



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ»**

ΤΣΙΝΑΛΗ ΣΟΦΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Επιβλέπουσα): Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Παν/μιου Θεσσαλίας

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Μέλος): Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Παν/μιου Θεσσαλίας

ΔΗΜΑΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Μέλος): Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Παν/μιου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS
«CAVEOLIN-1 AND CELLULAR SENESENCE»

TSINALI SOPHIA

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βλάβες του DNA διεγείρουν την επαγωγή και των δύο τύπων κυτταρικής γήρανσης (αναδιπλασιαστική και επαγόμενη από το στρες) και μπορούν να ανιχνευθούν μέσω αντιπροσωπευτικών δεικτών. Σημαντικό παράγοντα πρόκλησης βλαβών στο DNA αποτελεί το οξειδωτικό στρες. Η καβεολίνη-1, το κύριο δομικό συστατικό των caveolae της πλασματικής μεμβράνης, επίσης φαίνεται να σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση.

Στη συγκεκριμένη εργασία, διερευνήθηκε ο ρόλος της καβεολίνης-1 σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα σε διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξής τους και κατά την πρόκληση εξωγενούς οξειδωτικού στρες. Αρχικά, εξακριβώθηκε η γήρανση των κυττάρων με χρώση sen-beta-gal, ενώ προσδιορίστηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p16^{INK4a}, γνωστού αναστολέα του κυτταρικού κύκλου και δείκτη της γήρανσης, σε νεαρά και φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα. Επιπλέον, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 κατά την αναδιπλασιαστική αλλά και κατά την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες (μέσω H₂O₂) γήρανση. Τέλος, αναλύθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της σε σχέση με την παρουσία βλαβών του DNA (μέσω ανίχνευσης της πρωτεΐνης 53BP1 που προσδένεται στα DSBs) σε κύτταρα υγιά και νεαρά, γηρασμένα λόγω οξειδωτικού στρες (H₂O₂), και σε κύτταρα μέσης ηλικίας.

Η χρώση sen-beta-gal έδειξε πως τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε εξωγενές οξειδωτικό στρες, όπως και τα κύτταρα προχωρημένης ηλικίας ήταν όντως γηρασμένα. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p16^{INK4a} ήταν διπλάσια στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά, υποδηλώνοντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά στα middle aged κύτταρα και είναι λιγότερο αυξημένα στα γηρασμένα κύτταρα. Στην επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση, τα επίπεδά της στα κύτταρα που επώασθηκαν με H₂O₂ ήταν ελαφρώς αυξημένα σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς επίδραση. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τη σχέση της καβεολίνης-1 με την κυτταρική γήρανση και παρέχουν ενδείξεις ότι η καβεολίνη-1 καθοδηγεί τη γήρανση των κυττάρων.

Αναφορικά με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της καβεολίνης-1, στα νεαρά κύτταρα εντοπίστηκε στις φυσιολογικές της θέσεις (μεμβράνη/κυτταρόπλασμα) και δεν ανιχνεύθηκαν εστίες 53BP1. Στα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες, η καβεολίνη-1 εντοπίστηκε πέρα από τις φυσιολογικές της θέσεις και εντός του πυρήνα και παρατηρήθηκαν πυρηνικές εστίες 53BP1. Στα μέσης ηλικίας κύτταρα, σε κάποιους από τους πυρήνες ανιχνεύθηκαν εστίες 53BP1 και καβεολίνη-1. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως κατά την πρόωρη γήρανση, ένα ποσοστό καβεολίνης-1 μετατοπίζεται στον πυρήνα και ίσως συνδέεται με την παρουσία βλαβών στο DNA.

Λέξεις-κλειδιά: καβεολίνη-1, κυτταρική γήρανση, οξειδωτικό στρες, p16^{INK4a}, 53BP1

ABSTRACT

DNA damage triggers the induction of both types of cellular senescence (replicative and stress-induced premature) and can be identified through representative markers. Oxidative stress plays an important role in causing DNA damage. Caveolin-1, the major structural component of plasma membrane caveolae, seems also to be associated with cell aging.

In the current study, the role of caveolin-1 was investigated at different stages of development in human mesenchymal stem cells (hMSCs). In addition, the role of caveolin-1 was examined when inducing exogenous oxidative stress in hMSCs. Initially, senescent cells were detected by sen-beta-gal staining, and the protein levels of p16^{INK4a}, a known inhibitor of cell cycle and a marker of senescence, were determined in young and normal aged cells. Caveolin-1 protein levels were investigated during both replicative and oxidative stress induced premature senescence (SIPS) (via H₂O₂). Finally, its subcellular localization was analyzed in relation to the presence of DNA damage (through 53BP1 protein detection that is attached to DSBs) in young healthy cells, in aged cells due to oxidative stress, and in middle aged cells.

