
	miR-21, miR-150, miR-155	Up
	miR-15a, miR-16, miR-29, miR-143, miR-45, miR-30d, miR-let 7a, miR-181a	Down

Πίνακας 4: miRNA σε διάφορους τύπους καρκίνου (Naeini and Ardekani, 2009).

Cancer type	miRNA	Up/Down Regulation
Esophagus		
	miR-194, miR-192, miR-200c	Up
	miR-203	Down
Gastrointestinal		
	miR-106b-25	Up
	miR-15b, miR-16	Down
Lung		
	has-mir-21 and has-mir-205, miR-17-92	Up
	has-mir-126*, miR-let 7, hsa-let-7a-2, let-7f-1	Down
Bladder		
	miR-23, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, miR-203, miR-17-5p, miR-23, miR-205	Up
	miR-29c, miR-26a, miR-30c, miR-30e-5p	Down
Thyroid tumors		
PC	miR-146b, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-155, miR-224	Up
AC	miR-30d, miR-125b, miR-26a, miR-30a-5p	Down

1.6.2. miRNA σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές

Παρατηρούνται υψηλά επίπεδα έκφρασης miRNA στον εγκέφαλο του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών σε σχέση με άλλα όργανα (Babak et al., 2004; Beuvink et al., 2007; Sempere et al., 2004). Η έκφραση των miRNA στον εγκέφαλο αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου. Συνεπώς, κάποια miRNA εκφράζονται σε αφθονία κατά την πρώιμη ανάπτυξη του εγκεφάλου των θηλαστικών κι άλλα εκφράζονται λιγότερο κατά τη μετέπειτα ανάπτυξη (Miska et al., 2004; Nelson et al., 2006). Οι αλλαγές στην έκφραση των miRNA, κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, μπορεί να αναπαριστά βιοχημικά σήματα με στόχο τον καθορισμό της κυτταρικής τύχης, την απόπτωση ή/ και τον προγραμματισμό της κυτταρικής διαίρεσης. Ένα από τα πιο σημαντικά κοινά χαρακτηριστικά που συνδέουν πολλές νευροαναπτυξιακές διαταραχές είναι ότι η εμφάνιση της νόσου συμβαίνει κατά τη διάρκεια περιόδων ωρίμανσης και ανάπτυξης (Ehninger et al., 2008). Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό τα miRNA να συνεισφέρουν σημαντικά στην παθογένεση, σε μοριακό επίπεδο, των νευροαναπτυξιακών διαταραχών (Chang et al., 2009), όπως το σύνδρομο του Εύθραυστου Χ, το σύνδρομο Rett, το σύνδρομο Down, η Νόσος Alzheimer, η Νόσος Huntington και η Σχιζοφρένεια (Ardekani and Naeini, 2010).

1.6.3. miRNA στην Καρδιαγγειακή Νόσο

Με την ανακάλυψη των miRNA έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα μόρια RNA έχουν μια πολύ σημαντική λειτουργία στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας (Ikeda et al., 2007) και του καρδιαγγειακού συστήματος των θηλαστικών γενικά (Zhao et al., 2005). Τα επίπεδα έκφρασης των miRNA έχουν συνδεθεί με απορρύθμιση των αναπτυξιακών διεργασιών και των σταδίων διαφόρων ασθενειών, όπως είναι η υπερτροφία της καρδιάς και η καρδιακή ανεπάρκεια. Πολλά μόρια miRNA εκφράζονται με ιστοειδικό τρόπο και στον ενήλικα καρδιακό ιστό, όπως τα miR-1, miR-16, miR-27b, miR30d, miR-126, miR-133, miR-143 και η οικογένεια των let-7 εκφράζονται σε αφθονία (Thum et al., 2008). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η απορρύθμιση της έκφρασης των μορίων miR-1 και miR-133 σχετίζεται με την καρδιακή ανεπάρκεια στον άνθρωπο (Carè et al., 2007; Ikeda et al., 2007; Yang et al., 2007).

1.6.4. miRNA σε αυτοάνοσα νοσήματα

Χάρη στα αποτελέσματα μελετών σε κυτταρικές καλλιέργειες και πειραματόζωα έχει προκύψει η γνώση ότι τα miRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση φυσιολογικών λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και προλαμβάνουν την αυτοανοσία. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, ασυνήθιστα υψηλή έκφραση των μορίων miR-155 και miR-146 παρατηρήθηκε στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Nakasa et al., 2008). Επίσης, στην περίπτωση του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου, παρατηρήθηκε αρνητική ρύθμιση σε επτά μόρια miRNA και θετική ρύθμιση σε εννέα άλλα μόρια miRNA (βλ. πίνακα 5).

Πίνακας 5: miRNA σε ασθένειες του ανθρώπου όπως υπερτροφία της καρδιάς (Thum et al., 2008), σύνδρομο Down (Kuhn et al., 2008), Νόσος Alzheimer (Lukiw, 2007), Ρευματοειδής αρθρίτιδα (Tili et al., 2008), Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Dai et al., 2007), Ψωρίαση (Bostjancic and Glavac, 2008).

Disease type	miRNA	Up/Down Regulation
Cardiac hypertrophy	miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a, and miR-214	Up
Down syndrome	miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 and miR-802	Up
Alzheimer	miR-9, miR-128a, miR-125b	Up
Rheumatic arthritis	miR-155, miR-146	Up
Systemic lupus erythematosus	miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p, miR 342, miR-299-3p, miR-198 and miR-298	Up
	miR-196a, miR-17-5p, miR- 409-3p, miR-141, miR-383, miR- 112, and miR-184	Down
Psoriasis	miR-203	Up

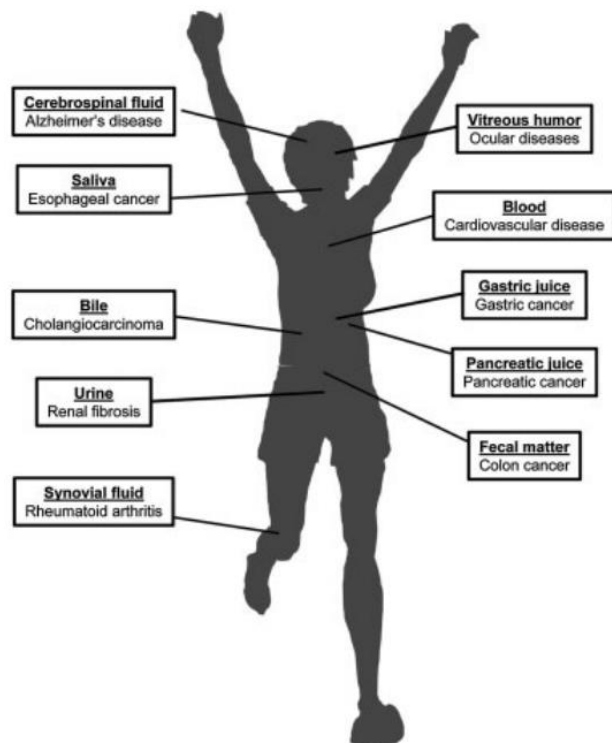
1.6.5. miRNA σε μυοσκελετικές παθήσεις

Οι μυϊκές δυστροφίες αποτελούν μια ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα διαταραχών που περιλαμβάνουν τον εκφυλισμό του σκελετικού μυ. Πρόσφατες έρευνες παρέχουν στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο των miRNA στη ρύθμιση της μυϊκής ανάπτυξης. Οι ρόλοι των miRNA στη μυογένεση έχουν προκύψει, κατά κύριο λόγο, από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα miR-1, miR-133 και miR-206 (McCarthy and Esser, 2007). Μοναδικά μόρια miRNA έχουν ανακαλυφθεί και στη μυϊκή δυστροφία Duchenne (Eisenberg et al., 2009; Eisenberg et al., 2007). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί

ότι βάσει των επιπέδων έκφρασης των miR-381 και miR-382 μπορεί να διαχωριστεί η μυϊκή δυστροφία Duchenne από άλλα είδη μυϊκής δυστροφίας (Eisenberg et al., 2007).

1.6.6. Τα miRNA ως διαγνωστικοί δείκτες

Τα προφίλ έκφρασης των miRNA διαφέρουν μεταξύ των παθολογικών καταστάσεων και των φυσιολογικών ιστών. Πολλαπλές μελέτες φαίνεται πως έχουν χρησιμοποιήσει μόρια miRNA στο πεδίο της διάγνωσης, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με άλλους γνωστούς βιοδείκτες. Αρχικές μελέτες με στόχο τη διερεύνηση της έκφρασης των miRNA χρησιμοποίησαν ιστούς για να καθορίσουν τους λειτουργικούς και διαγνωστικούς ρόλους των miRNA. Ωστόσο, τα σωματικά υγρά είναι πιο άμεσα διαθέσιμα και λιγότερο επεμβατικός ο τρόπος συλλογής τους, σε κάποιες περιπτώσεις τουλάχιστον, σε σχέση με τις βιοψίες. Τα miRNA εκκρίνονται από τα κύτταρα μέσω των εξωσωμάτων και των εξωκυττάρων κυστιδίων (Théry, 2011) και παραμένουν σταθερά στα σωματικά υγρά (Chen et al., 2008). Μόρια miRNA έχουν απομονωθεί από αίμα (ορό και πλάσμα), σάλιο, ούρα, κόπρανα, θυλακικό υγρό, αρθρικό υγρό, παγκρεατικό χυμό και άλλα σωματικά υγρά και μελετώνται ως προς τη χρησιμότητά τους ως βιοδείκτες σε σχετιζόμενες ασθένειες (βλ. Εικόνα 5).



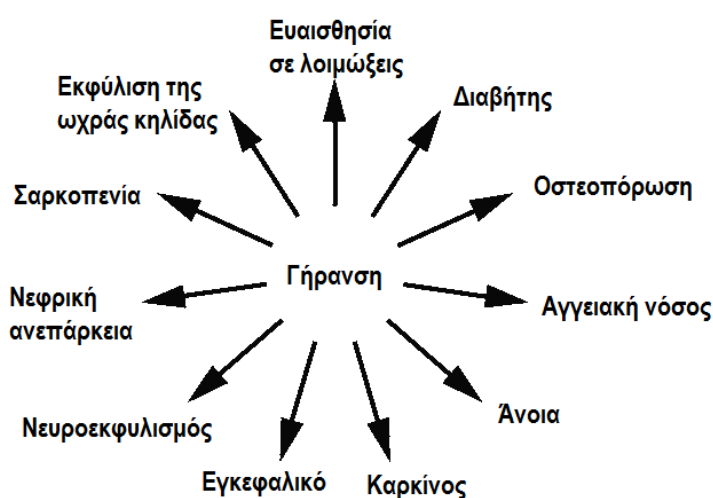
Εικόνα 5: Τα miRNA ως βιοδείκτες και προγνωστικοί παράγοντες. Μόρια miRNA εκκρίνονται σε ποικίλα σωματικά υγρά κι αυτό μπορεί να αλλάξει σε παθολογικές καταστάσεις. Ορισμένα παραδείγματα σωματικών υγρών στα οποία εντοπίζονται μόρια miRNA και οι παθολογικές καταστάσεις με τις οποίες συνδέονται είναι: εγκεφαλονωτιαίο υγρό και νόσος Alzheimer (Valadkhan and

Gunawardane, 2013), υαλώδες και παθήσεις των οφθαλμών (D. P. Bartel, 2009), σάλιο και καρκίνος του οισοφάγου (Dykxhoorn et al., 2003), αίμα και καρδιαγγειακή νόσος (Elbashir et al., 2001), χολή και χολαγγειοκαρκίνωμα (Martinez & Tuschl, 2004), γαστρικό υγρό και γαστρικός καρκίνος (Giraldez et al., 2006), παγκρεατικό υγρό και καρκίνος του παγκρέατος (Baek et al., 2008), ούρα και νεφρική ίνωση (Baek et al., 2008), κόπρανα και καρκίνος παχέος εντέρου (Landgraf et al., 2007), αρθρικό υγρό και ρευματοειδής αρθρίτιδα (Reinhart et al., 2000).

Ένα σχετικό παράδειγμα είναι η μελέτη του προφίλ των miRNA της χολής με στόχο την ανίχνευση χολαγγειοκαρκινώματος σε αρχικά στάδια. Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2014, ανακαλύφθηκε μια ομάδα πέντε μορίων miRNA που μπορούσε να προβλέψει με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα όγκους, σε πολύ αρχικά στάδια, καλύτερα από άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότινος (Li et al., 2014). Επιπλέον, τα miRNA έχουν την ικανότητα να υποδεικνύουν τον κυτταρικό τύπο που αναλύεται. Παραδείγματος χάρη, το πιο γνωστό παράδειγμα miRNA που εντοπίζεται στο συκώτι είναι το miR-122 (Mariana Lagos-Quintana et al., 2002). Το miR-122 παίζει ρόλο στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και στη λοίμωξη από ηπατίτιδα C (Jorling, 2012). Άλλα παραδείγματα ιστο-ειδικών miRNA περιλαμβάνουν τα miR-134 και miR-124a στον εγκέφαλο (Schratt et al., 2006) και τα miR-1 και miR-133 στους μύες (Nielsen et al., 2010).

2. Κεφάλαιο: Κυτταρική γήρανση

Η γήρανση είναι ένας μεγάλος, αν όχι ο κυριότερος, παράγοντας κινδύνου για τις περισσότερες χρόνιες καταστάσεις που περιορίζουν την επιβίωση, την ανεξαρτησία και την ευημερία. Στις καταστάσεις αυτές συγκαταλέγονται η αθηροσκλήρωση, τα περισσότερα είδη καρκίνου, ο διαβήτης και γίνονται ολοένα και πιο κοινές με την αύξηση του πληθυσμού των ηλικιωμένων. Η κυρίαρχη αιτία πίσω από τις ηλικιοεξαρτώμενες διαταραχές είναι η χρόνια, μη μικροβιακή φλεγμονή που αναπτύσσεται σε διάφορους ιστούς. Μια βασική διαδικασία που είναι πιθανό να συμβάλλει στην ανάπτυξη αυτής είναι η κυτταρική γήρανση (Tchkonia et al., 2013).



Εικόνα 6: Η γήρανση είναι ο κυρίαρχος παράγοντας κινδύνου για τις περισσότερες σοβαρές χρόνιες ασθένειες και αναπηρίες, όπως τα εγκεφαλικά, η καρδιακή νόσος, ο καρκίνος, η άνοια, η οστεοπόρωση, η αρθρίτιδα, ο διαβήτης, το μεταβολικό σύνδρομο, η νεφρική ανεπάρκεια, η τύφλωση και η αδυναμία. (Tchkonia et al., 2013).

Ουσιαστικά, με τον όρο κυτταρική γήρανση αναφερόμαστε στη μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου. Εκτός της μόνιμης παύσης της αντιγραφής, τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν επίσης ανθεκτικότητα στην απόπτωση, συχνά, αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση, μεταβολικές ανισορροπίες, αυξημένη γλυκόλυση και μειωμένη οξείδωση λιπαρών οξέων, αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) και την απόκτηση ενός εκκριτικού φαινοτύπου που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence Associated Secretory Phenotype-SASP) (Le Brasseur et al., 2015; Tchkonia et al., 2013). Είναι εύκολο να αντιληφθεί κανείς ότι ο ορισμός της κυτταρικής γήρανσης είναι κάπως αόριστος, ιδιαίτερα εφόσον αρκετοί πιθανά προ-φλεγμονώδεις κυτταρικοί τύποι, όπως τα μακροφάγα ή οι οστεοκλάστες,

καθώς και τα προ-καρκινικά ή τα καρκινικά κύτταρα μοιράζονται αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με τα γηρασμένα κύτταρα (Hall et al., 2016).

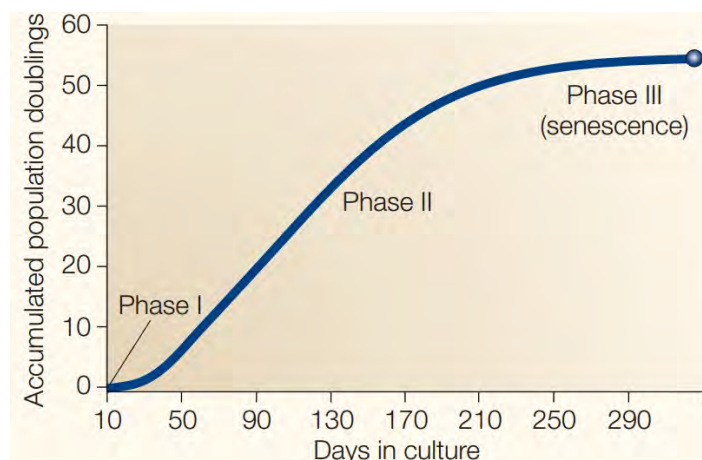


Εικόνα 7: Η διακοπή της διασταύρωσης/τομής ανάμεσα στους κύριους μηχανισμούς γήρανσης και τις διεργασίες που οδηγούν σε χρόνιες ασθένειες μπορεί να καθυστερήσουν τις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες και συνεπώς, να επιμηκύνουν το προσδόκιμο ζωής. Το αυξανόμενο φορτίο των γηρασμένων κυττάρων μπορεί να συμβάλει στην πρόωπη αιτιολογία των ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών και να επιταχύνει την πρόοδο αυτών των ασθενειών μετά την εμφάνισή τους. Η παθολογία των χρόνιων ασθενειών σε συνδυασμό με την εξάπλωση της γήρανσης στα γειτονικά υγιή κύτταρα, μπορεί να ωθήσουν την περαιτέρω κυτταρική γήρανση. Συνεπώς, μπορεί να συμβάλουν σε μια κατακόρυφη αύξηση φλεγμονής και δυσλειτουργίας (Tchkonina et al., 2013).