The sen-beta-gal staining indicated that the cells underwent exogenous oxidative stress, as well as the older cells, were indeed senescent. In addition, p16^{INK4a} protein levels were twice as high in old cells as in young ones, indicating cell cycle arrest. Caveolin-1 protein levels during replicative senescence appear to be significantly increased in middle aged cells and are less increased in older cells. In stress-induced premature senescence, caveolin-1 levels in H₂O₂-incubated cells were slightly increased compared to the control cells. These results enhance the correlation between caveolin-1 and cellular senescence and provide evidence that caveolin-1 leads to cell aging.

Regarding the subcellular localization of caveolin-1, in young cells, it was detected in its original positions (cytoplasm/membrane) and no 53BP1 foci were detected. In cells underwent oxidative stress, caveolin-1 was detected to its normal positions and into the nuclei and 53BP1 foci were observed too. In middle aged cells, caveolin-1 and 53BP1 foci were detected in some of the nuclei. The results show that during SIPS, an amount of caveolin-1 is displaced in the nucleus and may be associated with the presence of DNA damage.

Key-words: caveolin-1, cellular senescence, oxidative stress, p16^{INK4a}, 53BP1

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Εισαγωγή.....	6
A.1 Βλαστοκύτταρα	6
A.2 Κυτταρική Γήρανση	12
A.3 Καβεολίνη-1	23
A.4 Καβεολίνη-1 και κυτταρική γήρανση	31
A.5 Σκοπός	39
B. Υλικά και μέθοδοι.....	39
B.1 Υλικά & συνθήκες καλλιέργειας.....	39
B2. Απόψυξη & ανακαλλιέργεια βλαστοκυττάρων.....	41
B3. Επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	42
B4. Απομόνωση & ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	43
B5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western Blot	46
B6. Ανοσοφθορισμός	48
B7. Ανίχνευση γήρανσης με χρώση Senescence-Associated β-galactosidase (SA-β-gal).....	50
Γ. Αποτελέσματα	51
Γ1. Οπτικοποίηση της γήρανσης των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε SIPS μέσω SA-βgal	52
Γ2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της p16INK4a σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.	53
Γ3. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της καβεολίνης-1 σε βλαστοκύτταρα με αναδιπλασιαστική και με επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση.....	54
Γ4. Έλεγχος του κυτταρικού εντοπισμού της καβεολίνης-1 και της 53BP1 σε νεαρά NT, σε επαγόμενα γηρασμένα κύτταρα και σε κύτταρα μέσης ηλικίας με μικροσκοπία φθορισμού.....	57
Δ. Συζήτηση	59
E. Βιβλιογραφία.....	63

A. Εισαγωγή

A.1 Βλαστοκύτταρα

Τα βλαστοκύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που συναντώνται σχεδόν σε όλα τα πολυκύτταρα έμβια όντα και χαρακτηρίζονται από δύο βασικές ιδιότητες. Αρχικά, διαθέτουν την ικανότητα «αυτο-ανανέωσης» παράγοντας νέα βλαστικά κύτταρα. Δευτερευόντως, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε έναν ή και σε περισσότερους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους κατά τη διάρκεια της ζωής, λόγω του διευρυμένου αναπτυξιακού δυναμικού τους (Jeevani 2011). Επομένως, κατά τη διαίρεση ενός βλαστοκυττάρου, κάθε νέο κύτταρο που παράγεται, μπορεί είτε να παραμείνει αδιαφοροποίητο, είτε να διαφοροποιηθεί σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο με εξειδικευμένα χαρακτηριστικά και λειτουργία (Cruz et al., 2010).

Δεν μπορούν όλα τα βλαστοκύτταρα να σχηματίσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους. Αντίθετα, διαφέρουν ως προς τη δυναμικότητά τους. Το δυναμικό διαφοροποίησης είναι αυτό που καθορίζει μέχρι ποιο βαθμό μπορεί ένα κύτταρο να διαφοροποιηθεί. Έτσι, τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες με φθίνουσα κατάταξη ως προς το δυναμικό διαφοροποίησης (Εικόνα 1).

- **Παντοδύναμα βλαστοκύτταρα (Totipotent)**

Αποτελούν την κατηγορία με το μεγαλύτερο δυναμικό, καθώς τα παντοδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους. Τα μοναδικά παντοδύναμα κύτταρα είναι το ζυγωτό και οι απόγονοι αυτού έως και τη 4^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση. Τα παντοδύναμα κύτταρα σχηματίζουν την τροφοβλάστη, τον πλακούντα, καθώς και την βλαστοκύστη που περιέχει την εσωτερική κυτταρική μάζα. Συνεπώς, σχηματίζουν έναν ολοκληρωμένο οργανισμό (Weissman 2004).

- **Ολοδύναμα βλαστοκύτταρα (Pluripotent)**

Ως ολοδύναμα χαρακτηρίζονται τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας και από τα οποία αναπτύσσεται το έμβryo. Τα ολοδύναμα κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα (εξώδερμα, ενδόδερμα, μεσόδερμα). Τα ολοδύναμα κύτταρα έχουν ικανότητα αυτό-ανανέωσης και δημιουργίας οποιουδήποτε κυτταρικού τύπου μόνο του ενήλικου οργανισμού (Hogie et al., 2011). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Τα ανθρώπινα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα προσφέρουν πολύτιμο υλικό μελέτης της ανθρώπινης εμβρυογένεσης (Shamblott et al., 2011).

- **Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Multipotent)**

Η πλειοψηφία των ιστών διαθέτει πολυδύναμα βλαστοκύτταρα τα οποία μπορούν να σχηματίσουν έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών σειρών. Για παράδειγμα, τα πολυδύναμα κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να

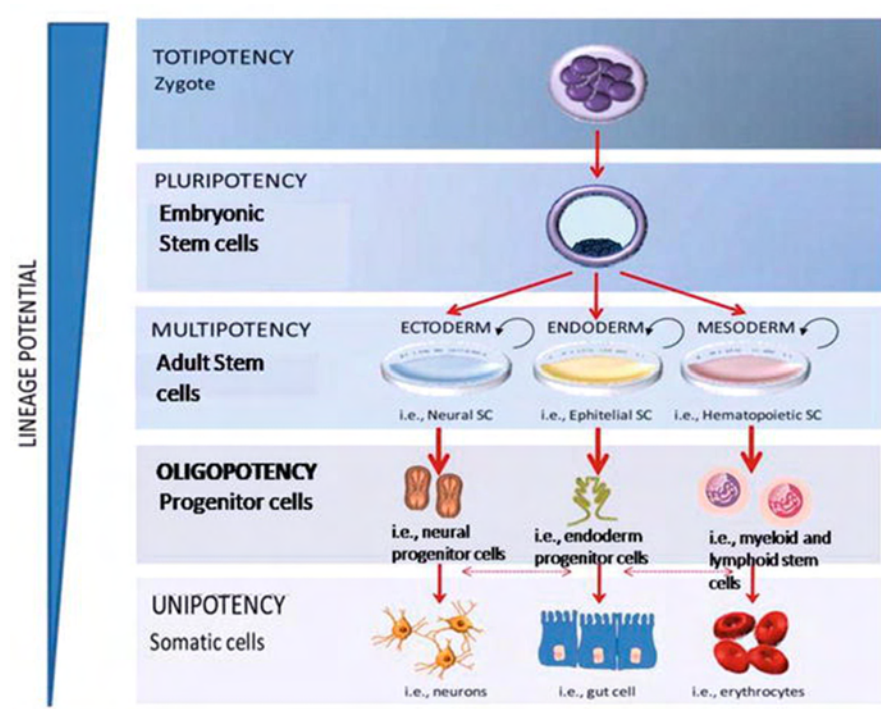
παράξουν όλους τους τύπους των κυττάρων του αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια), αλλά δεν μπορούν να παράξουν όλους τους τύπους των κυττάρων που απαρτίζουν τον ενήλικο οργανισμό. Πλούσια πηγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων αποτελεί ο λιπώδης ιστός (Zuk et al., 2002).

- **Ολιγοδύναμα βλαστοκύτταρα (Oligopotent)**

Τα βλαστοκύτταρα αυτής της κατηγορίας έχουν ακόμη πιο περιορισμένο δυναμικό, καθώς μπορούν να σχηματίσουν μόνο λίγα κύτταρα, όπως για παράδειγμα αρχέγονα κύτταρα αίματος ή αρχέγονα λεμφικά κύτταρα. Παράδειγμα ιστού που αποτελείται από ολιγοδύναμα βλαστοκύτταρα είναι το πλακώδες επιθήλιο του κερατοειδούς το οποίο ανανεώνεται διαρκώς (Singh et al., 2010), (Majo et al., 2008).