2.1. Το όριο του Hayflick

Περίπου 60 χρόνια πριν, ο Leonard Hayflick ανακάλυψε ότι φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα σε καλλιέργεια έχουν περιορισμένη ικανότητα διαίρεσης, μετά την οποία γερνούν – ένα φαινόμενο που έγινε γνωστό και ως «το όριο του Hayflick» (Burnet, 1974). Την εποχή εκείνη, τα ευρήματά του θεωρήθηκαν πολύ προκλητικά, αλλά τα επιτεύγματά του επέτρεψαν σε άλλους επιστήμονες να πραγματοποιήσουν πολύ σημαντική πρόοδο σχετικά με την κατανόηση και το χειρισμό των μοριακών μηχανισμών της γήρανσης (Shay and Wright, 2000). Πιο συγκεκριμένα, κατέληξε σε αυτή την ανακάλυψη αφού το 1961 ξεκίνησε να συνεργάζεται με έναν ταλαντούχο κυτταρογενετιστή, τον Paul Moorhead. Πραγματοποίησαν μαζί μια σειρά πειραμάτων τα οποία ανέτρεψαν τις μέχρι τότε ισχύουσες θεωρίες, ότι δηλαδή τα κύτταρα σε μια καλλιέργεια μπορούν να διαιρούνται επ’ άπειρον αν τους παρέχονταν οι κατάλληλες συνθήκες. Έδειξαν ότι πληθυσμοί φυσιολογικών καλλιεργούμενων ανθρώπινων ινοβλαστών διπλασιάστηκαν έναν πεπερασμένο αριθμό φορών, μετά τον οποίο σταμάτησαν να διαιρούνται και μπήκαν σε αυτό που ορίστηκε από τον Hayflick ως το

φαινόμενο φάσης III ή κυτταρική γήρανση (Hayflick and Moorhead, 1961; Shay and Wright, 2000).



Εικόνα 8: Στο διάγραμμα αυτό απεικονίζεται ο διπλασιασμός του πληθυσμού των καλλιεργούμενων κυττάρων σε συνάρτηση με τις ημέρες καλλιέργειάς του. Η φάση I (phase I) είναι η αρχική καλλιέργεια. Η φάση II (phase II) αναπαριστά τα κύτταρα κατά την περίοδο εκθετικού πολλαπλασιασμού. Η φάση III (phase III) αναπαριστά την περίοδο όπου η κυτταρική αναπαραγωγή σταματά, αλλά ο μεταβολισμός συνεχίζει. Τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν σε αυτή τη φάση για ένα χρόνο περίπου προτού πεθάνουν (Shay and Wright, 2000).

2.2 Αναδιπλασιαστική και πρόιμη γήρανση

Η γήρανση έχει μελετηθεί εκτεταμένα χρησιμοποιώντας πρόιμα κύτταρα που καλλιεργούνται *ex vivo* μέχρι να σταματήσουν να διαιρούνται. Αυτή η διεργασία είναι γνωστή ως αναδιπλασιαστική γήρανση (Hayflick, 1992). Επιπροσθέτως, γήρανση μπορεί να επιτευχθεί μέσω έκθεσης των κυττάρων σε ποικίλους υποθανατηφόρους καταστροφικούς παράγοντες, διεργασία που είναι γνωστή ως πρόιμη γήρανση. Γνώση γι' αυτές τις δύο διεργασίες έχει συμπληρωθεί από μελέτες πάνω στη γήρανση *in vivo* και την επίδρασή της στη φυσιολογία και την παθολογία (Munk et al., 2018).

Αναδιπλασιαστική γήρανση επιτυγχάνεται σε πρόιμα κύτταρα που απομονώνονται από ιστούς και μπαίνουν σε καλλιέργεια. Στην πάροδο του χρόνου, ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού τους αυξάνεται σταδιακά μέχρι που σταματούν οριστικά να πολλαπλασιάζονται. Ταυτόχρονα, τα τελομερή, που προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων και επιτρέπουν στην DNA πολυμεράση να ολοκληρώσει την αντιγραφή, γίνονται σταδιακά όλο και πιο κοντά και τελικά επάγουν την απόκριση στη βλάβη του DNA (DDR, DNA damage response) οδηγώντας σε παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και γήρανση (Kuilman et al., 2010). Τα κοντά, απροστάτευτα τελομερή ενεργοποιούν διάφορους καθοδικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των κινασών ATM και ATR, CHK1 και CHK2 και του ογκοκαταστολέα και

μεταγραφικού παράγοντα p53 (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Herbig et al., 2004). Στη συνέχεια, η p53 επάγει μεταγραφικά την έκφραση του αναστολέα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDKN1A-p21 και την εναλλακτική πρωτεΐνη ARF, ενεργοποιώντας τον άξονα p53/21 που αναστέλλει την αντιγραφή (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Campisi, 2005). Η αναδιπλασιαστική γήρανση εδραιώνεται περαιτέρω από τον άξονα CDKN2A (p16)/RB, που αποτελείται από την πρωτεΐνη RB, η οποία ενεργοποιείται από τον αναστολέα CDK, p16 (CDKN2A/INK4A) και τις συναφείς πρωτεΐνες p15 (INK4B), p18 (INK4C) και p19 (INK4D).

Η **πρώιμη γήρανση**, η οποία είναι γνωστή και ως γήρανση που επάγεται από στρες, μπορεί να επιτευχθεί ταχύτατα εκθέτοντας τα κύτταρα σε στρεσογόνους παράγοντες όπως ακτινοβολία, οξειδωτικό στρες, τοξίνες, χημειοθεραπεία, ενεργοποίηση ογκοπρωτεϊνών ή μέσω απενεργοποίησης ογκοκαταστολέων. Αυτά τα επιβλαβή ερεθίσματα επάγουν γήρανση μέσω ενεργοποίησης σημάτων στρες όπως απόκριση στις βλάβες του DNA. Η ακόλουθη παύση της ανάπτυξης από αναστολείς CDK και οι αλλαγές στην ετεροχρωματίνη συμβαίνουν χωρίς προφανή απώλεια της λειτουργίας των τελομερών (Kuilman et al., 2010). Πρώιμη γήρανση μπορεί να προκληθεί από ενεργοποίηση ογκοπρωτεϊνών, όπως οι KRAS (V12) και BRAF (V600E), κι επίσης από απενεργοποίηση ογκοκαταστολέων, όπως οι PTEN, VHL και NF1 (Gorospe and Abdelmohsen, 2011). Αν και η εκτοπική έκφραση τελομεράσης μπορεί να επαναφέρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση, δε μπορεί να αποτρέψει την πρώιμη γήρανση (Wei et al., 1999). Για την εγκαθίδρυση της πρώιμης γήρανσης, ενεργοποιούνται τα μονοπάτια p53/p21 και p16/RB, όπως περιγράφεται και σε πρόσφατη έρευνα (Loaiza and Demaria, 2016).

2.3 Πότε προκύπτει κυτταρική γήρανση

Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι πολλών ειδών ογκογόνα ή στρεσογόνα ερεθίσματα μπορούν να επάγουν την κυτταρική γήρανση. Πρώτα απ' όλα, σ' αυτά εντάσσονται συγκεκριμένοι τύποι βλαβών DNA, όπως θραύσεις (μονής ή διπλής έλικας) του DNA και οξειδωτικές αλλοιώσεις που προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, γενετικά ελαττώματα ή ενδογενείς διεργασίες (Di Leonardo et al., 1994; Hasty et al., 2003; Samper et al., 2003). Η κυτταρική γήρανση επάγεται όταν η βλάβη που έχει υποστεί το κύτταρο δε μπορεί να επιδιορθωθεί ή απειλεί να υπερισχύσει του μηχανισμού επιδιόρθωσης DNA. Επιπροσθέτως, πολλά φυσιολογικά κύτταρα γερνούν

όταν υπερεκφράζουν ορισμένα ογκογονίδια, όπως ενεργοποιημένα συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS-RAF-MEK (Bringold and Serrano, 2000; Lundbergetal., 2000; Narita and Lowe, 2004). Σε αυτές τις περιπτώσεις, φαίνεται ότι τα υπερφυσιολογικά μιτογόνα σήματα που προκύπτουν από την υπερέκφραση των ογκογονιδίων ευθύνονται για την πρόκληση της απόκρισης γήρανσης. Τέλος, τα κύτταρα μπορεί να υποστούν γήρανση ως απόκριση σε επιγενετικές αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης, σαν αυτή που προκαλείται λόγω φαρμακευτικών παραγόντων ή λόγω αλλαγής στην έκφραση πρωτεϊνών που τροποποιούν το DNA ή τις ιστόνες (Neumeister et al., 2002; Bandyopadhyay and Medrano, 2003; Narita and Lowe, 2004). Τέτοιου είδους αλλαγές μπορεί να τροποποιήσουν την έκφραση πρωτοογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων και απαντώνται συχνά σε κακοήθεις όγκους. Συνεπώς, η κυτταρική γήρανση προλαμβάνει την αύξηση κυττάρων που υποβάλλονται σε κάποιου είδους δυνητικά ογκογόνο ερέθισμα και ως εκ τούτου συχνά η κυτταρική γήρανση αναφέρεται ως φραγμός στον καρκινικό μετασχηματισμό (Campisi, 2005).

2.4. Χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων

Τα γηρασμένα κύτταρα διαφέρουν από άλλα μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως τα αδρανή ή τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα, ως προς διάφορους βιοδείκτες και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα γηρασμένα κύτταρα *in vivo* διατηρούν τη φυσιολογική μορφολογία που υπαγορεύει η αρχιτεκτονική των ιστών, σε αντίθεση με τα γηρασμένα κύτταρα σε καλλιέργεια *in vitro*, τα οποία γίνονται μεγαλύτερα σε μέγεθος, περιέχουν ένα ή περισσότερα κενοτόπια και συνήθως πάνω από έναν πυρήνα. Η χρήση ενός συνδυασμού δεικτών είναι κοινώς αποδεκτή για τον καθορισμό της γήρανσης καλλιεργούμενων κυττάρων αλλά και ιστών. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η ιστοχημική ανίχνευση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σε pH 6.0, γνωστή και ως SABGAL (β-γαλακτοσιδάση σχετιζόμενη με τη γήρανση) (G. P. Dimri et al., 1995). Η ενεργότητα αυτή βασίζεται στο αυξημένο περιεχόμενο των λυσοσωμάτων των γηρασμένων κυττάρων που αντανακλά την αυξημένη αυτοφαγία που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα αυτά με ταυτόχρονη μεγέθυνση του διαμερίσματος των λυσοσωμάτων (Young et al., 2009; Kurz et al., 2000). Καθώς, η κυτταρική γήρανση βασίζεται στη σταθερή διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης, η απουσία πολλαπλασιαστικών δεικτών, όπως η πρωτεΐνη Ki67 ή η ενσωμάτωση της 5-

βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU), είναι μια απαραίτητη συνθήκη για την καταγραφή της γήρανσης. Επίσης, οι πιο κοινοί μεσολαβητές της γήρανσης, όπως οι πρωτεΐνες p16, ARF, p53, p21, p15, p27 και η υποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (RB) αποτελούν κι αυτοί με τη σειρά τους δείκτες κυτταρικής γήρανσης. Επιπροσθέτως, εστίες ετεροχρωματινής αποτελούν χαρακτηριστικό γηρασμένων κυττάρων και είναι γνωστές και ως ετεροχρωματινικές εστίες που σχετίζονται με τη γήρανση (SAHF) (Zhang et al., 2005; Narita et al., 2003). Οι SAHF δημιουργούνται, κατά κύριο λόγο, κατά τη διάρκεια της γήρανσης που επάγεται από ογκογονίδια και όχι κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση (Di Micco et al., 2011; Scaffidi and Misteli, 2006). Επιπλέον, τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν πολυάριθμους, εξωκυτταρικούς παράγοντες, όπως ο TGFβ, πρωτεΐνες που προσδένονται στον IGF1, PAI1 και φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χυμοκίνες που έχουν την ικανότητα να ενισχύουν και να προάγουν τη γήρανση με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο (Acosta et al., 2013; Kuilman and Peeper, 2009; Kuilman et al., 2008). Άλλοι δείκτες που είναι συχνά παρόντες σ' αυτά τα κύτταρα είναι οι πρωτεΐνες TNFRSF10D και TNFRSF10C (Collado et al., 2005). Μια μείωση στα επίπεδα της λαμίνης B1 έχει, επίσης, βρεθεί ως κοινό χαρακτηριστικό πολλών τύπων κυτταρικής γήρανσης (Freund et al., 2012; Shimi et al., 2011). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι δείκτες γήρανσης που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν επιβεβαιωθεί *in vivo*, σε συσχέτισμό με προ-κακοήθεις όγκους (Collado and Serrano, 2010) αλλά και με αναπτυξιακές, φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Αν και κανείς από τους παραπάνω δείκτες δεν είναι από μόνος του ειδικός ή παγκόσμιος για όλους τους τύπους γηρασμένων κυττάρων, υπάρχει η επικρατούσα άποψη ότι τα γηρασμένα κύτταρα εκφράζουν τους περισσότερους από αυτούς τους δείκτες (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

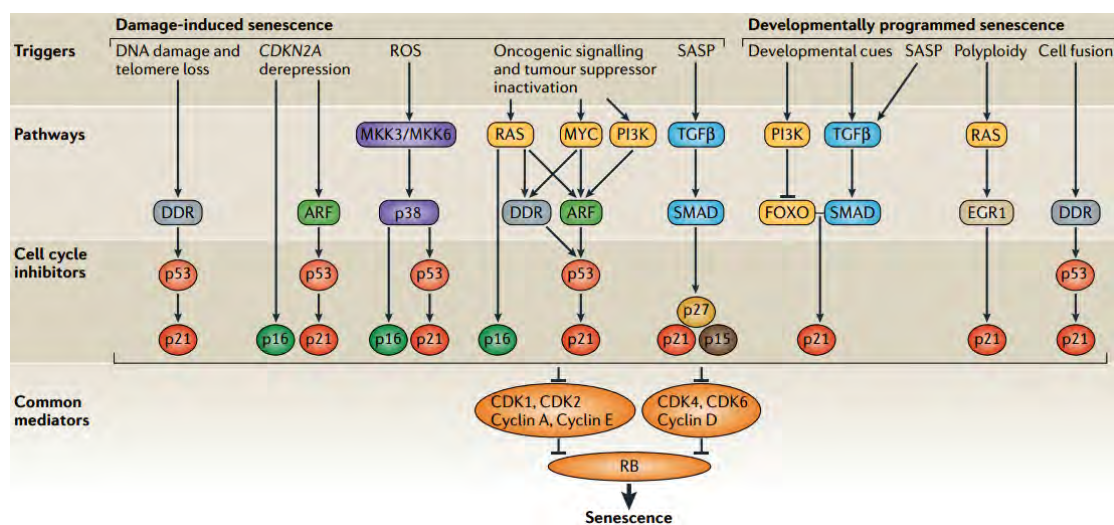
Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τις προηγούμενες δεκαετίες υπογραμμίζουν ότι η γήρανση έχει ωφέλιμους και καταστροφικούς ρόλους. Εν γένει, μία παροδική επαγωγή κυτταρικής γήρανσης, που οδηγεί σε αναδιαμόρφωση ιστών, συμβάλλει στην εξάλειψη των κατεστραμμένων κυττάρων άρα θεωρείται ωφέλιμη. Αντιθέτως, διαρκής γήρανση ή ανικανότητα εξάλειψης κατεστραμμένων κυττάρων μπορεί να είναι καταστροφική. Φαίνεται πως η κυτταρική γήρανση και η απόπτωση μοιάζουν εννοιολογικά αφού ο βιολογικός σκοπός και των δύο είναι η εξάλειψη άχρηστων κυττάρων. Είναι οι δύο πιο σημαντικοί μηχανισμοί εξάλειψης κατεστραμμένων κυττάρων κάτι που έχει ιδιαίτερη σημασία και στον καρκίνο αλλά και στη γήρανση

του οργανισμού. Η κυτταρική γήρανση αποτελεί κρίσιμο φραγμό στην πρόοδο του καρκίνου και τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται με την αύξηση της ηλικίας (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

2.5. Μηχανισμοί γήρανσης

Ο αριθμός των ερεθισμάτων που επάγουν γήρανση και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Αυτά τα ερεθίσματα ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, πολλά εκ των οποίων ενεργοποιούν την πρωτεΐνη **p53**, όπου στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *TP53*, και ουσιαστικά όλα συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (CDK): **p16**, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN2A*, **p15**, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN2B*, **p21**, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN1A*, και **p27**, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN1B*. Η αναστολή των συμπλεγμάτων κυκλίνης – CDK έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του πολλαπλασιασμού, και κρίσιμο στοιχείο της εκτέλεσης της γήρανσης είναι η υπο-φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης ρετινοβλαστώματος (RB) (Chicas et al., 2010). Εκτός, λοιπόν, από τα πολλαπλά ερεθίσματα και τα μονοπάτια που ενεργοποιούν την κυτταρική γήρανση, είναι πιθανό οι μηχανισμοί που εν τέλει οδηγούν σ' αυτή να ποικίλλουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις εκάστοτε συνθήκες.

Η Εικόνα 9 αποτελεί μια σχηματική αναπαράσταση των κύριων μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται στη γήρανση, τα οποία θα αναλυθούν και με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω.



Εικόνα 9: Μοριακά μονοπάτια γήρανσης (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

2.5.1. Κόντεμα τελομερών και απόκριση στις βλάβες του DNA

Τα τελομερή, στα οποία αναφερθήκαμε και παραπάνω, είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που λειτουργούν ως μοριακά ρολόγια που καταγράφουν την αναπαραγωγική ιστορία των κυττάρων (Harley et al., 1990). Όταν ένα κύτταρο διαιρείται, τα τελομερή δεν αντιγράφονται με τον ίδιο τρόπο που αντιγράφεται το υπόλοιπο γονιδίωμα. Συντίθενται από ένα ένζυμο που ονομάζεται **τελομεράση**. Επειδή από πολλά είδη ανθρώπινων κυττάρων λείπει η τελομεράση, τα τελομερή των χρωμοσωμάτων τους κονταίνουν με κάθε κυτταρική διαίρεση, κάτι που το κύτταρο εκλαμβάνει ως βλάβη του DNA, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο μηχανισμός απόκρισης σε βλάβες του DNA, ο οποίος μοιάζει με αυτόν που επάγεται από εξωτερικούς παράγοντες που προκαλούν την καταστροφή του DNA, όπως παραδείγματος χάρη η ιοντίζουσα ακτινοβολία και τα φάρμακα χημειοθεραπειών (Muñoz-Espín and Serrano, 2014; Albertsetal., 2008). Εκτός από το κόντεμα τους, τα τελομερή είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα σε εξωτερική καταστροφή DNA (Parrinello et al., 2003; Passos et al., 2010), που εν μέρει οφείλεται στο γεγονός ότι, από το μήκητα μέχρι τον άνθρωπο, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών του DNA δεν έχει εύκολα πρόσβαση στα τελομερή ώστε να τα επιδιορθώσει (Fumagalli et al., 2012).

Οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι διαθέτουν έναν ενσωματωμένο περιορισμό ως προς τον αριθμό των φορών που μπορούν να διαιρεθούν. Όταν πλησιάζουν τον περιορισμό αυτό, παρατηρείται επιβράδυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού την οποία διαδέχεται η διακοπή του. Τα κύτταρα, τότε, εισέρχονται σε μια μη διαιρούμενη κατάσταση από την οποία δε επανέρχονται ποτέ, φαινόμενο που, όπως προαναφέρθηκε, ονομάζεται **αναδιπλασιαστική κυτταρική γήρανση**. Αυτού του είδους η κυτταρική γήρανση, στους ανθρώπινους ινοβλάστες, φαίνεται να προκαλείται από αλλαγές στη δομή των τελομερών και των σχετιζόμενων με αυτά πρωτεϊνών στις άκρες των χρωμοσωμάτων (Albertsetal., 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν ανακτήσει την δράση τελομεράσης, κι έχουν, συνεπώς διατηρήσει τη λειτουργία των τελομερών καθώς πολλαπλασιάζονται, με αποτέλεσμα να μην υφίστανται αναδιπλασιαστική κυτταρική γήρανση (Campisi, 2005).

2.5.2 Αναίρεση της αναστολής του CDKN2A

Η αναδιπλασιαστική γήρανση συνδέεται επίσης και με το γενετικό τόπο *CDKN2A* ο οποίος κωδικοποιεί δύο πολύ κρίσιμους ογκοκαταστολείς, τις πρωτεΐνες p16 και ARF

(Εικόνα 9) . Ενώ η p16 δρα ως αναστολέας των κινασών CDK4 και CDK6, η πρωτεΐνη ARF, ρυθμίζει τη σταθερότητα της p53 μέσω απενεργοποίησης της λιγάσης MDM2. Σε νεαρούς ιστούς, ο τύπος *CDKN2A* υπό φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα αλλά η γήρανση προκαλεί την αναίρεση της αναστολής του μέσω μοριακών μηχανισμών που δεν έχει κατανοήσει πλήρως ακόμη η επιστημονική κοινότητα. Η καταστροφή του DNA μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της πρωτεΐνης ARF μέσω επαγωγής της αποδόμησής της (Giland Peters, 2006; Kim and Sharpless, 2006).

2.5.3. Γήρανση επαγόμενη από στρες και δραστικά είδη οξυγόνου

Τα επίπεδα των δραστικών ειδών οξυγόνου αυξάνονται μετά από πολλούς διαφορετικούς τύπους στρες, όπως οι χημειοθεραπείες, η έλλειψη των προστατευτικών λειτουργιών των τελομερών, η καταστροφή του DNA και η ενεργοποίηση ογκογονιδίων (Debacq-Chainiaux et al., 2010; Passos et al., 2009). Ο σχετικός ρόλος του οξειδωτικού στρες στη γήρανση καταδεικνύεται από το γεγονός ότι θεραπεία με αντιοξειδωτικά καθυστερεί ή αποτρέπει τη γήρανση. Μηχανιστικά, υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα δραστικών ειδών οξυγόνου που επάγονται από τον καταρράκτη RAS-RAF-MEK-ERK ενεργοποιούν την πρωτεΐνη MAPK, p38, η οποία οδηγεί σε αυξημένη μεταφραστική ενεργότητα της p53 αύξηση των επιπέδων της p21 και κατ' επέκταση αναστολή του κυτταρικού κύκλου (βλ. Εικόνα 9) (Sun et al., 2007).

2.5.4. Γήρανση επαγόμενη από ογκογονίδια

Τα φυσιολογικά κύτταρα αποκρίνονται στην ενεργοποίηση πολλών ογκογονιδίων με το να υφίστανται κυτταρική γήρανση. Η γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια παρατηρήθηκε για πρώτη φορά όταν μια ογκογόνος μορφή της RAS εκφράστηκε σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Serrano et al., 1997). Ωστόσο, αρκετά χρόνια αργότερα, η λίστα με τα ογκογονίδια που είναι ικανά να επάγουν κυτταρική γήρανση έχει αυξηθεί αρκετά (Gorgoulis and Halazonetis, 2010). Ομοίως, η έλλειψη ογκοκαταστολέων μπορεί να επάγει κυτταρική γήρανση, όπως παραδείγματος χάρη στις περιπτώσεις έλλειψης των PTEN (Alimonti et al., 2010), NF1 (Courtois-Coxetal., 2006), VHL (Young et al., 2008). Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί το ότι έχει αποδειχθεί πως η γήρανση που επάγεται από ογκογονίδια λαμβάνει χώρα *in vivo*, λειτουργώντας ως ένα φρένο στα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης (Collado and Serrano, 2010). Ένα γενικό

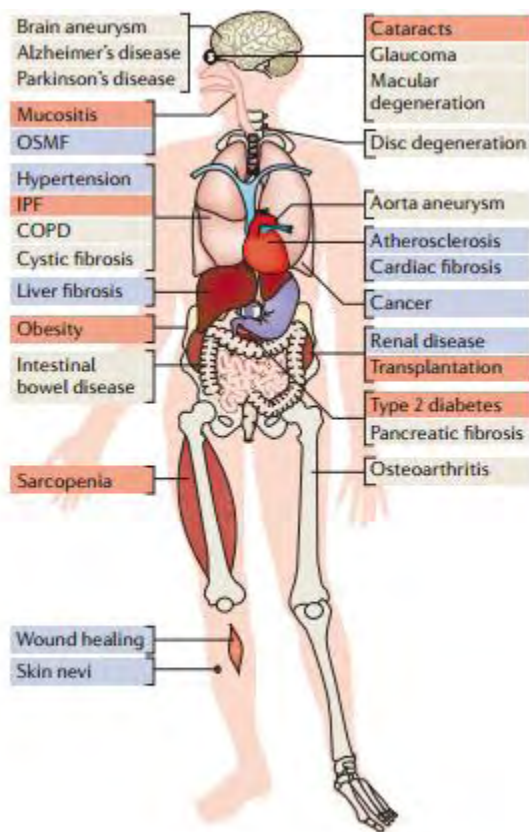
χαρακτηριστικό αυτού του τύπου επαγωγής γήρανσης είναι η αναίρεση της αναστολής του γενετικού τόπου *CDKN2A* (Gil and Peters, 2006; Kim and Sharpless, 2006). Επιπροσθέτως, αυτού του είδους γήρανση μπορεί να επάγει ισχυρή ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόκρισης στις βλάβες του DNA που προκαλείται από την ασυνήθιστη αντιγραφή DNA (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006) ή/και δραστικά είδη οξυγόνου (Debacq-Chainiaux et al., 2010; Passos et al., 2009) (βλ. Εικόνα 8). Η σχετική σημασία των μηχανισμών αυτών (p16, ARF, p53 που επάγεται από DDR) ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων τύπων ιστού.

2.5.5. Εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (Senescence-associated secretory phenotype, SASP)

Τα γηρασμένα κύτταρα βρίσκονται σε μια πολύπλοκη προ-φλεγμονώδη κατάσταση η οποία είναι γνωστή ως εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με τη γήρανση (SASP) (Campisi, 2013; Coppé et al., 2010; Evan and d'Adda di Fagagna, 2009; Kuilman and Peeper, 2009). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9, ο SASP μεσολαβείται από τον μεταφραστικό παράγοντα NF-κB και την πρωτεΐνη CEBPβ. Περιλαμβάνει την έκκριση προ-φλεγμονοδών κυτοκινών (IL-6, IL-8), χημοκινών (πρωτεΐνες MCP και MIP), αυξητικών παραγόντων (TGFβ, GM-CSF) και πρωτεασών. Η έκκριση αυτών κι άλλων παρόμοιων πρωτεϊνών από τα γηρασμένα κύτταρα προκαλεί φλεγμονή και, τουλάχιστον, σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκκαθάριση των κυττάρων αυτών μέσω φαγοκυττάρωσης (Hoenicke and Zender, 2012; Xue et al., 2007). Τα συστατικά του SASP, και κυρίως ο TGFβ, μπορούν να πυροδοτήσουν γήρανση και στα γειτονικά κύτταρα με έναν παρακρινή τρόπο, μέσω ενός μηχανισμού που παράγει δραστικά είδη οξυγόνου και βλάβες στο DNA (Acosta et al., 2013; Hubackova et al., 2012; Nelson et al., 2012). Συνεπώς, ο σχετιζόμενος με τη γήρανση εκκριτικός φαινότυπος, SASP, έχει ισχυρές αυτοκρινείς και παρακρινείς ενεργότητες, γεγονός που προτείνει ότι η γήρανση δημιουργεί ένα φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον που μπορεί να οδηγεί εν τέλει στην εξάλειψη των γηρασμένων κυττάρων (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

2.6 Ο ρόλος της γήρανσης σε διάφορες ασθένειες.

Η γήρανση είναι ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και σε ενήλικους οργανισμούς με προγραμματισμένο τρόπο. Σε φυσιολογικά πλαίσια, η γήρανση είναι απαραίτητη για τη μορφογένεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Επιπλέον, παίζει πολύ καθοριστικό ρόλο κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωση βλαβών, καθώς οι γηρασμένοι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα, που επάγονται από την πληγή, εκκρίνουν τον παράγοντα PDGF-AA, ο οποίος επιταχύνει τη διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών, την επούλωση της πληγής και την επιδιόρθωση του ιστού (Demaria et al., 2014). Εκτός αυτών, τα γηρασμένα κύτταρα έχουν συσχετιστεί και με πολλαπλές παθολογικές διεργασίες στις οποίες η γήρανση μπορεί να έχει ωφέλιμες αλλά και καταστροφικές επιδράσεις (βλ. Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Παθολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τη γήρανση που επάγεται από την καταστροφή. Ασθένειες στις οποίες η γήρανση έχει γνωστούς ωφέλιμους ρόλους απεικονίζονται σε μπλε πλαίσιο (Στοματική Υποβλενογονία Ίνωση, Υπέρταση, Κίρρωση του ήπατος, Αθηροσκλήρωση, Καρδιακή Ίνωση, Καρκίνος, Νεφρική Νόσος, επούλωση τραυμάτων, δερματικοί σπίλοι), ενώ αυτές στις οποίες έχει γνωστούς καταστροφικούς ρόλους απεικονίζονται σε κόκκινο πλαίσιο (Βλεννογονίτιδα, Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση, Παχυσαρκία, Σαρκοπενία, Καταρράκτης, Μεταμόσχευση, Διαβήτης Τύπου II). Με γκρι απεικονίζονται ασθένειες στις οποίες δεν έχει καθοριστεί αν είναι ωφέλιμος ή καταστροφικός ο ρόλος της γήρανσης (Ανεύρυσμα εγκεφάλου, Νόσος Alzheimer, Νόσος Parkinson, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, Φλεγμονώδης νόσος εντέρου, Γλαύκωμα, Εκφύλιση ωχράς κηλίδας, Εκφύλιση δίσκου, Ανεύρυσμα αορτής, Παγκρεατική Ίνωση, Οστεοαρθρίτιδα) (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

2.6.1. Ο ωφέλιμος ρόλος της γήρανσης

Έχει αποδειχτεί ότι η γήρανση μπορεί να έχει ωφέλιμο ρόλο σε διάφορες περιπτώσεις ασθενειών. Αρχικά, αξίζει να αναφερθεί ότι δρα ενάντια στην πρόοδο του καρκίνου (Collado & Serrano, 2010). Κατά τα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης, η ογκογόνος σηματοδοτική ροή αυξάνεται σταδιακά έως ότου φτάσει σε ένα κατώφλι που ενεργοποιεί τα μονοπάτια-κλειδιά καταστολής των p16 και p53 (βλ. Εικόνα 9). Όταν συμβαίνει αυτό, οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου αντισταθμίζουν το ογκογονικό σηματοδοτικό μονοπάτι και τα κύτταρα εισέρχονται σε γήρανση, η οποία αποτρέπει την επέκταση των προ-καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν αδιάσειστα αποδεικτικά

στοιχεία σχετικά με το ότι τα κύτταρα που υφίστανται, επαγόμενη από τις βλάβες του DNA, γήρανση, μπορούν να αφαιρεθούν από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Hoenicke and Zender, 2012; Kang et al., 2011; Xue et al., 2007). Τα τελευταία ενεργοποιούνται μέσω της αναγνώρισης των γηρασμένων κυττάρων από τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και της στρατολόγησης φλεγμονοδών φαγοκυττάρων (Xue et al., 2007), τα οποία προσελκύονται από παράγοντες του SASP (Campisi, 2013; Coppé et al., 2010; Kuilman and Peeper, 2009).

Επιπλέον, βοηθά στην υποχώρηση της ηπατικής ίνωσης (Borkham-Kamphorst et al., 2014; Kim et al., 2013; Krizhanovsky et al., 2008; Wiemann et al., 2002). Η ηπατική ίνωση, ως προάγγελος της κίρρωσης, χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ινώδους ιστού και την ταυτόχρονη έλλειψη της ηπατικής λειτουργίας. Πυροδοτείται από τη χρόνια ηπατική καταστροφή που σχετίζεται με λοίμωξη από ιό ηπατίτιδας, κατάχρηση αλκοόλ ή λιπώδη διήθηση (λιπώδης νόσος του ήπατος). Σε περιπτώσεις χρόνιας βλάβης, τα ηπατικά αστροκύτταρα (HSCs) ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται με ασυνήθιστο τρόπο όπως οι μυοϊνοβλάστες, κατηγορία ινοβλαστών που ενεργοποιούνται από την κυτταρική καταστροφή. Εντέλει, αυτοί οι μυοϊνοβλάστες γερνούν και παράγουν μία σταθερή ινώδη ουλή με επαρκές κολλαγόνο κι άλλα συστατικά εξωκυττάριας μήτρας. Το πώς γερνούν τα ηπατικά αστροκύτταρα σχετίζεται με τον SASP, την προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, την εκκαθάριση των γηρασμένων HSC από τα κύτταρα-φυσικούς φονιάδες και τη μερική εξάλειψη των ινωδών ουλών (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Η γήρανση μπορεί να μειώσει τις δερματικές ουλές και την στοματική ίνωση (Jun and Lau, 2010b, 2010a; Pitiyage et al., 2011). Η δερματική ίνωση είναι μέρος της διαδικασίας της επούλωσης πληγών και δείχνει αξιοσημείωτες ομοιότητες με την ηπατική ίνωση.

Μπορεί, επίσης, να απαλύνει τη νεφρική ίνωση (Wolstein et al., 2010). Στην περίπτωση των νεφρών, έχει παρατηρηθεί η αυξημένη ενεργότητα των μονοπατιών γήρανσης σε πολλαπλές νεφρικές ασθένειες (Naesens, 2011).

Χάρη στη γήρανση, μπορεί να περιοριστεί η καρδιακή ίνωση μετά από έμφραγμα. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου προάγει τη συσσώρευση γηρασμένων μυοϊνοβλαστών στην καρδιά και την έκφραση ρυθμιστών-κλειδιών της γήρανσης, οι οποίοι μειώνουν την παραγωγή κολλαγόνου και την καρδιακή ίνωση (Zhu et al., 2013).

Έχει αποδειχτεί ότι η γήρανση παρέχει προστασία ενάντια στην αθηροσκλήρωση (Erusalimsky, 2009; Fyhrquist et al., 2013; Minamino et al., 2002; Wang and Bennett, 2012) αλλά και την πνευμονική υπέρταση (Noureddine et al., 2011).

2.6.2 Ο καταστροφικός ρόλος της γήρανσης

Παράλληλα, η γήρανση μπορεί να έχει καταστροφικό ρόλο σε άλλες περιπτώσεις ασθενειών. Η γήρανση είναι ξεκάθαρο ότι έχει αρνητική επίδραση στη λειτουργία αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, σχετίζεται με το κόντεμα των τελομερών τους και τις αυξημένες βλάβες στο DNA καθώς και τη θετική ρύθμιση των αναστολέων κυτταρικού κύκλου (Geiger et al., 2013). Έχει βρεθεί ότι η κυτταρική γήρανση εμπλέκεται στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση, μια χρόνια και ουσιαστικά θανάσιμη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από προοδευτική έλλειψη πνευμονικής λειτουργίας (Alder et al., 2008; Armanios et al., 2007).

Επίσης, η γήρανση των λιποκυττάρων έχει συνδεθεί με την παχυσαρκία. Η υπερβολική πρόσληψη θερμίδων ή οι χαμηλές ενεργειακές δαπάνες μπορεί να οδηγήσουν στην αποθήκευση ενέργειας στο λιπώδη ιστό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αποθηκευτική ικανότητα του λιπώδους ιστού να φτάνει σε ένα κατώφλι που επάγει απόκριση λόγω στρες και τη στρατολόγηση των μακροφάγων, η οποία με τη σειρά της εισάγει έναν καταρράκτη γεγονότων με συστημικές παθολογικές συνέπειες, όπως η λιπώδης διήθηση του ήπατος και η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη, που αποτελούν ορόσημα του μεταβολικού συνδρόμου (Gregor and Hotamisligil, 2011).

Μια ακόμη ασθένεια στην οποία συμβάλλει η γήρανση είναι ο διαβήτης τύπου II. Η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη που οφείλεται σε παχυσαρκία και γήρανση αρχικά αντισταθμίζεται μέσω υπερπαραγωγής ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα και τη διόγκωση αυτών των κυττάρων (Donath et al., 2013), αλλά αυτή η χρόνια πρόκληση εν τέλει οδηγεί στον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό και τη μείωση του όγκου των β-κυττάρων (Sharpless and DePinho, 2007).