- **Μονοδύναμα βλαστοκύτταρα (Unipotent)**

Η κατηγορία βλαστοκυττάρων με το μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης, αφού έχουν ικανότητα σχηματισμού ενός μόνο συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Η διαφορά τους με τα μη βλαστικά κύτταρα είναι ότι διαθέτουν τη δυνατότητα αυτό-ανανέωσης. Χάρη στην ύπαρξη των μονοδύναμων βλαστοκυττάρων, οι περισσότεροι επηθηλιακοί ιστοί μπορούν να ανανεώνονται κατά τη διάρκεια της ζωής (Blanpain et al., 2007). Ένα παράδειγμα μονοδύναμων βλαστοκυττάρων αποτελούν τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 1. Η εξέλιξη του δυναμικού διαφοροποίησης κατά την ανάπτυξη.

Είδη βλαστοκυττάρων

- **Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs)**

Τα κύτταρα στα πρώιμα εμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια μπορούν να δημιουργήσουν κάθε είδους διαφοροποιημένα κύτταρα στο σώμα (Biswas & Hutchins 2007). Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα και έχουν δυνατότητα αυτό-ανανέωσης για πάρα πολλές διαρέσεις και χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα καθώς είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (Kang et al., 2010). Η θεραπεία με βλαστοκύτταρα μπορεί να παρέχει μακροχρόνιο όφελος για τους ασθενείς (Rippon & Bishop 2004), ωστόσο, η χρήση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων γεννά κρίσιμα ηθικά διλήμματα, λόγω του γεγονότος ότι αυτά απομονώνονται από τα έμβρυα που προέρχονται από αμβλώσεις και από εξωσωματική γονιμοποίηση. Τέλος, έχουν γίνει αναφορές πως η χρήση τους ενέχει τον κίνδυνο καρκινικού μετασχηματισμού (Wan et al., 2015).

- **Ενήλικα Βλαστοκύτταρα (Adult Stem Cells)**

Ως ενήλικο βλαστοκύτταρο ορίζεται κάθε κύτταρο που ανευρίσκεται σε έναν οργανισμό και το οποίο διαρείται δημιουργώντας ένα κύτταρο πανομοιότυπο με τον εαυτό του, και ένα κύτταρο περισσότερο διαφοροποιημένο σε σχέση με το αρχικό. Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα και χαρακτηρίζονται με βάση τον ιστό από τον οποίο προέρχονται. Για παράδειγμα, υπάρχουν νευρικά βλαστικά κύτταρα, βλαστικά κύτταρα σκελετικού μυός, βλαστικά κύτταρα μυελού των οστών (Toma et al., 2001). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα μεσεγχυματικά, τα ενδοθηλιακά βλαστοκύτταρα, τα βλαστοκύτταρα λιπώδους ιστού κ.ά. Κύριες πηγές τους είναι ο λιπώδης ιστός, ο μυελός των οστών, ο πολφός των δοντιών και ο ομφάλιος λώρος από τον οποίο μπορούν να συλλεχθούν τα μεσεγχυματικά και ομφαλοπλακουντιακά κύτταρα. Χαρακτηριστικό των ενήλικων βλαστοκυττάρων είναι πως μπορούν για χρόνια να παρεμείνουν στην κατάσταση *Quiescence*, κατά την οποία δεν εισέρχονται σε κυτταρικό κύκλο και επομένως δεν πολλαπλασιάζονται. Η διακοπή αυτή του κυτταρικού κύκλου είναι αναστρέψιμη, διότι μόλις κάποιος ιστός ή όργανο υποστεί βλάβη, τα quiescent adult stem cells διεγείρονται και ξεκινούν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα που αναγεννούν τον κατεστραμμένο ιστό/όργανο. Αυτή η κατάσταση «αδράνειας» εξυπηρετεί τη διατήρηση ενός πληθυσμού αδιαφοροποίητων βλαστοκυττάρων τα οποία θα είναι έτοιμα να διαφοροποιηθούν και να αντικαταστήσουν κατεστραμμένα κύτταρα σε οποιαδήποτε στιγμή της ζωής, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό (Rumman et al., 2015).

- **Επαγόμενα Ολοδύναμα Βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells)**

Τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα δημιουργούνται όταν σωματικά κύτταρα

επαναπρογραμματίζονται, έτσι ώστε να εκφράζουν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες (Takahasi & Yamanaka, 2006). Έτσι, χάνουν την εξειδίκευση του ιστού από όπου απομονώθηκαν και αποκτούν πολυδυναμικότητα. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στη μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών, την εξατομικευμένη θεραπεία και στην ανάπτυξη φαρμάκων καθώς πάνω τους μπορούν να δοκιμάζονται τα νέα φάρμακα αποφεύγοντας τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες που ενέχει η δοκιμή σε ανθρώπους (Yu et al., 2007). Ένα ακόμη πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν απαιτούνται ανθρώπινες βλαστοκύστες εμβρύων (Roelen & De Sousa Lopes, 2011) και επομένως δεν τίθενται ιδιαίτερα ηθικά και κοινωνικά ζητήματα.

Εφαρμογές Βλαστοκυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα δεν εξυπηρετούν μόνο την ύπαρξη της ποικιλίας των κυτταρικών τύπων, αλλά παίζουν κρίσιμο ρόλο και στην επισκευή ιστών, των οποίων τα κύτταρα έχουν υποστεί βλάβη, αφού διαφοροποιούνται στον εκάστοτε κυτταρικό τύπο και ουσιαστικά αναπληρώνουν έτσι τα κατεστραμμένα κύτταρα (Hima Bindu & Srilatha 2011). Έχουν αποδειχθεί ένα πολύτιμο εργαλείο ερευνητικών και θεραπευτικών στρατηγικών και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών και βλαβών σε ιστούς και όργανα που έχουν υποστεί τραυματισμό ή έχουν γεράσει πρόωρα. Για παράδειγμα, μπορούν να λειτουργήσουν σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η χορεία Huntington (Sardar et al., 20011) η νόσος Alzheimer (David et al., 2008), η νόσος Parkinson (Zhao et al., 2011), και η πολλαπλή σκλήρυνση (Sardar et al., 20011), αντικαθιστώντας τα εκφυλισμένα κύτταρα μέσω μεταμόσχευσης ή μεταφέροντας το θεραπευτικό γονίδιο στον πάσχοντα οργανισμό (Shrihari, 2011). Μπορούν επιπλέον, να αντικαταστήσουν αποπτωτικά κύτταρα (Karmakar et al., 2010), δυσλειτουργικά και ή γηρασμένα κύτταρα του καρδιακού μυός και ενδοθηλιακά κύτταρα ή ινοβλάστες (Lionetti 2011).

Μεσεγγυματικά Βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stromal Cells)

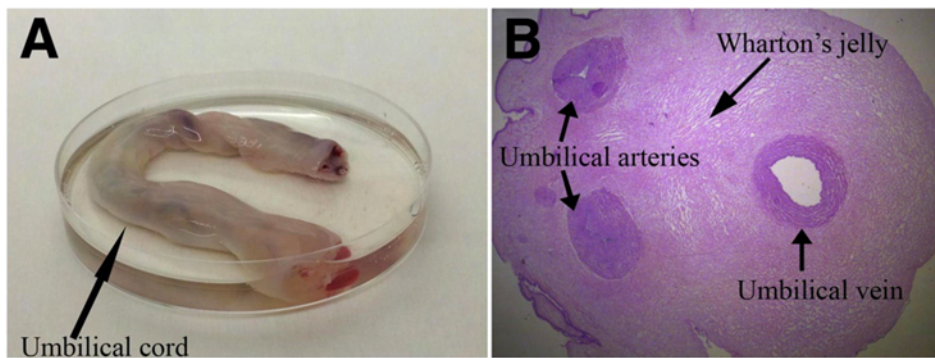
Τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) είναι αρχέγονα πολυδύναμα στρωματικά κύτταρα (Waterman & Betancourt, 2011), με χαμηλό ποσοστό διαφοροποίησης, ικανότητα αυτο-ανανέωσης και παράλληλα διαφοροποίησης σε ορισμένες μεσεγγυματικές κυτταρικές σειρές, μετά από κατάλληλο ερέθισμα (Minguell et al., 2011). Μπορούν να δημιουργήσουν κυτταρικούς τύπους όπως χονδοκύτταρα, λιποκύτταρα και οστεοβλάστες (Mittal, 2011). Εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς και όργανα συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Συγκεκριμένα, στον ενήλικο οργανισμό μπορούν να απομονωθούν από το περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών, από το δέρμα, το λιπώδη ιστό και τον πολφό των δοντιών. Πηγή απομόνωσης MSCs μπορούν να αποτελέσουν και τα έμβρυα που