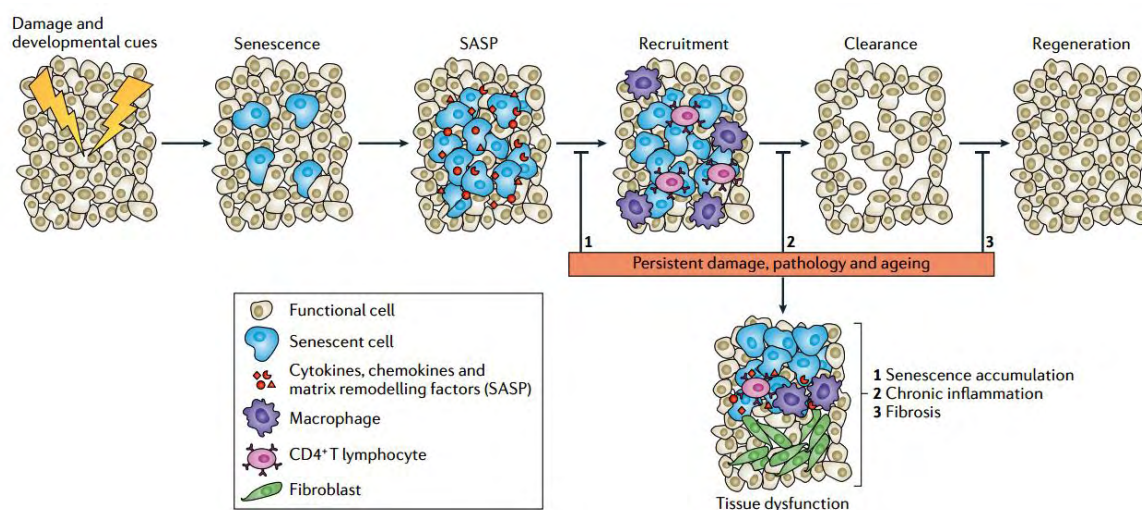
Η σαρκοπενία αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα νόσου που επιδεινώνεται λόγω γήρανσης. Η έλλειψη μυϊκής λειτουργίας είναι ένας από τις πιο επικρατείς ηλικιοεξαρτώμενες παθολογίες. Έρευνες έχουν εμπλέξει τη γήρανση των βλαστοκυττάρων των μυών ως την υποβόσκουσα αιτία της ηλικιοεξαρτώμενης σαρκοπενίας και την έλλειψη της δυνατότητας μυϊκής αναγέννησης. Οι γηρασμένοι

μύες ανθρώπων και ποντικών συσσωρεύουν p16 και είναι θετικοί σε SAβGAL (Cosgrove et al., 2014; Du et al., 2014; Sousa-Victor et al., 2014).

Τέλος, ασθένειες που φαίνεται να επιδεινώνονται λόγω γήρανσης είναι ο καταρράκτης (Baker et al., 2011; Baker et al., 2008) και η επαγόμενη από ακτινοβολίες στοματική βλεννογονίτιδα (Iglesias-Bartolome et al., 2012).

2.7. Ένα ενοποιημένο μοντέλο γήρανσης

Βάσει, λοιπόν, όσων συζητήθηκαν παραπάνω, προτείνεται ότι η γήρανση παίζει ένα ρόλο-κλειδί στην αναδιαμόρφωση ιστών κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη και φυσιολογία, αλλά και σε παθολογικές περιπτώσεις. Γενικότερα, η κυτταρική γήρανση φαίνεται ότι συγχρονίζει την αναδιαμόρφωση ιστών μέσω τριών διαδοχικών διαδικασιών: πρώτον, σταθερή παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δεύτερον, ο εκκριτικός φαινότυπος (SASP) ο οποίος στρατολογεί τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και κυρίως τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα και τρίτον, η κινητοποίηση των γειτονικών προγονικών κυττάρων που εποικίζον ξανά τον ιστό. Η Εικόνα 11 αποτελεί μια σχηματική απεικόνιση των διαδοχικών διεργασιών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).



Εικόνα 11: Ενοποιημένο μοντέλο γήρανσης. Η γήρανση πυροδοτεί την έναρξη της αναδόμησης των ιστών, αφού στρατολογούνται κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω του εκκριτικού φαινοτύπου SASP. Τα μακροφάγα καθαρίζουν τα γηρασμένα κύτταρα, και κατόπιν, τα προγονικά κύτταρα συναθροίζονται με αποτέλεσμα να αναγεννάται ο κατεστραμμένος ιστός. Αυτή η αλληλουχία γήρανσης-εκκαθάρισης-αναγέννησης μπορεί να βλάπτεται λόγω επίμονης καταστροφής, παθολογικών καταστάσεων ή γήρανσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα γηρασμένα κύτταρα δεν απομακρύνονται πλήρως και ο ιστός δεν υφίσταται ολοκληρωτική αναγέννηση με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ινώδεις ουλές με γηρασμένα κύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα και ινώδη ιστό (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Αυτό το μοντέλο μπορεί να εφαρμοστεί, με κάποιες τροποποιήσεις, στην αναδιπλασιαστική γήρανση, όπου σε κάποιες περιπτώσεις, κατορθώνει να εξαλείψει τις μεταβατικές εμβρυικές δομές και σε κάποιες άλλες, μπορεί να εξαλείψει έναν κυτταρικό πληθυσμό ευνοώντας έναν άλλον (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Στην περίπτωση, προ-κακοήθη όγκου, τα κύτταρα που υφίστανται ογκογόνους στρες γερνούν και μπορεί να πυροδοτήσουν εκκαθάριση και την εξάλειψη του όγκου (Michaloglou et al., 2005). Το μοντέλο γήρανσης που αναφέρεται παραπάνω πιθανώς λειτουργεί σε περιπτώσεις περιστασιακής ενήλικης σωματικής βλάβης, η οποία οδηγεί σε πλήρη αποκατάσταση του κατεστραμμένου ιστού. Ωστόσο, κατόπιν επίμονης καταστροφής ή σε γηρασμένους ιστούς, η εκκαθάριση και η ανάπλαση μπορεί να παρεμποδιστούν λόγω ανεπαρκούς στρατολόγησης μακροφάγων ή απόκρισης αναδόμησης (βλ. εικόνα 11). Σε αυτές τις περιπτώσεις τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται και δημιουργούν μια σταθερή αλλοίωση η οποία μπορεί να επιδεινώσει την παθολογία. Συνεπώς, η ισορροπία μεταξύ ωφέλιμων και επιβλαβών επιδράσεων της γήρανσης φαίνεται να εξαρτάται από το αν η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων είναι μια παροδική κατάσταση ή αν συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

3. Κεφάλαιο: Σχέση miRNAs και Κυτταρικής Γήρανσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κυτταρική γήρανση μπορεί να επαχθεί από πολυάριθμους παράγοντες. Τα miRNAs, αν και η ακριβής βιολογική λειτουργία των περισσότερων εξ αυτών παραμένει άγνωστη, θεωρείται ότι αποτελούν ένα μεγάλο δίκτυο ρυθμιστών γονιδίων και μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών (Li et al., 2012). Πολυάριθμα miRNA φαίνεται ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση μονοπατιών που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση και ασκούν σημαντικές επιδράσεις στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η p53, ένα πολύ κρίσιμος ρυθμιστής της κυτταρικής γήρανσης ενισχύει την μετα-μεταγραφική ωρίμανση διάφορων μορίων miRNA με λειτουργία καταστολής της αύξησης (Suzuki et al., 2009). Ομοίως, η p53 και στοιχεία του μονοπατιού της φαίνεται πως αποτελούν στόχο μορίων miRNA με αποτέλεσμα να επηρεάζονται από τις δραστηριότητες της p53 (Inomata et al., 2009; Park et al., 2009). Αναφέρθηκε, επίσης, ότι το μόριο miR-24 καταστέλλει την έκφραση της p16 σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες και στα κύτταρα καρκινώματος τραχήλου (Lal et al., 2008). Το ώριμο μόριο miRNA let-7 στοχεύει πολλαπλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης HMGA2. Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας αναστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών p16 και p19 (Nishino et al., 2008). Επιπροσθέτως, η εξάλειψη της έκφρασης των miRNA λόγω απουσίας της Dicer έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της p53 (Mudhasani et al., 2008). Τα miRNA επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης hTERT κι έχει αποδειχτεί ότι ρυθμίζουν το μήκος των τελομερών (Benetti et al., 2008; Mitomo et al., 2008). Από τις προαναφερθείσες πληροφορίες, δεν είναι δύσκολο να υποθέσει κανείς ότι τα μόρια miRNA παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στα πολύπλοκα ρυθμιστικά δίκτυα της κυτταρικής γήρανσης.

3.1 Διαφοροποιημένη έκφραση των miRNA κατά την κυτταρική γήρανση

Πολυάριθμες μελέτες έχουν υποδείξει τα προφίλ έκφρασης των μορίων miRNA κατά την κυτταρική γήρανση, μέσω διαφόρων κατάλληλων τεχνολογιών. Σε μια έρευνα, έγινε αναφορά στα προφίλ έκφρασης 462 μορίων miRNA χρησιμοποιώντας την τεχνολογία MMchip (μικροσυστοιχία ανθρώπινου miRNA) σε ανθρώπινους ινοβλάστες που βρίσκονταν σε αναδιπλασιαστική και πρόιμη γήρανση μαζί με

κύτταρα σε φάση ηρεμίας (*φάση κυτταρικού κύκλου G0*). Ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης ή παύσης, ένα υποσύνολο μορίων miRNA είναι πιο κοινό ή ειδικά σε δύο ή τρία στάδια. Μεταξύ αυτών, τα miR-10b, miR-34a, miR-373, miR-377, miR-624, miR-633, miR-638, miR-663 ρυθμίζονται συνήθως θετικά σε κύτταρα που υφίστανται παύση κυτταρικής διαίρεσης (Maes et al., 2009). Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της συστοιχίας miRNome (miRNome array), η οποία βασίζεται στην ανάλυση με ποσοτική PCR, μια άλλη ερευνητική ομάδα επιβεβαίωσε ότι υπάρχει μια υπο-ομάδα μορίων miRNA που ρυθμίζονται σημαντικά, θετικά ή αρνητικά, σε ανθρώπινους ινοβλάστες που υφίστανται γήρανση. Μεταξύ αυτών, το miR-519, ένα ογκοκατασταλτικό μόριο miRNA εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε κύτταρα που υφίστανται γήρανση κι όταν υποεκφραζόταν σε νεαρούς ινοβλάστες ή σε κύτταρα HeLa, προκαλούσε γήρανση (Marasa et al., 2010). Μια ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε ανάλυση μικροσυστοιχειών miRNA σε ανθρώπινους ινοβλάστες σε αναδιπλασιαστική γήρανση ή σε γήρανση που επάχθηκε από κάποιο ερέθισμα. Απέδειξαν ότι οκτώ μόρια miRNA εκφράστηκαν με διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση. Τα miR-152, miR-410, miR-431 και miR-493 ρυθμίζονταν θετικά, ενώ τα miR-15a, miR-20a, miR-25 και miR-155 ρυθμίζονταν αρνητικά (Wang et al., 2011). Εφαρμογή της τεχνικής knockdown, κατά την οποία μειώνεται η έκφραση των miRNA ή υπερέκφραση αυτών, αποκάλυψε ποιες ήταν οι λειτουργίες των μορίων αυτών κατά τη γήρανση. Χρησιμοποιώντας ανάλυση βαθειάς αλληλούχισης, οι Dhahbi et al., ανακάλυψαν μόρια miRNA που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο σε νεαρούς και γηρασμένους ανθρώπινους ινοβλάστες. Ανέφεραν ότι η έκφραση 141 μορίων miRNA ρυθμιζόταν θετικά, ενώ 131 αρνητικά. Επιπλέον, αναφέρθηκαν και σε νέα μόρια miRNA (π.χ. miR-432, miR-145) τα οποία επίσης εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο κατά τη γήρανση (Dhahbi et al., 2011).

Οι λίστες των μορίων miRNA που εκφράζονται κατά τη γήρανση μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, τα μοντέλα γήρανσης ή τις εκάστοτε τεχνολογίες που υιοθετήθηκαν (Suh, 2018). Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας στον οποίο αναφέρονται επιγραμματικά μόρια miRNA των οποίων τα προφίλ έκφρασης διαφοροποιούνται στα κύτταρα που υφίστανται γήρανση και καταγράφηκαν χάρη στις προαναφερθείσες διαφορετικές τεχνολογίες (Suh, 2018).

Πίνακας 6: miRNA με διαφοροποιημένη έκφραση σε κύτταρα που υφίστανται γήρανση (Suh, 2018).

Profiling technology		Differentially expressed miRNAs in senescent cells
miRNA microarray (MMchip)	Up	let-7c/l/g, miR-10b, miR-26a, miR-34a, miR-106b, miR-136, miR-137, miR-144, miR-195, miR-200b, miR-363, miR-373, miR-377, miR-432, miR-485-5p, miR-517, miR-609, miR-624, miR-633, miR-638, miR-663
	Down	miR-32, miR-147, miR-196b, miR-197, miR-218, miR-365, miR-425, miR-512-5p, miR-517a, miR-619
miRNome array	Up	miR-34c-3p, miR-122, miR-124, miR-129-3p, miR-146b-3p, miR-203, miR-216b, miR-219-1-3p, miR-372, miR-431, miR-432, miR-451, miR-492, miR-499-3p, miR-513a-5p, miR-513b, miR-519a, miR-519b-3p, miR-519c-3p, miR-548b-3p, miR-548k, miR-548p, miR-561, miR-584, miR-600, miR-641, miR-658, miR-663, miR-874, miR-890, miR-944, miR-1180, miR-1185, miR-1204, miR-1225-5p, miR-1244, miR-1248, miR-1250, miR-1255b, miR-1259, miR-1270, miR-1271, miR-1273, miR-1279, miR-1282, miR-1284, miR-1288, miR-1289, miR-1291, miR-1303, miR-1305, miR-1323, miR-1537
	Down	let-7a/b/c/d/e/f/g/l, miR-7, miR-10a/b, miR-15a, miR-18a/b, miR-20a, miR-30b, miR-96, miR-100, miR-101, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-125a-5p, miR-125b, miR-127-3p, miR-140-3p, miR-140-5p, miR-141, miR-155, miR-194, miR-221, miR-411, miR-450a, miR-503, miR-506, miR-520e, miR-543, miR-545, miR-548c-5p, miR-548d-5p, miR-548e, miR-569, miR-572, miR-576-3p, miR-625, miR-628-5p, miR-649, miR-1181, miR-1182, miR-1200, miR-1201, miR-1203, miR-1228, miR-1234, miR-1238, miR-1246, miR-1247, miR-1254, miR-1257, miR-1258, miR-1260, miR-1265, miR-1274a, miR-1280, miR-1283, miR-1287
miRNA array	Up	miR-22, miR-27, miR-29b, miR-30a/c, miR-34a, miR-101b, miR-103, miR-106a, miR-123, miR-127, miR-128a, miR-129, miR-134, miR-152, miR-190, miR-219, miR-296, miR-323, miR-337, miR-340, miR-376a, miR-376b, miR-379, miR-380-3p, miR-382, miR-410, miR-431, miR-432, miR-433, miR-486, miR-493, miR-494, miR-496, miR-516-35p
	Down	miR-7, miR-15a/b, miR-16-1/b, miR-17, miR-19b, miR-20a/b, miR-25, miR-29b, miR-30c-1, miR-32, miR-92-1a/b, miR-93a, miR-106a/b, miR-123b, miR-135b, miR-143, miR-145, miR-155, miR-195, miR-217b, miR-218a, miR-224, miR-321, miR-424-2, miR-450-2b, miR-483
Deep sequencing ^a	Up	miR-122, miR-126, miR-129-3p, miR-129-5p, miR-184, miR-217, miR-323b-3p, miR-375, miR-432, miR-449a, miR-449b/c, miR-491-5p, miR-496, miR-539, miR-584, miR-668, miR-765, miR-1197, miR-1246, miR-1274a/b, miR-1275, miR-1290, miR-3656, miR-3911
	Down	miR-15a/b, miR-16, miR-17, miR-18a/b, miR-19a/b, miR-20a, miR-33b, miR-106a, miR-145, miR-146a, miR-146b-3p, miR-148a, miR-155, miR-195, miR-196a, miR-199b-5p, miR-218, miR-296-3p, miR-296-5p, miR-345, miR-490-5p, miR-497, miR-548u, miR-549, miR-551b, miR-576-5p, miR-766, miR-887, miR-1245, miR-1261, miR-1270, miR-1271, miR-3154, miR-3187, miR-3622a-5p, miR-3912

3.2. miRNA που εμπλέκονται σε μονοπάτια-κλειδιά γήρανσης

Πέρα από τα πειράματα με στόχο τη σκιαγράφηση των προφίλ έκφρασης μορίων miRNA κατά τη διάρκεια της γήρανσης, έχει μελετηθεί και ο ρόλος μεμονωμένων miRNA κατά τη διεργασία αυτή από πολυάριθμες λειτουργικές μελέτες. Θα εστιάσουμε σε δύο κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια γήρανσης, σ' αυτό των p53-p21 αλλά και των p16-pRB με στόχο να ανακαλύψουμε τις λειτουργίες των miRNA που εμπλέκονται στη γήρανση (βλ. Εικόνα 12).

3.2.1. miRNA που σχετίζονται με το μονοπάτι p53-p21

Μόρια miRNA μπορούν να ρυθμίσουν την πρωτεΐνη p53 είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω καταστολέων της p53. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ρυθμιστή-κλειδί των σημείων ελέγχου *G1/S* και *G2/M* του κυτταρικού κύκλου, καθώς ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, όπως το p21. (Βλέπε σχήμα 1)

3.2.1.1. miRNA ρυθμίζουν άμεσα την p53

Τα miRNA miR-504 (Hu et al., 2010), miR-125b (Le et al., 2009), miR-25 και miR-30d (Kumar et al., 2011) προσδένονται άμεσα στην p53 και την καταστέλλουν. Διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έχουν αποδείξει ανεξάρτητα ότι εκτοπική έκφραση των προαναφερθέντων miRNA μειώνει την έκφραση της p53 και άλλες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και της παύσης του κυτταρικού κύκλου που μεσολαβείται από την p53, προτείνοντας το ρόλο τους στην καταστολή της γήρανσης (Suh, 2018).

3.2.1.2. miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την p53 μέσω καταστολέων της

Διάφορα miRNA ρυθμίζουν αρνητικά τους καταστολείς της p53 και συνεπώς, ενεργοποιούν τη γήρανση. Παραδείγματος χάρη, τα miR-192, miR-194, miR-215 (Pichiorri et al., 2010) και miR-605 (Xia et al., 2011) ρυθμίζουν θετικά με έμμεσο τρόπο την p53 μέσω αρνητικής ρύθμισης του MDM2, ενός ογκογονιδίου που καταστέλλει την έκφραση της p53. Αυτή η υπο-ομάδα των miRNA ρυθμίζεται από την p53, συνεπώς αποτελώντας ένα βρόγχο θετικής ρύθμισης (Pichiorri et al., 2010; Xiao et al., 2011). Ένας άλλος ρυθμιστικός βρόγχος μεταξύ miRNA, ενός γονιδίου-στόχου και της p53 εντοπίζεται στο παράδειγμα του miR-34a, ενός από τα πιο καλά μελετημένα μόρια miRNA σε αυτό το δίκτυο. Πιο συγκεκριμένα, το miR-34a προωθεί την κυτταρική γήρανση καταστέλλοντας την αποακετυλάση SIRT1, η οποία ρυθμίζει αρνητικά την p53 και μονοπάτια απόκρισης σε στρες (Cui et al., 2017; Ito et al., 2010; Luo et al., 2001; Yamakuchi et al., 2008; Yang et al., 2007; Zhao et al., 2010). Όπως το miR-34a, έτσι και τα miR-22 (Jazbutyte et al., 2013; D. Xu et al., 2011), miR-138 (Di Val Cervo et al., 2012), miR-181a/b (Di Val Cervo et al., 2012), miR-217 (Menghini et al., 2009) και miR-449 (Bou Kheir et al., 2011) μειώνουν την έκφραση της SIRT1, συνεπώς, αυξάνοντας την έκφραση της p53 και της γήρανσης σε διάφορους τύπους καρκίνου αλλά και σε φυσιολογικά κύτταρα.

Μια άλλη ερευνητική ομάδα ανέφερε ότι το miR-195 υπερεκφράζεται σε γηρασμένα βλαστοκύτταρα και ότι η αποσιώπηση του σε γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) αυξάνει την έκφραση της τελομεράσης TERT και της SIRT1 και κατ' επέκταση, τα επίπεδα της p53 (Okada et al., 2016). Η πρωτεΐνη MDC1, ένα κρίσιμο συστατικό του μηχανισμού επιδιόρθωσης DNA (DDR), είναι ένα ακόμη σημείο ρύθμισης από miRNA κατά τη διάρκεια της ρύθμισης (Lou et al., 2006). Έχει

αναφερθεί ότι το miR-22 καταστέλλει άμεσα την MDC1 κι επομένως, προωθεί την πρόωμη γήρανση (Lee et al., 2015).

3.2.1.3. miRNA ρυθμίζουν την p21

Πολυάριθμα miRNA ρυθμίζουν αρνητικά, με άμεσο τρόπο, την p21 κι επομένως, καταστέλλουν τη γήρανση. Μια ερευνητική ομάδα ανέφερε ότι 28 διαφορετικά miRNA εμπόδιζαν την κυτταρική γήρανση που επαγόταν λόγω RAS^{G12V} μέσω αναστολής της έκφρασης της p21 σε ανθρώπινα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα. Αυτά είναι τα μέλη της οικογένειας miR-106b, miR-130b, miR-302a/b/c/d, miR-512-3p και miR-515-3p (Βλέπε σχήμα 1) (Borgdorff et al., 2010). Αυτό το εύρημα συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές ότι η αρνητική ρύθμιση του miR-106a συνέβαλε στη θετική ρύθμιση της p21 σε γηρασμένους ανθρώπινους ινοβλάστες και στα κύτταρα του δοκιδωτού πλέγματος (Li et al., 2009). Σε μια κυτταρική σειρά καρκινώματος παχέος εντέρου, το miR-20a ρυθμίζει το p21 με τέτοιο τρόπο ώστε να εκφράζεται σε χαμηλότερο επίπεδο και καταργεί την παύση της κυτταρικής διαίρεσης στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S που επάγεται από τον TGF-β (Sokolova et al., 2015). Το miR-663, το οποίο εκφράζεται σε μεγαλύτερη αφθονία στα γηρασμένα κύτταρα, στοχεύει άμεσα την p21 και αναστέλλει την μετάβαση G1/S στα κύτταρα του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (Yi et al., 2012). Όπως προαναφέρθηκε, το miR-519 προωθεί την αναστολή της ανάπτυξης, εν μέρει, αυξάνοντας την απόκριση σε βλάβες του DNA και μειώνοντας το επίπεδο του κυτοσολικού ασβεστίου, τα οποία με τη σειρά τους αυξάνουν την έκφραση της p21 (Abdelmohsen et al., 2012).

3.2.2. miRNA που σχετίζονται με το μονοπάτι p16-pRB

3.2.2.1 miRNA ρυθμίζουν άμεσα την p16

Η p16 είναι ένας αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN2A* στους ανθρώπους (Nobori et al., 1994; Stone et al., 1995). Λόγω του κρίσιμου ρόλου της στον κυτταρικό κύκλο, η ρύθμιση της p16 είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με πολυάριθμους παράγοντες. Μια ερευνητική ομάδα ανέφερε ότι μειωμένη έκφραση του miR-24 σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα p16 και αναδιπλασιαστική γήρανση (Lal et al., 2008). Διάφορες ομάδες απέδειξαν ότι το miR-24 προσδένεται άμεσα στην p16 και καταστέλλει τη μετάφρασή της σε

ανθρώπινα κύτταρα, διαφορετικές καρκινικές σειρές και σε μοντέλο-ασθένειας, οστεοαρθρίτιδας (Giglio et al., 2013; Lal et al., 2008; Philipot et al., 2014).

3.2.2.2. miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την p16

Κάποια miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την p16 με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την κυτταρική γήρανση. Κάποια μόρια miRNA ελέγχουν τα κατασταλτικά σύμπλοκα Polycomb, PRC1 και PRC2. Μεταξύ άλλων ποικίλων κυτταρικών διεργασιών, αυτοί οι επιγενετικοί ρυθμιστές επηρεάζουν τη γήρανση, εν μέρει, αποσιωπώντας τον τόπο *INK4/ARF*, όπου εντοπίζεται η p16. Παραδείγματος χάρη, οι οικογένειες των miR-9, miR-125 και miR-181 ρυθμίζουν τη CBX7 (chromoboxhomologue 7), που περιλαμβάνεται στο σύμπλοκο PRC1, το οποίο εν συνεχεία επάγει τη γήρανση με τρόπο εξαρτώμενο από την p16 (O’Loughlen et al., 2015). Άλλα μέλη της ομάδας πρωτεϊνών Polycomb (PcG), όπως οι BMI1 και EZH2 αποτελούν, επίσης, στόχο miRNA, επηρεάζοντας, συνεπώς, το στάδιο της γήρανσης. Η BMI1 περιορίζεται από το miR-141, το οποίο στη συνέχεια προάγει τη γήρανση σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Dimriet al., 2013). Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζεται κι από το miR-128a με αυξημένο επίπεδο αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) ενδοκυτταρικά και γήρανση σε καρκινικά κύτταρα μυελοβλαστώματος (Venkataraman et al., 2010). Το miR-138 επάγει τη γήρανση μέσω περιορισμού της EZH2 στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (Liang et al., 2014). Η προαναφερθείσα αλληλεπίδραση μεταξύ miRNA με πρωτεΐνες PcG και γήρανση εξαρτάται από την υπερέκφραση της p16. Πιο πρόσφατα, μια συστηματική προσέγγιση αποκάλυψε έναν πιο πολύπλοκο συσχετισμό μορίων miRNA, επιγενετικών ρυθμιστών και ενός μονοπατιού p16 (Overhoff et al., 2014). Τα miR-26b, miR-181a, miR-210 και miR-424 καταστέλλουν άμεσα διάφορες πρωτεΐνες PcG, όπως οι CBX7, EED, EZH2 και Suz12, με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της p16 και της γήρανσης (Overhoff et al., 2014).

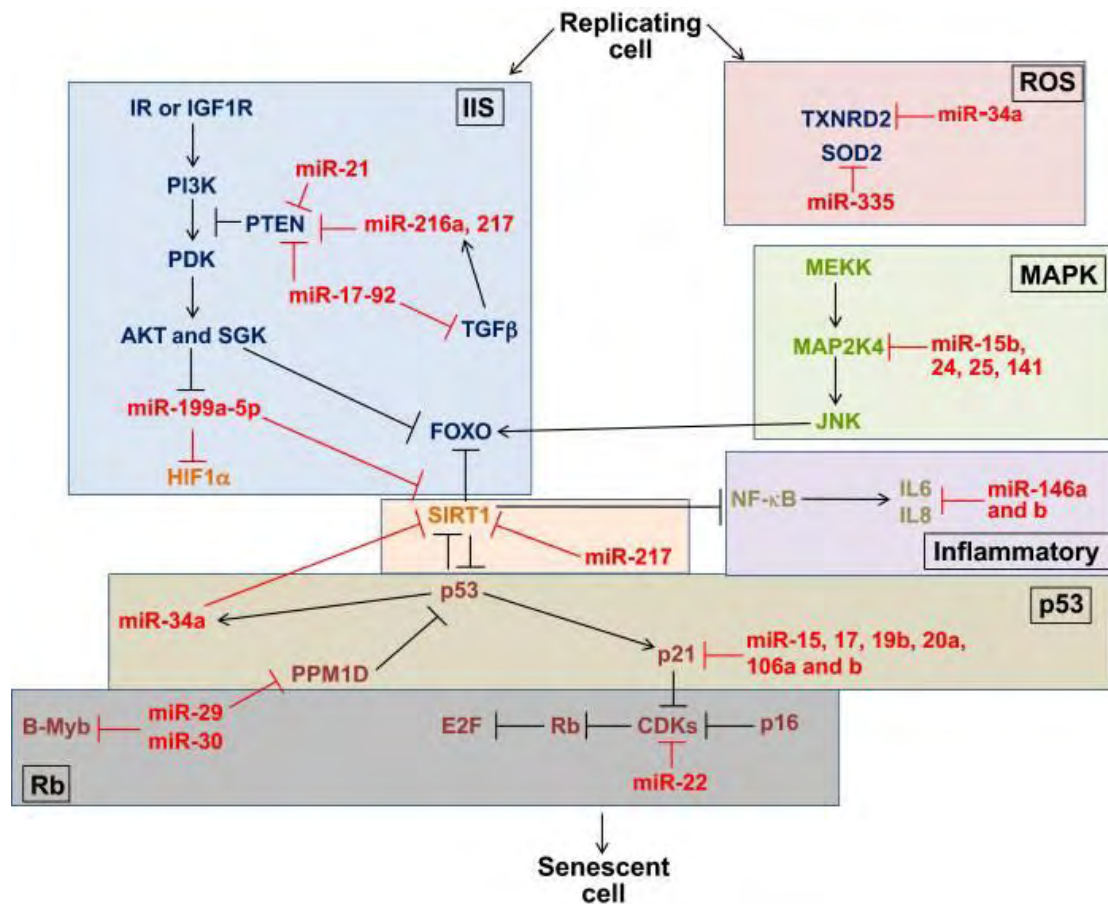
Επιπροσθέτως, εξαναγκασμένη έκφραση του miR-335 σχετίζεται με φαινοτύπους γήρανσης, όπως αυξημένα επίπεδα p16 σε κύτταρα hMSC, με μείωση θεραπευτικού δυναμικού (Tomé et al., 2014). Το miR-335 έχει αναγνωριστεί ως καταστολέας όγκων που εμπλέκεται στη γήρανση στοχεύοντας τις πρωτεΐνες p16, pRB, p21 και CARF (Yu et al., 2016). Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι ένα πλήθος miRNA, όπως τα miR-15b, miR-24, miR-25 και miR-141, καταστέλλουν συνεργατικά την κινάση MKK4 και

μειώνουν τα επίπεδα της p16 και της γήρανσης σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Marasa et al., 2009).

3.2.2.3 miRNA ρυθμίζουν έμμεσα την RB

Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση δύο οικογενειών miRNA, των miR-29 και miR-30, επάγεται κατά τη διάρκεια της γήρανσης με τρόπο που εξαρτάται από την pRB (Martinez et al., 2011). Μετά από σχετική έρευνα που πραγματοποιήθηκε, αποδείχτηκε ότι αυτά τα miRNA ασκούν την επίδρασή τους στοχεύοντάς τον ογκογονίδιο B-Myb, γεγονός που καταδεικνύει τον ρόλο τους στην κυτταρική γήρανση που καθοδηγείται από την Rb (Βλέπε σχήμα 1) (Martinez et al., 2011).

Σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη, το miR-449a καταστέλλει άμεσα το γονίδιο της κυκλίνης D1, το *CCND1*, ενός ρυθμιστή της ενεργότητας της Rb, που στη συνέχεια τροποποιεί την ανάπτυξη και τη γήρανση με μηχανισμό που εξαρτάται από την Rb (Noonan et al., 2010). Παρόμοια ρύθμιση του miR-449a εντός του ρυθμιστικού δικτύου της Rb και της γήρανσης έχει βρεθεί σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα στοχεύοντας την E2F3, έναν ρυθμιστή-κλειδί της μετάβασης από τη φάση G1 στην S του κυτταρικού κύκλου (Humbert et al., 2000; Ren et al., 2014). Επιπροσθέτως, στα ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος, το miR-203 στοχεύει και ρυθμίζει αρνητικά την E2F3 (Noguchi et al., 2012). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το miR-203 καταστέλλει και τον παράγοντα ZBP-89 αλλά η αποσιώπηση του E2F3, κι όχι του ZBP-89, συμβάλλει στην επαγωγή των φαινοτύπων γήρανσης. Στη μελέτη αυτή, διαπιστώθηκε ότι υπερέκφραση του E2F3 έσωζε τα κύτταρα του μελανώματος από γήρανση που επαγόταν από το miR-203 (Noguchi et al., 2012).



Σχήμα 1: MicroRNAs ρυθμίζουν παράγοντες που είναι σημαντικοί στην κυτταρική γήρανση (Thalyana Smith-Vikos, Frank J Slack, J Cell Sci. 2010 Jan 1)

3.2.2.4 miRNA που σχετίζονται με τον σχετιζόμενο με τη γήρανση εκκριτικό φαινότυπο (SASP)

Η σχετιζόμενη με τη γήρανση παραγωγή και έκκριση κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεασών αποτελούν τον SASP (Coppé et al., 2008), όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Αυτός ο φαινότυπος ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες RBP και μη κωδικά RNA (ncRNA), στα οποία περιλαμβάνονται και τα miRNA. Παρακάτω θα αναφερθούμε στα miRNA που ρυθμίζουν τον SASP, και ειδικότερα, ιντερλευκίνες, μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας (MMP) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNFα). Στον πίνακα 7, αναγράφονται κάποια παραδείγματα μορίων miRNA που στοχεύουν παράγοντες που αποτελούν τον SASP (Munk et al., 2018).

Πίνακας 7: miRNA που σχετίζονται με τη γήρανση και ρυθμίζουν τον SASP (Bhaumik et al., 2009; Gysler et al., 2016; Kabir et al., 2016; G. Li et al., 2010; X. Liu et al., 2009; Osaki et al., 2011; Rossato et al., 2012; Tili et al., 2007; N. Xu et al., 2012; D. Zhang et al., 2016; Zheng et al., 2013).

MicroRNA	Target	References
MiR-146a/b	IRAK1, TLR8	Bhaumik et al. (2009) and Gysler et al. (2016)
MiR-143	MMP13	Osaki et al. (2011)
MiR-335	PTEN	Kabir et al. (2016)
MiR-183	ITGB1	Li et al. (2010)
MiR-9	IL6	Zhang et al. (2016a)
MiR-222	MMP1	Liu et al. (2009)
MiR-125b	TNF, MMP13	Tili et al. (2007) and Xu et al. (2012)
MiR-152	MMP3	Zheng et al. (2013)
MiR-187	TNF, IL6	Rossato et al. (2012)

3.2.2.5. Ιντερλευκίνες

Η παραγωγή και έκκριση ιντερλευκινών αυξάνεται σε γηρασμένα κύτταρα με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα προφλεγμονώδες περιβάλλον που προωθεί την πρόοδο του όγκου (Corré et al., 2010). Σε πρώιμους ανθρώπινους ινοβλάστες, τα miR-146a και miR-146b κατέστειλαν άμεσα την έκφραση της IRAK1, ενός ρυθμιστή της σηματοδότησης του υποδοχέα IL1-a γεγονός που οδήγησε στην αναστολή παραγωγής των ιντερλευκινών IL-6 και IL-8. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υψηλά επίπεδα εκκρινόμενων κυτοκινών ρύθμιζαν θετικά την έκφραση των miR-146a και miR-146b, που εν συνεχεία εμποδίζουν την υπερβολική ενεργότητα του SASP (Bhaumik et al., 2009). Το ογκοκατασταλτικό miR-9 αναστέλλει την έκφραση της IL-6 στο καρκίνωμα του τραχήλου (J. Zhang et al., 2016) και το miR-187, που επάγεται από την IL-10, κατέστειλε με παρόμοιο τρόπο την παραγωγή των IL-6 και TNF (Rossato et al., 2012). Το κυκλοφορούν miRNA, miR-21, προσδέεται στον υποδοχέα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, TLR8, και μέσω αυτού του εναλλακτικού μηχανισμού διεγείρει την παραγωγή IL-6 και TNF (Fabbri et al., 2012). Το miR-199a καταστέλλει την παραγωγή της κινάσης IKK β , η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση του NF- κ B, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή των IL-6 και IL-8 (Βλέπε σχήμα 1) (R. Chen et al., 2008).