προέρχονται από άμβλωση, αλλά και περιγεννητικοί ιστοί, δηλαδή το αμνιακό υγρό, η αμνιακή μεμβράνη, ο ομφάλιος λώρος, καθώς και το αίμα αυτού (Liau et al., 2019). Βρίσκουν ευρεία κλινική εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική, καθώς χρησιμοποιούνται στην επούλωση τραυμάτων του δέρματος, στην αποκατάσταση οστών και χόνδρων, στην αναγέννηση νευρώνων και μυοκαρδίου αλλά και στη θεραπεία ανοσολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή (GvHD) (Caplan et al., 2019). Θεωρούνται πιο ασφαλή για κλινική/θεραπευτική χρήση διότι παρουσιάζουν πολύ μικρότερη πιθανότητα καρκινικού μετασχηματισμού συγκρινόμενα με τα εμβρυϊκά και τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα (Herberts et al., 2011), (Lim et al., 2019).

Wharton's Jelly Mesencymal Stem Cells (WJ-MSCs)

Από τις πιο ιδανικές πηγές μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων για θεραπευτική χρήση φαίνεται να αποτελεί η γέλη του Wharton (Wharton's jelly) καθώς είναι ένας ιστός του ομφάλιου λώρου, πλούσιος σε MSCs, ο οποίος μπορεί να συλλεχθεί έπειτα από τη γέννηση με τρόπο απόλυτα μη επεμβατικό και ανώδυνο (Liau et al., 2020). Πρόκειται για ένα βλενώδη συνδετικό ιστό που περιβάλλει τα αγγεία του ομφάλιου λώρου προστατεύοντάς τα (Εικόνα 2).

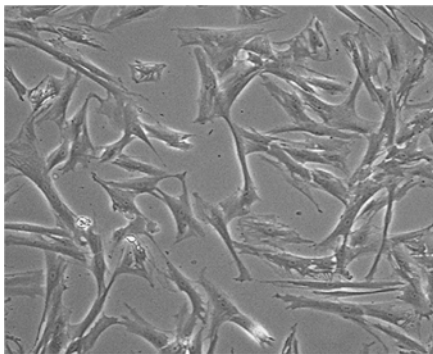
Παρόλο που τα WJ-MSCs δεν έχουν μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης από τα MSCs των ενήλικων οργανισμών, πλεονεκτούν σε σχέση με αυτά. Ένας λόγος είναι πως τόσο η απομόνωση όσο και η *in vitro* καλλιέργειά τους είναι πολύ εύκολη, ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τα MSCs των ενλίκων οργανισμών για τα οποία η απομόνωση και η καλλιέργεια εξαρτώνται από τον ιστό από τον οποίο απομονώνονται. Επίσης, εμφανίζουν μεγαλύτερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα εμβρυϊκών δεικτών (Liau et al., 2019) & (Bongso & Fong, 2013). Ένα ακόμη αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των WJ-MSCs είναι πως γερνούν πιο αργά σε σχέση με τα MSCs που προέρχονται από το μυελό των οστών (BM-MSCs) και το λιπώδη ιστό (ADSCs) (Cheng et al., 2011), (Vidal et al., 2011), (Wang et al., 2016). Όταν έγινε σύγκριση της ταχύτητας πολλαπλασιασμού ανάμεσα σε WJ-MSCs, ADSCs (MSCs λιπώδους ιστού), PL-MSCs (MSCs του πλακούντα) και σε BM-MSCs (MSCs μυελού των οστών), βρέθηκε πως τα WJ-MSCs πολλαπλασιάζονταν γρηγορότερα (Li et al., 2014).



Εικόνα 2. Ομφάλιος λώρος (A) & Wharton's jelly που περιβάλλει τα αγγεία του ομφάλιου λώρου (B) (Sadik et al., 2018).