3.2.2.6. Μεταλλοπρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας (MMP)

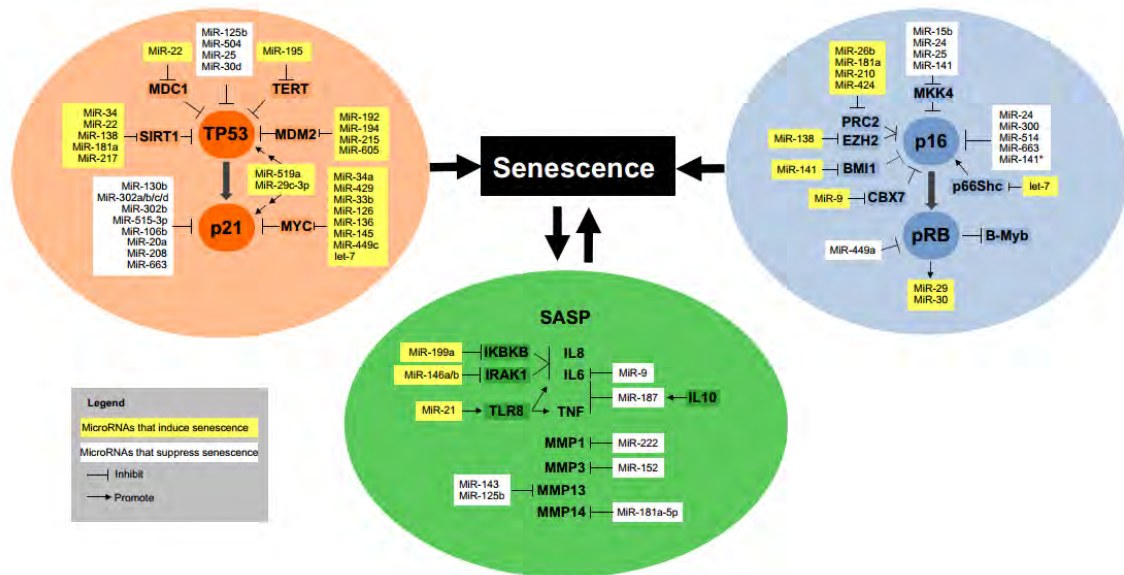
Στον SASP περιλαμβάνεται η παραγωγή πολυάριθμων πρωτεϊνών MMP, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και την αποδόμηση

των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, αλλά και των προσδετών τους. Με τη συσσώρευση των γηρασμένων κυττάρων, η ολοένα και αυξανόμενη ενεργότητα των MMP προωθεί την καταστροφή του ιστού μέσω χρόνιας φλεγμονής και αναδιαμόρφωση εξωκυττάριας ουσίας που προκαλούνται από τον SASP (Verma and Hansch, 2007). Τα επίπεδα των MMP ρυθμίζονται από διαφορετικά miRNA. Παραδείγματος χάρη, το miR-222 καταστέλλει άμεσα την έκφραση της MMP1 σε πλακώδες καρκίνωμα της γλώσσας κι έπειτα, καταστέλλει την παραγωγή της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD2), η οποία υπό άλλες συνθήκες θα προκαλούσε την επαγωγή της MMP1. Επιπροσθέτως, το miR-222 μειώνει έμμεσα τα επίπεδα της MMP13 μέσω αρνητικής ρύθμισης της απακετυλάσης ιστονών HDAC4 (X. Liu et al., 2009; Song et al., 2015). Το miR-152 στοχεύει την 3'UTR του mRNA του MMP3, μειώνοντας την έκφραση της MMP3 και μειώνει, επίσης, σημαντικά την ικανότητα εισβολής των κυττάρων του γλοιώματος (Zheng et al., 2013). Το miR-143 στοχεύει την 3'UTR του mRNA του MMP13 και καταστέλλει την έκφραση της MMP13. Στο οστεοκαρκίνωμα του πνεύμονα, η ισχυρή αρνητική ρύθμιση του miR-143 οδηγεί σε ισχυρή αύξηση των επιπέδων της MMP13 και της ικανότητας εισβολής των καρκινικών κυττάρων (Osaki et al., 2011). Τα χαμηλότερα επίπεδα του miR-125b στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (cSCC) σε σχέση με το υγιές δέρμα επιτρέπουν υψηλότερη παραγωγή MMP14 κι αντίστοιχα, προωθεί την εισβολή του cSCC (N. Xu et al., 2012). Τέλος, το miR-181a-5p καταστέλλει άμεσα την έκφραση της MMP14 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Roth and Cao, 2015).

3.2.2.7. Παράγοντας νέκρωσης όγκου

Η προφλοεγμονώδης κυτοκίνη TNF ρυθμίζεται επίσης από μόρια miRNA. Όπως προαναφέρθηκε, το κυκλοφορούν miR-21 ήταν ικανό να προσδέεται και να ενεργοποιεί τον TLR8 των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συνεπώς διεγείροντας την έκκριση TNF και IL-6 (Fabbri et al., 2012). Αντιθέτως, σε πρόιμα ανθρώπινα μονοκύτταρα, η IL-10 προκαλούσε την επαγωγή του miR-187, το οποίο με τη σειρά του κατέστειλε τον TNF και την IL-6 (Rossato et al., 2012), ενώ σε κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW 264.7, το LPS κατέστειλε το miR-125b, του οποίου στόχο αποτελεί το mRNA του *TNF*, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί την παραγωγή του TNF (Tili et al., 2007).

Στην εικόνα 12 φαίνονται επιγραμματικά κάποια από τα προαναφερθέντα μόρια miRNA που ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια-κλειδιά κατά την κυτταρική γήρανση.



Εικόνα 12: Μόρια miRNA ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια-κλειδιά κατά την κυτταρική γήρανση. Σχηματική αναπαράσταση των miRNA που προωθούν ή αναστέλλουν τη γήρανση σε 3 κύριους τομείς της γήρανσης: το μονοπάτι p53/p21, το μονοπάτι p16/Rb και τον SASP. Τα miRNA που προωθούν τη γήρανση βρίσκονται σε κίτρινα πλαίσια, ενώ αυτά που την καταστέλλουν σε λευκό (Munk et al., 2018).

4. Κεφάλαιο: Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Η κυτταρική γήρανση είναι μια σημαντικά ετερογενής κυτταρική διαδικασία. Γίνεται ολοένα και πιο εμφανές ότι η ρύθμιση ενός μόνο παράγοντα από έναν μεμονωμένο ρυθμιστή μπορεί πολύ δύσκολα να καθορίσει το πώς αρχίζει και διατηρείται η διαδικασία της γήρανσης. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε ειδικούς και πιο γενικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς σε πολλά επίπεδα. Τα miRNA αποτελούν την πιο κατάλληλη κατηγορία ρυθμιστών αυτής της διαδικασίας γιατί μπορούν ταυτόχρονα να τροποποιήσουν τα επίπεδα πολλαπλών γονιδίων και μονοπατιών. Η ανάλυση των προφίλ έκφρασης των miRNA σε διαφορετικά στάδια γήρανσης ή σύγκρισή της με άλλες συνθήκες παύσης της ανάπτυξης, όπως η φάση ηρεμίας, θα μπορούσε να αποτελέσει μια πρωταρχική προσέγγιση της κατανόησης των μοριακών μηχανισμών της κυτταρικής γήρανσης. Εναλλακτικά, οι λειτουργίες των miRNA θα μπορούσαν να μελετηθούν σε μια ολιστική μελέτη αφαιρώντας όλα τα miRNA του συστήματος, αφαιρώντας όλα τα γονίδια που εμπλέκονται στην βιογένεση των miRNA, όπως οι Dicer και DGCR8 (Suh, 2018).

Η επίδραση των γηρασμένων κυττάρων στην ομοιόσταση των ιστών είναι περίπλοκη κι εξελίσσεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται στον ανθρώπινο σώμα με την ηλικία. Όπως επισημάνθηκε παραπάνω, τα γηρασμένα κύτταρα είναι ωφέλιμα σε κάποιες περιπτώσεις, όπως κατά τη διάρκεια της επούλωσης πληγών, της αναγέννησης μυών, της καταστολής παγκρεατικής και ηπατικής ίνωσης και της πρόληψης της ογκογένεσης σε νεαρούς οργανισμούς. Ωστόσο, γηρασμένα κύτταρα μπορεί να είναι και βλαβερά σε άλλες περιπτώσεις, ιδιαιτέρως σε ηλικιωμένους, καθώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων, όπως καρκίνος, διαβήτης, καρδιαγγειακές διαταραχές, μειωμένη ανοσία και νευροεκφυλισμό. Συνεπώς, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον να κατανοηθούν οι μοριακοί ρυθμιστές της γήρανσης ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που προωθούν τις ωφέλιμες δράσεις της και βελτιώνουν τις βλαβερές επιδράσεις της. Προηγουμένως ασχοληθήκαμε με τα miRNA που εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση και την επίδρασή τους σε αυτήν δίνοντας έμφαση στα miRNA που ενισχύουν ή εξασθενούν τον SASP, καθώς και τα κύρια μονοπάτια γήρανσης, p53/p21 και p16/RB (Munk et al., 2018).

Ουσιαστικά, η πλειοψηφία των miRNA που σχετίζονται με τη γήρανση έχουν μελετηθεί σε μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας κι ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό

να αξιολογηθεί το αν αλλάζουν με την ηλικία κι εάν έχουν επίδραση στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες. Η ανάπτυξη μοντέλων ποντικών γήρανσης και λειτουργίας των miRNA ξεκινά να επιτρέπει τη συστηματική ανάλυση της λειτουργίας των miRNA που σχετίζονται με τη γήρανση *in vivo*, αν και απαιτείται πολλή δουλειά ακόμη. Η κατανόηση της επίδραση των miRNA στη γήρανση και στις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες θα οδηγήσει σε νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές δυνατότητες. Παραδείγματος χάρη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα miRNA σε σωματικά υγρά, όπως αίμα, ούρα και σάλιο, θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί δείκτες, πιθανώς βοηθώντας στην αναγνώριση διεργασιών που επηρεάζονται από τη γήρανση (Munk et al., 2018).

Στοχεύοντας τα miRNA μέσω κέρδους ή απώλειας λειτουργίας για θεραπευτικούς σκοπούς αποτελεί μία εξίσου ελκυστική προοπτική. Παρά την πρόοδο που έχει ήδη πραγματοποιηθεί σε αυτό τον τομέα, παραμένουν κάποιες σημαντικές προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν σχετικά με τη διακίνηση των σχετιζόμενων με τη γήρανση μορίων miRNA με υψηλή ειδικότητα και αποτελεσματικότητα (Chen et al., 2015). Η προσέγγιση κέρδους λειτουργίας με μόρια που μιμούνται miRNA χρησιμοποιείται ευρέως. Ωστόσο, το αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνευθεί με προσοχή, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (Jin et al., 2015). Η προσέγγιση απώλειας λειτουργίας με συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligos, ASO) έχει χρησιμοποιηθεί συχνά με στόχο την αναστολή της ενεργότητας των miRNA, αλλά μπορούν να στοχεύσουν και άλλες αλληλουχίες με τις οποίες δε θα είναι πλήρως συμπληρωματικά με αποτέλεσμα μη ειδικές επιδράσεις. Προκειμένου να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί, η εφαρμογή της τεχνικής gene knockout, μέσω της οποίας ένα γονίδιο μπορεί να γίνει μη λειτουργικό, θα ήταν ιδανική επιλογή για τη διαγραφή των miRNA και τη μετέπειτα ανάλυση της λειτουργίας τους. Πρόσφατα, τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων, οι οποίες βασίζονταν σε νουκλεάσες ZFN, νουκλεάσες TALEN και ενδονουκλεάσες RGEN, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως προκειμένου να καταστήσουν μη λειτουργικούς διάφορους γενετικούς τόπους (Cai and Yang, 2014). Έτσι, η χρήση τέτοιων τεχνικών με στόχο τα miRNA θα παρέχει μια εξαιρετική ευκαιρία να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των miRNA που σχετίζονται με τη γήρανση *in vitro* και *in vivo* (Munk et al., 2018).

Η κατανόηση του πλήρους φάσματος των μεταγραφικών και μετα-μεταγραφικών ρυθμιστών των σχετιζόμενων με τη γήρανση μορίων miRNA θα βοηθήσει περαιτέρω

με ακριβή στόχευση του φαινοτύπου γήρανσης. Οι έρευνες στις οποίες αναφερθήκαμε παραπάνω δίνουν έμφαση στις προσπάθειες που βρίσκονται σε εξέλιξη και στοχεύουν στην εκμετάλλευση των ρυθμιστικών παραγόντων της γήρανσης με ευνοϊκά αρχικά κλινικά αποτελέσματα στον καρκίνο και άλλες ασθένειες που προωθούνται από τη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων (Munk et al., 2018).

5. Βιβλιογραφία

1. Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Tominaga, K., Kang, M.-J., Yaniv, Y., Martindale, J. L., Yang, X., Park, S.-S., Becker, K. G., Subramanian, M., Maudsley, S., Lal, A., & Gorospe, M. (2012). Growth Inhibition by miR-519 via Multiple p21-Inducing Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 32(13), 2530–2548.
2. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., ... Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, 15(8), 978–990.
3. Alder, J. K., Chen, J. J. L., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S. C., Cogan, J. D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tuder, R. M., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Loyd, J. E., & Armanios, M. Y. (2008). Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 13051–13056.
4. Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J. G., Carracedo, A., Trotman, L. C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S. C., Thomas, G., Rosivatz, E., Woscholski, R., Cognetti, F., Scher, H. I., & Pandolfi, P. P. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 681–693.
5. Ardekani, A. M., & Naeini, M. M. (2010). The role of microRNAs in human diseases. In *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* (Vol. 2, Issue 4, pp. 161–179).
6. Armanios, M. Y., Chen, J. J. L., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., Lawson, W. E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Greider, C. W., & Loyd, J. E. (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 356(13), 1317–1326. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066157>
7. Babak, T., Zhang, W., Morris, Q., Blencowe, B. J., & Hughes, T. R. (2004). Probing microRNAs with microarrays: Tissue specificity and functional inference. *RNA*, 10(11), 1813–1819.
8. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., Bartel, D. P., Chi, N. C., Shaw, R. M., De Val, S., Kang, G., Jan, L. Y., Black, B. L., Stainier, D. Y., Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., ... Gill, P. S. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(1), 1710–1713.
9. Baek, Daehyun, Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64–71.
10. Baker, D. J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K., Niederländer, N. J., Jeganathan, K., Yamada, S., Reyes, S., Rowe, L., Hiddinga, H. J., Eberhardt, N. L., Terzic, A., & van Deursen, J. M. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nature Cell Biology*, 10(7), 825–836.
11. Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., Lebrasseur, N. K., Childs, B. G., Van De Sluis, B., Kirkland, J. L., & Van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–236.
12. Bandyopadhyay, D., & Medrano, E. E. (n.d.). The emerging role of epigenetics in cellular and organismal aging. *Experimental Gerontology*, 38(11–12), 1299–1307.
13. Bartel, B. (2005). MicroRNAs directing siRNA biogenesis. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 12, Issue 7, pp. 569–571).
14. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. In *Cell* (Vol. 136, Issue 2, pp. 215–233).
15. Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V. F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C. L., Dyrskjot, L., Ørntoft, T., ... Gorgoulis, V. G. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), 633–637.
16. Belmont, J. W., Boudreau, A., Leal, S. M., Hardenbol, P., Pasternak, S., Wheeler, D. A., Willis, T. D., Yu, F., Yang, H., Gao, Y., Hu, H., Hu, W., Li, C., Lin, W., Liu, S., Pan, H., Tang, X., Wang, J., Wang, W., ... Stewart, J. (2005).
17. Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 37, Issue 5 SPEC. ISS., pp. 961–976). Elsevier Ltd.
18. Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Muñoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., Murchison, E., Andl, T.,

- Chen, T., Klatt, P., Li, E., Serrano, M., Millar, S., Hannon, G., & Blasco, M. A. (2008). A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases (Nature Structural and Molecular Biology (2008) 15, (268-279)). In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 15, Issue 9, p. 998).
19. Berezikov, E., & Plasterk, R. H. A. (2005). Camels and zebrafish, viruses and cancer: A microRNA update. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 14, Issue SUPPL. 2).
 20. Beuvink, I., Kolb, F. A., Budach, W., Garnier, A., Lange, J., Natt, F., Dengler, U., Hall, J., Filipowicz, W., & Weiler, J. (2007). A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 35(7), e52.
 21. Bhaumik, D., Scott, G. K., Schokrpur, S., Patil, C. K., Orjalo, A. V., Rodier, F., Lithgow, G. J., & Campisi, J. (2009). MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging*, 1(4), 402–411.
 22. Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. In *Nature* (Vol. 447, Issue 7143, pp. 396–398). Nature Publishing Group.
 23. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185–191.
 24. Borgdorff, V., Leonart, M. E., Bishop, C. L., Fessart, D., Bergin, A. H., Overhoff, M. G., & Beach, D. H. (2010). Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21 Waf1/Cip1. *Oncogene*, 29(15), 2262–2271.
 25. Borkham-Kamphorst, E., Schaffrath, C., Van de Leur, E., Haas, U., Tihaa, L., Meurer, S. K., Nevzorova, Y. A., Liedtke, C., & Weiskirchen, R. (2014). The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- β signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(5), 902–914.
 26. Bostjancic, E., & Glavac, D. (2008). Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 17(3), 95–102.
 27. Bou Kheir, T., Futoma-Kazmierczak, E., Jacobsen, A., Krogh, A., Bardram, L., Hother, C., Grønbaek, K., Federspiel, B., Lund, A. H., & Friis-Hansen, L. (2011). miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 10.
 28. Bringold, F., & Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental Gerontology*, 35(3), 317–329.
 29. Burnet, M. (1974). *Intrinsic mutagenesis*. Springer Netherlands.
 30. Cai, M., & Yang, Y. (2014). Targeted Genome Editing Tools for Disease Modeling and Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 14(1), 2–9.
 31. Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. In *Cell* (Vol. 120, Issue 4, pp. 513–522). Cell Press.
 32. Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 685–705.
 33. Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M. L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D., Elia, L., Latronico, M. V. G., Høydal, M., Autore, C., Russo, M. A., Dorn, G. W., Ellingsen, Ø., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K. L., ... Condorelli, G. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine*, 13(5), 613–618.
 34. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V. B., Brenner, S. E., Batalov, S., Forrest, A. R. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., ... Hayashizaki, Y. (2005). Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740), 1559–1563.
 35. Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. In *Cell* (Vol. 136, Issue 4, pp. 642–655).
 36. Cech, T. R., & Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. In *Cell* (Vol. 157, Issue 1, pp. 77–94). Cell Press.
 37. Chang, H., Yi, B., Ma, R., Zhang, X., Zhao, H., & Xi, Y. (2016). CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 6.
 38. Chang, S., Wen, S., Chen, D., & Jin, P. (2009). Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 18, Issue R1).
 39. Chatterjee, S., & Großhans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 461(7263), 546–549.
 40. Chekulaeva, M., & Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 452–460).

41. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, *465*(7298), 584–589.
42. Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L., & Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, *38*(2), 228–233.
43. Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D. A., Kelly, M. G., Fest, S., Visintin, I., Leiser, A., Schwartz, P. E., Rutherford, T., & Mor, G. (2008). Regulation of IKK β by miR-199a affects NF- κ B activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*, *27*(34), 4712–4723.
44. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, *18*(10), 997–1006.
45. Chen, Y., Gao, D. Y., & Huang, L. (2015). In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 81, pp. 128–141). Elsevier.
46. Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., & Lowe, S. W. (2010). Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. *Cancer Cell*, *17*(4), 376–387.
47. Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., & Serrano, M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, *436*(7051), 642.
48. Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 10, Issue 1, pp. 51–57).
49. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *5*(1), 99–118.
50. Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12).
51. Cosgrove, B. D., Gilbert, P. M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S. P., Corbel, S. Y., Llewellyn, M. E., Delp, S. L., & Blau, H. M. (2014). Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nature Medicine*, *20*(3), 255–264.
52. Courtois-Cox, S., Genter Williams, S. M., Reczek, E. E., Johnson, B. W., McGillicuddy, L. T., Johannessen, C. M., Hollstein, P. E., MacCollin, M., & Cichowski, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, *10*(6), 459–472.
53. Croce, C. M., & Calin, G. A. (2005). miRNAs, cancer, and stem cell division. In *Cell* (Vol. 122, Issue 1, pp. 6–7).
54. Cui, H., Ge, J., Xie, N., Banerjee, S., Zhou, Y., Antony, V. B., Thannickal, V. J., & Liu, G. (2017). MIR-34a inhibits lung fibrosis by inducing lung fibroblast senescence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *56*(2), 168–178.
55. Dai, Y., Huang, Y. S., Tang, M., Lv, T. Y., Hu, C. X., Tan, Y. H., Xu, Z. M., & Yin, Y. B. (2007). Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, *16*(12), 939–946.
56. Debacq-Chainiaux, F., Boilan, E., Le Moutier, J. D., Weemaels, G., & Toussaint, O. (2010). P38MAPK in the senescence of human and murine fibroblasts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *694*, 126–137.
57. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., VanSteeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., deBruin, 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.
58. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231–235.
59. Dhahbi, J. M., Atamna, H., Boffelli, D., Magis, W., Spindler, S. R., & Martin, D. I. K. (2011). Deep sequencing reveals novel micrnas and regulation of microRNA expression during cell senescence. *PLoS ONE*, *6*(5).
60. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, *8*(21), 2540–2551.
61. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garré, M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., Maestro, R., Giuseppe Pelicci, P., & D’Adda Di

- Fagagna, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, *444*(7119), 638–642.
62. Di Micco, R., Sulli, G., Dobrev, M., Liontos, M., Botrugno, O. A., Gargiulo, G., dal Zuffo, R., Matti, V., d'Ario, G., Montani, E., Mercurio, C., Hahn, W. C., Gorgoulis, V., Minucci, S., & d'Adda di Fagagna, F. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology*, *13*(3), 292–302.
 63. Di Val Cervo, P. R., Lena, A. M., Nicoloso, M., Rossi, S., Mancini, M., Zhou, H., Saintigny, G., Dellambra, E., Odorisio, T., Mahé, C., Calin, G. A., Candi, E., & Melino, G. (2012). p63-microRNA feedback in keratinocyte senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(4), 1133–1138.
 64. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., & Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(20), 9363–9367.
 65. Dimri, M., Carroll, J. D., Cho, J. H., & Dimri, G. P. (2013). MicroRNA-141 regulates BMI1 expression and induces senescence in human diploid fibroblasts. *Cell Cycle*, *12*(22), 3537–3546.
 66. Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, *489*(7414), 101–108.
 67. Donath, M. Y., Dalmás, É., Sauter, N. S., & Böni-Schnetzler, M. (2013). Inflammation in obesity and diabetes: Islet dysfunction and therapeutic opportunity. In *Cell Metabolism* (Vol. 17, Issue 6, pp. 860–872).
 68. DP, B. (2004). MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.pdf. *Cell*, *116*(2), 281–297.
 69. Du, J., Klein, J. D., Hassounah, F., Zhang, J., Zhang, C., & Wang, X. H. (2014). Aging increases CCN1 expression leading to muscle senescence. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *306*(1).
 70. Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., Khatun, J., Lajoie, B. R., Landt, S. G., Lee, B. K., Pauli, F., Rosenbloom, K. R., Sabo, P., Safi, A., Sanyal, A., ... Lochovsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, *489*(7414), 57–74.
 71. Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 4, Issue 6, pp. 457–467).
 72. Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 2, Issue 12, pp. 919–929). Nat Rev Genet.
 73. Ehninger, D., Li, W., Fox, K., Stryker, M. P., & Silva, A. J. (2008). Reversing Neurodevelopmental Disorders in Adults. In *Neuron* (Vol. 60, Issue 6, pp. 950–960).
 74. Eisenberg, I., Alexander, M. S., & Kunkel, L. M. (2009). miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 13, Issue 1, pp. 2–11).
 75. Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A. A., Lidov, H. G., Kang, P. B., North, K. N., Mitrani-Rosenbaum, S., Flanigan, K. M., Neely, L. A., Whitney, D., Beggs, A. H., Kohane, I. S., & Kunkel, L. M. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(43), 17016–17021.
 76. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal*, *20*(23), 6877–6888.
 77. Erusalimsky, J. D. (2009). Vascular endothelial senescence: From mechanisms to pathophysiology. In *Journal of Applied Physiology* (Vol. 106, Issue 1, pp. 326–332).
 78. Evan, G. I., & d'Adda di Fagagna, F. (2009). Cellular senescence: hot or what? In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 19, Issue 1, pp. 25–31).
 79. Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G. H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M. A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., & Croce, C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31).
 80. Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, *79*(1), 351–379.

81. Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2066–2075.
82. 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.
83. Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., & Strandberg, T. (2013). The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 274–283).
84. Gatfield, D., Le Martelot, G., Vejnar, C. E., Gerlach, D., Schaad, O., Fleury-Olela, F., Ruskeepää, A. L., Oresic, M., Esau, C. C., Zdobnov, E. M., & Schibler, U. (2009). Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes and Development*, 23(11), 1313–1326.
85. Geiger, H., De Haan, G., & Carolina Florian, M. (2013). The ageing haematopoietic stem cell compartment. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 376–389).
86. Giglio, S., Cirombella, R., Amodeo, R., Portaro, L., Lavra, L., & Vecchione, A. (2013). MicroRNA miR-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27Kip1 and p16INK4a. *Journal of Cellular Physiology*, 228(10), 2015–2023.
87. Gil, J., & Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: All for one or one for all. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 9, pp. 667–677).
88. Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J., & Schier, A. F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312(5770), 75–79.
89. Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. In *Cell* (Vol. 128, Issue 4, pp. 635–638).
90. Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 816–827).
91. Gorospe, M., & Abdelmohsen, K. (2011). MicroRegulators come of age in senescence. In *Trends in Genetics* (Vol. 27, Issue 6, pp. 233–241). Trends Genet.
92. Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 415–445.
93. Gysler, S. M., Mulla, M. J., Guerra, M., Brosens, J. J., Salmon, J. E., Chamley, L. W., & Abrahams, V. M. (2016). Antiphospholipid antibody-induced miR-146a-3p drives trophoblast interleukin-8 secretion through activation of Toll-like receptor 8. *Molecular Human Reproduction*, 22(7), 465–474.
94. Hall, B. M., Balan, V., Gleiberman, A. S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L. P., Rydkina, E., Vujcic, S., Balan, K., Gitlin, I., Leonova, K., Polinsky, A., Chernova, O. B., & Gudkov, A. V. (2016). Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging*, 8(7), 1294–1315.
95. Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460.
96. Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., van Steeg, H., & Vijg, J. (2003). Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science (New York, N.Y.)*, 299(5611), 1355–1359.
97. Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621.
98. Hayflick, Leonard. (1992). Aging, longevity, and immortality in vitro. *Experimental Gerontology*, 27(4), 363–368.
99. He, L., He, X., Lim, L. P., De Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. A., & Hannon, G. J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148), 1130–1134.
100. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular Cell*, 14(4), 501–513.
101. Hoenicke, L., & Zender, L. (2012). Immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. In *Carcinogenesis* (Vol. 33, Issue 6, pp. 1123–1126).
102. Hu, W., Chan, C. S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J. S., Tang, L. H., Levine, A. J., & Feng, Z. (2010). Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 by MicroRNA miR-504. *Molecular Cell*, 38(5), 689–699.
103. Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J., & Hodny, Z. (2012). IL1-and TGF β -Nox4 signaling,

- oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine “Bystander senescence.” *Aging*, 4(12), 932–951.
104. Humbert, P. O., Verona, R., Trimarchi, J. M., Rogers, C., Dandapani, S., & Lees, J. A. (2000). *E2f3 is critical for normal cellular proliferation*.
 105. Iglesias-Bartolome, R., Patel, V., Cotrim, A., Leelahavanichkul, K., Molinolo, A. A., Mitchell, J. B., & Gutkind, J. S. (2012). MTOR inhibition prevents epithelial stem cell senescence and protects from radiation-induced mucositis. *Cell Stem Cell*, 11(3), 401–414.
 106. Ikeda, S., Kong, S. W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P. D., Golub, T. R., Pieske, B., & Pu, W. T. (2007). Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics*, 31(3), 367–373.
 107. Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y. M., Kameoka, Y., Takahashi, N., & Sawada, K. (2009). MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*, 113(2), 396–402.
 108. Ito, T., Yagi, S., & Yamakuchi, M. (2010). MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(4), 735–740.
 109. Jazbutyte, V., Fiedler, J., Kneitz, S., Galuppo, P., Just, A., Holzmann, A., Bauersachs, J., & Thum, T. (2013). MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. *Age*, 35(3), 747–762.
 110. Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S. R., Macauley, M. S., Rickert, R. C., & Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Frontiers in Genetics*, 6(DEC).
 111. Jopling, C. L. (2012). Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. In *RNA Biology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 137–142). Taylor and Francis Inc.
 112. Jun, J. Il, & Lau, L. F. (2010a). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*, 2(9), 627–631.
 113. Jun, J. Il, & Lau, L. F. (2010b). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature Cell Biology*, 12(7), 676–685.
 114. Kabir, T. D., Leigh, R. J., Tasena, H., Mellone, M., Coletta, R. D., Parkinson, E. K., Prime, S. S., Thomas, G. J., Paterson, I. C., Zhou, D., McCall, J., Speight, P. M., & Lambert, D. W. (2016). A miR-335/COX-2/PTEN axis regulates the secretory phenotype of senescent cancer-associated fibroblasts. *Aging*, 8(8), 1608–1635.
 115. Kaiser, J. (2008). DNA sequencing: A plan to capture human diversity in 1000 genomes. In *Science* (Vol. 319, Issue 5862, p. 395).
 116. Kang, T. W., Yevesa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., ... Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551.
 117. Kiga, K., Mimuro, H., Suzuki, M., Shinozaki-Ushiku, A., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., Ogawa, M., Iwasaki, Y. W., Kayo, H., Fukuda-Yuzawa, Y., Yashiro, M., Fukayama, M., Fukao, T., & Sasakawa, C. (2014). Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nature Communications*, 5.
 118. Kim, K.-H., Chen, C.-C., Monzon, R. I., & Lau, L. F. (2013). Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 33(10), 2078–2090.
 119. Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 2, pp. 126–139).
 120. Kim, W. Y., & Sharpless, N. E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. In *Cell* (Vol. 127, Issue 2, pp. 265–275).
 121. Kim, Y. K., Wee, G., Park, J., Kim, J., Baek, D., Kim, J. S., & Kim, V. N. (2013). TALEN-based knockout library for human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(12), 1458–1464.
 122. Kirkland, J. L., & Tchkonina, T. (2017). Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*, 21, 21–28.
 123. Krizhanovskiy, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., & Lowe, S. W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, 134(4), 657–667.
 124. Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M. B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H. J., Schübeler, D., Oertner, T. G., Schratt, G., Bibel, M., Roska, B., & Filipowicz, W. (2010). Characterizing Light-Regulated Retinal MicroRNAs Reveals Rapid Turnover as a

- Common Property of Neuronal MicroRNAs. *Cell*, 141(4), 618–631.
125. Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 9, pp. 597–610).
 126. Kuhn, D. E., Nuovo, G. J., Martin, M. M., Malana, G. E., Pleister, A. P., Jiang, J., Schmittgen, T. D., Terry, A. V., Gardiner, K., Head, E., Feldman, D. S., & Elton, T. S. (2008). Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(3), 473–477.
 127. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. In *Genes and Development* (Vol. 24, Issue 22, pp. 2463–2479). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 128. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019–1031.
 129. Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 9, Issue 2, pp. 81–94).
 130. Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A. L., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., & Li, Y. (2011). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*, 30(7), 843–853.
 131. Kwa, F. A. A., & Jackson, D. E. (2018). Manipulating the epigenome for the treatment of disorders with thrombotic complications. In *Drug Discovery Today* (Vol. 23, Issue 3, pp. 719–726). Elsevier Ltd.
 132. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–858.
 133. Lagos-Quintana, Mariana, Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Current Biology*, 12(9), 735–739.
 134. Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J. L., Yang, X., Ahmed, F., Navarro, F., Dykxhoorn, D., Lieberman, J., & Gorospe, M. (2008). p16INK4a translation suppressed by miR-24. *PLoS ONE*, 3(3).
 135. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., Levine, R., McEwan, P., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921.
 136. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foà, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., ... Tuschl, T. (2007). A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*, 129(7), 1401–1414.
 137. Le, M. T. N., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., & Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes and Development*, 23(7), 862–876.
 138. LeBrasseur, N. K., Tchkonina, T., & Kirkland, J. L. (2015). Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 83, 11–18.
 139. Lee, J. H., Park, S. J., Jeong, S. Y., Kim, M. J., Jun, S., Lee, H. S., Chang, I. Y., Lim, S. C., Yoon, S. P., Yong, J., & You, H. J. (2015). MicroRNA-22 suppresses DNA repair and promotes genomic instability through targeting of MDC1. *Cancer Research*, 75(7), 1298–1310.
 140. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
 141. Li, G., Luna, C., Qiu, J., Epstein, D. L., & Gonzalez, P. (2009). Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(11–12), 731–741.
 142. Li, G., Luna, C., Qiu, J., Epstein, D. L., & Gonzalez, P. (2010). Targeting of integrin $\beta 1$ and kinesin 2α by microRNA 183. *Journal of Biological Chemistry*, 285(8), 5461–5471.
 143. Li, L., Masica, D., Ishida, M., Tomuleasa, C., Umegaki, S., Kallou, A. N., Georgiades, C., Singh, V. K., Khashab, M., Amateau, S., Li, Z., Okolo, P., Lennon, A. M., Saxena, P., Geschwind, J. F., Schlachter, T., Hong, K., Pawlik, T. M., Canto, M., ... Selaru, F. M. (2014). Human bile contains MicroRNA-laden extracellular vesicles that can be used for cholangiocarcinoma diagnosis. *Hepatology*, 60(3), 896–907.
 144. Li, M., Marin-Muller, C., Bharadwaj, U., Chow, K. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). MicroRNAs: Control and loss of control in human physiology and disease. In *World Journal of Surgery* (Vol. 33, Issue 4, pp. 667–684).
 145. Li, Y., He, Q., Wen, X., Hong, X., Yang, X., Tang, X., Zhang, P., Lei, Y., Sun, Y., Zhang, J., Wang,

- Y., Ma, J., & Liu, N. (2019). EZH2-DNMT1-mediated epigenetic silencing of miR-142-3p promotes metastasis through targeting ZEB2 in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death and Differentiation*, 26(6), 1089–1106.
146. Liang, J., Zhang, Y., Jiang, G., Liu, Z., Xiang, W., Chen, X., Chen, Z., & Zhao, J. (2014). MiR-138 induces renal carcinoma cell senescence by targeting EZH2 and is downregulated in human clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Research*, 21(2), 83–91.
 147. Liu, F. J., Wen, T., & Liu, L. (2012). MicroRNAs as a novel cellular senescence regulator. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 11, Issue 1, pp. 41–50). Elsevier.
 148. Liu, X., Yu, J., Jiang, L., Wang, A., Shi, F., Ye, H., & Zhou, X. (2009). MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics and Proteomics*, 6(3), 134–139.
 149. Loaliza, N., & Demaria, M. (2016). Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key? In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1865, Issue 2, pp. 155–167). Elsevier B.V.
 150. Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., Manis, J. P., Van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T. T., Alt, F. W., & Chen, J. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular Cell*, 21(2), 187–200.
 151. Lujambio, A., & Lowe, S. W. (2012). The microcosmos of cancer. In *Nature* (Vol. 482, Issue 7385, pp. 347–355).
 152. Lukiw, W. J. (2007). Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *NeuroReport*, 18(3), 297–300.
 153. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), 95–98.
 154. Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P., & Weinberg, R. A. (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), 705–709.
 155. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S. ichiro, Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., & Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2a promotes cell survival under stress. *Cell*, 107(2), 137–148.
 156. Maes, O. C., Sarojini, H., & Wang, E. (2009). Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), 109–119.
 157. Marasa, B. S., Srikantan, S., Martindale, J. L., Kim, M. M., Lee, E. K., Gorospe, M., & Abdelmohsen, K. (2010). MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence. *Aging*, 2(6), 333–343.
 158. Marasa, B. S., Srikantan, S., Masuda, K., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Yang, X., Martindale, J. L., Rinker-Schaeffer, C. W., & Gorospe, M. (2009). Increased MKK4 abundance with replicative senescence is linked to the joint reduction of multiple microRNAs. *Science Signaling*, 2(94).
 159. Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L. L., Steitz, J. A., & Dimaio, D. (n.d.). *miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence*.
 160. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563–574.
 161. Martinez, J., & Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes and Development*, 18(9), 975–980.
 162. Matsushima, K., Isomoto, H., Yamaguchi, N., Inoue, N., Machida, H., Nakayama, T., Hayashi, T., Kunizaki, M., Hidaka, S., Nagayasu, T., Nakashima, M., Ujifuku, K., Mitsutake, N., Ohtsuru, A., Yamashita, S., Korpai, M., Kang, Y., Gregory, P. A., Goodall, G. J., ... Nakao, K. (2011). MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Journal of Translational Medicine*, 9.
 163. Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 14, Issue SPEC. ISS. 1).
 164. McCarthy, J. J., & Esser, K. A. (2007). MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 102(1), 306–313.
 165. Menghini, R., Casagrande, V., Cardellini, M., Martelli, E., Terrinoni, A., Amati, F., Vasa-Nicotera, M., Ippoliti, A., Novelli, G., Melino, G., Lauro, R., & Federici, M. (2009). MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation*, 120(15), 1524–1532.

166. Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 1, pp. 31–46). Nat Rev Genet.
167. Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Van Der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, *436*(7051), 720–724.
168. Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., & Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, *105*(13), 1541–1544.
169. Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., & Horvitz, H. R. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biology*, *5*(9).
170. Mitomo, S., Maesawa, C., Ogasawara, S., Iwaya, T., Shibazaki, M., Yashima-Abo, A., Kotani, K., Oikawa, H., Sakurai, E., Izutsu, N., Kato, K., Komatsu, H., Ikeda, K., Wakabayashi, G., & Masuda, T. (2008). Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Science*, *99*(2), 280–286.
171. Mohr, A. M., & Mott, J. L. (2015). Overview of microRNA biology. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 35, Issue 1, pp. 3–11). Thieme Medical Publishers, Inc.
172. Mudhasani, R., Zhu, Z., Hutvagner, G., Eischen, C. M., Lyle, S., Hall, L. L., Lawrence, J. B., Imbalzano, A. N., & Jones, S. N. (2008). Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells. *Journal of Cell Biology*, *181*(7), 1055–1063.
173. Munk, R., Panda, A. C., Grammatikakis, I., Gorospe, M., & Abdelmohsen, K. (2018). Senescence-Associated MicroRNAs. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 334, pp. 1–26). Elsevier Inc.
174. 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). XProgrammed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, *155*(5), 1104.
175. Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 7, pp. 482–496). Nature Publishing Group.
176. Naeini, M. M., & Ardekani, A. M. (2009). Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *1*(2), 55–70.
177. Naesens, M. (2011). Replicative senescence in kidney aging, renal disease, and renal transplantation. In *Discovery medicine* (Vol. 11, Issue 56, pp. 65–75).
178. Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., & Asahara, H. (2008). Expression of MicroRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis and Rheumatism*, *58*(5), 1284–1292.
179. Narita, M., Nunez, 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.
180. Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., & von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence. In *Aging Cell* (Vol. 11, Issue 2, pp. 345–349).
181. Nelson, P. T., Baldwin, D. A., Kloosterman, W. P., Kauppinen, S., Plasterk, R. H. A., & Mourelatos, Z. (2006). RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA*, *12*(2), 187–191.
182. Neumeister, P., Albanese, C., Balent, B., Grealley, J., & Pestell, R. G. (2002). Senescence and epigenetic dysregulation in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *34*(11), 1475–1490.
183. Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Åkerström, T., Nielsen, A. R., Pedersen, B. K., & Laye, M. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, *588*(20), 4029–4037.
184. Nishino, J., Kim, I., Chada, K., & Morrison, S. J. (2008). Hmga2 Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in Young but Not Old Mice by Reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell*, *135*(2), 227–239.
185. Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K., & Carson, D. A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, *368*(6473), 753–756.
186. Noguchi, S., Mori, T., Otsuka, Y., Yamada, N., Yasui, Y., Iwasaki, J., Kumazaki, M., Maruo, K., & Akao, Y. (2012). Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein

- in human melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11769–11777.
187. Noonan, E. J., Place, R. F., Basak, S., Pookot, D., & Li, L. C. (2010). miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 1(5), 349–358.
 188. Noureddine, H., Gary-Bobo, G., Alifano, M., Marcos, E., Saker, M., Vienney, N., Amsellem, V., Maitre, B., Chaouat, A., Chouaid, C., Dubois-Rande, J. L., Damotte, D., & Adnot, S. (2011). Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circulation Research*, 109(5), 543–553.
 189. O’Loughlen, A., Brookes, S., Martin, N., Rapisarda, V., Peters, G., & Gil, J. (2015). CBX7 and miR-9 are part of an autoregulatory loop controlling p16INK4a. *Aging Cell*, 14(6), 1113–1121.
 190. Okada, M., Kim, H. W., Matsu-Ura, K., Wang, Y. G., Xu, M., & Ashraf, M. (2016). Abrogation of Age-Induced MicroRNA-195 Rejuvenates the Senescent Mesenchymal Stem Cells by Reactivating Telomerase. *Stem Cells*, 34(1), 148–159. <https://doi.org/10.1002/stem.2211>
 191. Osaki, M., Takeshita, F., Sugimoto, Y., Kosaka, N., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Kobayashi, E., Yamada, T., Kawai, A., Inoue, T., Ito, H., Oshimura, M., & Ochiya, T. (2011). MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloproteinase-13 expression. *Molecular Therapy*, 19(6), 1123–1130.
 192. Overhoff, M. G., Garbe, J. C., Koh, J., Stampfer, M. R., Beach, D. H., & Bishop, C. L. (n.d.). *Cellular senescence mediated by p16 INK4A-coupled miRNA pathways*.
 193. Park, S. Y., Lee, J. H., Ha, M., Nam, J. W., & Kim, V. N. (2009). miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 α and CDC42. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(1), 23–29.
 194. Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., & Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 5(8), 741–747.
 195. Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., & von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, 6, 347.
 196. Passos, J. F., Simillion, C., Hallinan, J., Wipat, A., & Von Zglinicki, T. (2009). Cellular senescence: Unravelling complexity. In *Age* (Vol. 31, Issue 4, pp. 353–363).
 197. Pavet, V., Portal, M. M., Moulin, J. C., Herbrecht, R., & Gronemeyer, H. (2011). Towards novel paradigms for cancer therapy. In *Oncogene* (Vol. 30, Issue 1, pp. 1–20). Oncogene.
 198. Peschansky, V. J., & Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. In *Epigenetics* (Vol. 9, Issue 1, pp. 3–12). Taylor and Francis Inc.
 199. Philipot, D., Guérit, D., Platano, D., Chuchana, P., Olivotto, E., Espinoza, F., Dorandeu, A., Pers, Y. M., Piette, J., Borzi, R. M., Jorgensen, C., Noel, D., & Brondello, J. M. (2014). P16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 16(1).
 200. Pichiorri, F., Suh, S. S., Rocci, A., De Luca, L., Taccioli, C., Santhanam, R., Zhou, W., Benson, D. M., Hofmainster, C., Alder, H., Garofalo, M., Di Leva, G., Volinia, S., Lin, H. J., Perrotti, D., Kuehl, M., Aqeilan, R. I., Palumbo, A., & Croce, C. M. (2010). Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*, 18(4), 367–381.
 201. Pitiyage, G. N., Slijepcevic, P., Gabrani, A., Chianea, Y. G., Lim, K. P., Prime, S. S., Tilakaratne, W. M., Fortune, F., & Parkinson, E. K. (2011). Senescent mesenchymal cells accumulate in human fibrosis by a telomere-independent mechanism and ameliorate fibrosis through matrix metalloproteinases. *Journal of Pathology*, 223(5), 604–617.
 202. Ramachandran, V., & Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, 321(5895), 1490–1492.
 203. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelli, A. E., Bettlinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906.
 204. Ren, X. S., Yin, M. H., Zhang, X., Wang, Z., Feng, S. P., Wang, G. X., Luo, Y. J., Liang, P. Z., Yang, X. Q., He, J. X., & Zhang, B. L. (2014). Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting E2F3 in human lung cancer cells. *Cancer Letters*, 344(2), 195–203.
 205. Rossato, M., Curtale, G., Tamassia, N., Castellucci, M., Mori, L., Gasperini, S., Mariotti, B., De Luca, M., Mirolo, M., Cassatella, M. A., Locati, M., & Bazzoni, F. (2012). IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 109(45), E3101-10.
206. Roth, E., & Cao, J. (2015). miR-181 suppresses metastasis via MMP-14. In *Aging* (Vol. 7, Issue 10, pp. 740–741). Impact Journals LLC.
 207. Samper, E., Nicholls, D. G., & Melov, S. (2003). Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. *Aging Cell*, 2(5), 277–285.
 208. Sato, S., Katsushima, K., Shinjo, K., Hatanaka, A., Ohka, F., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Soga, N., Takahashi, S., & Kondo, Y. (2016). Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Research*, 76(14), 4192–4202.
 209. Scaffidi, P., & Misteli, T. (2006). Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, 312(5776), 1059–1063.
 210. Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., & Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283–289.
 211. Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5(3).
 212. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, 88(5), 593–602.
 213. Sharpless, N. E., & DePinho, R. A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 703–713).
 214. Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 1, Issue 1, pp. 72–76). European Association for Cardio-Thoracic Surgery.
 215. 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 and Development*, 25(24), 2579–2593.
 216. Soifer, H. S., Rossi, J. J., & Sætrom, P. (2007). MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. In *Molecular Therapy* (Vol. 15, Issue 12, pp. 2070–2079). Nature Publishing Group.
 217. Sokolova, V., Fiorino, A., Zoni, E., Crippa, E., Reid, J. F., Gariboldi, M., & Pierotti, M. A. (2015). The Effects of miR-20a on p21: Two Mechanisms Blocking Growth Arrest in TGF- β -Responsive Colon Carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*, 230(12), 3105–3114.
 218. Song, J., Jin, E. H., Kim, D., Kim, K. Y., Chun, C. H., & Jin, E. J. (2015). MicroRNA-222 regulates MMP-13 via targeting HDAC-4 during osteoarthritis pathogenesis. *BBA Clinical*, 3(1), 79–89.
 219. Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodriguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A. L., Perdiguerro, E., & Muñoz-Cánoves, P. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*, 506(7488), 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature13013>
 220. Stone, S., Jiang, P., Dayananth, P., Tavtigian, S. V., Katcher, H. L., Parry, D., Peters, G. G., & Kamb, A. M. R. (1995). Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Undefined*.
 221. 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). XSenescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155(5), 1119.
 222. Suh, N. (2018). MicroRNA controls of cellular senescence. In *BMB Reports* (Vol. 51, Issue 10, pp. 493–499). The Biochemical Society of the Republic of Korea.
 223. Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B. A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., Dong, M. Q., Frangou, C. G., Yates, J. R., Wright, P. E., & Han, J. (2007). PRAK Is Essential for ras-Induced Senescence and Tumor Suppression. *Cell*, 128(2), 295–308.
 224. Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529–533.
 225. Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A., & Barciszewski, J. (2005). A new frontier for molecular medicine: Noncoding RNAs. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1756, Issue 1, pp. 65–75).
 226. Tchkonja, T., Zhu, Y., Deursen, J. Van, Campisi, J., & Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 966–972.
 227. Thalyana Smith-Vikos, & Frank J Slack (2012 Jan 1), MicroRNAs and their roles in aging, *J Cell Sci*. 125(Pt1):7-17.doi:10.1242/jcs.099200
 228. Théry, C. (2011). Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. In *F1000 Biology Reports* (Vol. 3, Issue 1).

229. Thum, T., Catalucci, D., & Bauersachs, J. (2008). MicroRNAs: Novel regulators in cardiac development and disease. In *Cardiovascular Research* (Vol. 79, Issue 4, pp. 562–570).
230. Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *The Journal of Immunology*, 179(8), 5082–5089.
231. Tili, E., Michaille, J. J., Costinean, S., & Croce, C. M. (2008). MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. In *Nature Clinical Practice Rheumatology* (Vol. 4, Issue 10, pp. 534–541).
232. Tomé, M., Sepúlveda, J. C., Delgado, M., Andrades, J. A., Campisi, J., González, M. A., & Bernad, A. (2014). MiR-335 correlates with senescence/aging in human mesenchymal stem cells and inhibits their therapeutic actions through inhibition of AP-1 activity. *Stem Cells*, 32(8), 2229–2244.
233. Valadkhan, S., & Gunawardane, L. S. (2013). Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. *Essays in Biochemistry*, 54, 79–90.
234. Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., & Olson, E. N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316(5824), 575–579.
235. Venkataraman, S., Alimova, I., Fan, R., Harris, P., Foreman, N., & Vibhakar, R. (2010). MicroRNA 128a increases intracellular ROS level by targeting Bmi-1 and inhibits medulloblastoma cancer cell growth by promoting senescence. *PLoS ONE*, 5(6).
236. Verma, R. P., & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(6), 2223–2268.
237. Wang, J. C., & Bennett, M. (2012). Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. In *Circulation Research* (Vol. 111, Issue 2, pp. 245–259).
238. Wang, Y., Scheiber, M. N., Neumann, C., Calin, G. A., & Zhou, D. (2011). MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81(3), 839–848.
239. Wang, J., Meng, X., Dobrovolskaya, O. B., Orlov, Y. L., & Chen, M. (2017). Non-coding RNAs and Their Roles in Stress Response in Plants Wang J et al / miRNA and lncRNA in Plant Stress Response. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 15, Issue 5, pp. 301–312). Beijing Genomics Institute.
240. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562.
241. Watson, J. D. (1990). The human genome project: Past, present, and future. *Science*, 248(4951), 44–49.
242. Wei, S., Wei, W., & Sedivy, J. M. (1999). Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Research*, 59(7), 1539–1543.
243. Wiemann, S. U., Satyanarayana, A., Tsahuridu, M., Tillmann, H. L., Zender, L., Klempnauer, J., Flemming, P., Franco, S., Blasco, M. A., Manns, M. P., & Lenhard Rudolph, K. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB Journal*, 16(9), 935–942.
244. Wolstein, J. M., Lee, D. H., Michaud, J., Buot, V., Stefanchik, B., & Plotkin, M. D. (2010). INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 299(6).
245. Xiao, J., Lin, H., Luo, X., Luo, X., & Wang, Z. (2011). MiR-605 joins p53 network to form a p53:miR-605:Mdm2 positive feedback loop in response to stress. *EMBO Journal*, 30(3), 524–532.
246. Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., Matsunaga, J., Takahashi, R. u., Takata, T., Shimamoto, A., Ochiya, T., & Tahara, H. (2011). miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 193(2), 409–424.
247. Xu, N., Zhang, L., Meisgen, F., Harada, M., Heilborn, J., Homey, B., Grandér, D., Stähle, M., Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2012). MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29899–29908.
248. Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656–660.

249. Yamakuchi, M., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(36), 13421–13426.
250. Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G., & Wang, Z. (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Medicine*, *13*(4), 486–491.
251. Yao, Q., Chen, Y., & Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 51, pp. 11–17). Elsevier Ltd.
252. Yi, C., Wang, Q., Wang, L., Huang, Y., Li, L., Liu, L., Zhou, X., Xie, G., Kang, T., Wang, H., Zeng, M., Ma, J., Zeng, Y., & Yun, J. P. (2012). MiR-663, a microRNA targeting p21 WAF1/CIP1, promotes the proliferation and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, *31*(41), 4421–4433.
253. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, *17*(24), 3011–3016.
254. Young, A. P., Schisio, S., Minamishima, Y. A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., & Kaelin, W. G. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nature Cell Biology*, *10*(3), 361–369.
255. Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F. J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F. M., & Narita, M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development*, *23*(7), 798–803.
256. Yu, Y., Gao, R., Kaul, Z., Li, L., Kato, Y., Zhang, Z., Groden, J., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. (2016). Loss-of-function screening to identify miRNAs involved in senescence: Tumor suppressor activity of miRNA-335 and its new target CARE. *Scientific Reports*, *6*.
257. Zamore, P. D., & Haley, B. (2005). Ribo-gnome: The big world of small RNAs. In *Science* (Vol. 309, Issue 5740, pp. 1519–1524).
258. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. In *Developmental Biology* (Vol. 302, Issue 1, pp. 1–12). Academic Press Inc.
259. Zhang, D., Song, Y., Wang, Y., Liu, X., Yu, W., & Ma, X. (2016). Insight of in Vitro Small-Interfering RNA Release from Chitosan Nanoparticles under Enzymolysis with Förster Resonance Energy Transfer Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(1), 301–307.
260. Zhang, J., Jia, J., Zhao, L., Li, X., Xie, Q., Chen, X., Wang, J., & Lu, F. (2016). Down-regulation of microRNA-9 leads to activation of IL-6/Jak/STAT3 pathway through directly targeting IL-6 in HeLa cell. *Molecular Carcinogenesis*, *55*(5), 732–742.
261. Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. In *Journal of integrative bioinformatics* (Vol. 16, Issue 3). NLM (Medline).
262. Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D., & Adams, P. D. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental Cell*, *8*(1), 19–30.
263. Zhao, T., Li, J., & Chen, A. F. (2010). MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *299*(1).
264. Zhao, Y., Samal, E., & Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, *436*(7048), 214–220.
265. Zheng, X., Chopp, M., Lu, Y., Buller, B., & Jiang, F. (2013). MiR-15b and miR-152 reduce glioma cell invasion and angiogenesis via NRP-2 and MMP-3. *Cancer Letters*, *329*(2), 146–154.
266. Zhu, F., Li, Y., Zhang, J., Piao, C., Liu, T., Li, H. H., & Du, J. (2013). Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One*, *8*(9).