Τα υγιή καλλιεργούμενα WJ-MSCs έχουν παρόμοιο σχήμα με τους ινοβλάστες (Εικόνα 3) (Ranjbaran et al., 2018) και χαρακτηρίζονται βάσει τριών κριτηρίων σύμφωνα με τις οδηγίες του International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT):

- πρέπει να προσκολλώνται σε πλαστική επιφάνεια και να ομοιάζουν μορφολογικά με ινοβλάστες
- πρέπει να είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και κύτταρα χόνδου
- πρέπει να είναι θετικά $\geq 95\%$ για τα CD105, CD73, CD90 και $\leq 5\%$ για τα CD45, CD34, CD14 ή CD11b, HLA class II, και CD79a ή CD19



Εικόνα 3. Προσκολλημένα σε επιφάνεια WJ-MSCs με μορφολογία ινοβλαστών (Oleg & Semenov, 2011)

Παρά τη δυνατότητα αυτό-ανανέωσης που διαθέτουν, τα WJ-MSCs έχουν πεπερασμένη διάρκεια ζωής *in vitro* και η παρατεταμένη καλλιέργειά τους κάποια στιγμή θα οδηγήσει σε γήρανση, επηρεάζοντας τη βιολογική λειτουργία τους και συνεπώς την κλινική αποτελεσματικότητά τους. Κατά τη γήρανση τα κύτταρα αυτά αυξάνονται σε μέγεθος, πλατύνονται και αποκτούν κοκκιώδη εμφάνιση, ενώ παράλληλα σταματούν να εκφράζουν ορισμένους δείκτες κυτταρικής επιφάνειας (Cheng et al., 2011), (Vidal et al., 2011), (Wang et al., 2016). Επιπροσθέτως, τα γηρασμένα MSCs τείνουν να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα σε μεγαλύτερο ποσοστό απ' ό,τι σε λιποκύτταρα, συγκρινόμενα με νεαρά MSCs (Liau et al., 2019). Εκτός από τους τρεις κυτταρικούς τύπους που έχουν αναφερθεί (λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες), τα WJ-MSCs έχουν ικανότητα διαφοροποίησης και

σε κύτταρα παρόμοια με τα νευρικά, ηπατικά, μυϊκά, καρδιομυϊκά, ενδοθηλιακά, και τα κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη (Rezaeian et al., 2018).

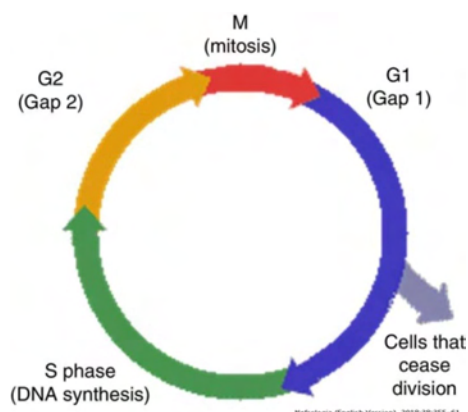
Κλινικές εφαρμογές των WJ-MSCs

Τα WJ-MSCs αποτελούν την πιο ασφαλή επιλογή για θεραπείες που περιλαμβάνουν αλλογενή μεταμόσχευση (από ιστοσυμβατό δότη) καθώς χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης των μορίων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας MHC τάξης I & II (ομάδα γενετικών τόπων που καθορίζουν τα μείζονα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας και για τον άνθρωπο ονομάζονται «HLA»), όπως και των συνδιεγερτικών μορίων CD40, CD80 και CD86. Ταυτόχρονα, εκφράζουν ανοσοκατασταλικά μόρια όπως τα HLA-G, IDO και PGE2 (Liu et al., 012), (Weiss et al., 2008). Έτσι, καταφέρνουν να «ξεφεύγουν» από την ανοσοεπιτήρηση του ξενιστή και να επιβιώνουν στο σώμα του εξασφαλίζοντας το θεραπευτικό τους όφελος. Επιπλέον, η χρήση τους δεν ενέχει σχεδόν καθόλου τον κίνδυνο καρκινικού μετασχηματισμού εφόσον ο *in vitro* πολλαπλασιασμός τους δεν είναι απεριόριστος. Μέχρι σήμερα, δεν έχει γίνει αναφορά για κλινικές περιπτώσεις ανάπτυξης κακοηθειών λόγω της χρήσης των WJ-MSCs. Η διαδικασία της κλινικής εφαρμογής τους είναι απλή και ελάχιστα επεμβατική και περιλαμβάνει την ενδοφλέβια έγχυση αλλά και την απευθείας ένεση των κυττάρων στα τραυματισμένα σημεία με ελάχιστες επιπλοκές (Liau et al., 2019).

A.2 Κυτταρική Γήρανση

Ως κυτταρική γήρανση ορίζεται η μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου συνοδευόμενη από συγκεκριμένες φαινοτυπικές μεταβολές (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007; Kuilman et al., 2010). Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1961, όταν οι Hayflick και Moorhead παρατήρησαν πως διπλοειδείς ανθρώπινοι ινοβλάστες είχαν χάσει την ικανότητά τους να διαιρούνται μετά από έναν πεπερασμένο αριθμό διαρέσεων σε καλλιέργεια. Το DNA των κυττάρων αυτών βρίσκεται στο στάδιο G1 του κυτταρικού κύκλου εφόσον τα κύτταρα δε θα αντιγράψουν το DNA τους προκειμένου να διαιρεθούν στη συνέχεια (Εικόνα 4). Αν και η αναδιπλασιαστική/αντιγραφική γήρανση προκαλείται κυρίως λόγω της βράχυνσης των τελομερών (Bodnar et al., 1998), έχουν βρεθεί ποικίλλοι στρεσογόνοι παράγοντες που οδηγούν στη γήρανση των κυττάρων όπως είναι τα ογκογονίδια και άλλοι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA καθώς την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Αξιοσημείωτο είναι πως τα κύτταρα που εισέρχονται στη φάση της γήρανσης δεν πεθαίνουν αλλά παραμένουν βιώσιμα

και μεταβολικά ενεργά για μεγάλο χρονικό διάστημα, ακόμη και για χρόνια (Matsumura 1979).

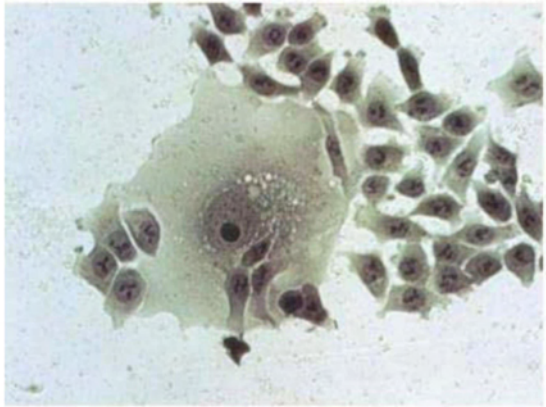


Εικόνα 4. Το σημείο εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο.

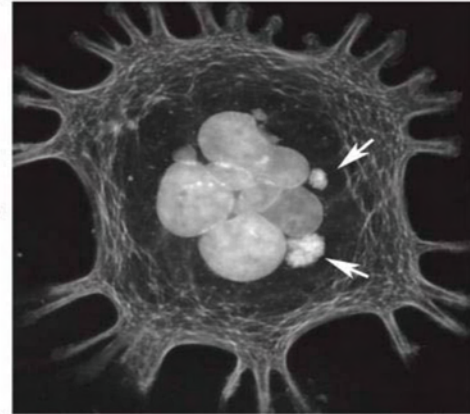
Η κυτταρική γήρανση συνεισφέρει στη γήρανση του οργανισμού (μέσω επαγωγής φλεγμονής, πρόκλησης δυσλειτουργίας στους ιστούς και μέσω αρνητικών επιδράσεων στα παρακείμενα κύτταρα) και είναι αρωγός ηλικιο-σχετιζόμενων νοσημάτων (van Deursen 2014), (Childs et al., 2015), αλλά διαθέτει και μη παθολογικό ρόλο. Συγκεκριμένα, η γήρανση ορισμένων κυττάρων κρίνεται αναγκαία κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη συμβάλλοντας στη διαμόρφωση των ιστών του εμβρύου (Muñoz-Espín et al. 2013; Storer et al. 2013), αλλά και κατά την επούλωση πληγών (Krizhanovskiy et al. 2008). Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ως μηχανισμός προστασίας έναντι της καρκινογένεσης. Έχουν αναφερθεί αρκετές υποστηρικτικές μελέτες για αυτή τη θεωρία με χαρακτηριστικό παράδειγμα την έρευνα του Manuel Serrano (1997) ο οποίος παρατήρησε ότι η υπερέκφραση του ογκογονιδίου Ras σε φυσιολογικά κύτταρα οδήγησε σε ενεργοποίηση των πρωτεϊνών p53 και p21 με αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, τη γήρανση των κυττάρων αυτών και επομένως την αναστολή της ογκογένεσης. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται επιπλέον από το γεγονός πως γηρασμένα κύτταρα έχουν βρεθεί σε καλοήθειες, αλλά όχι σε κακοήθειες όγκους (Kuilman et al., 2010).

Φαινότυπος & δείκτες κυτταρικής γήρανσης

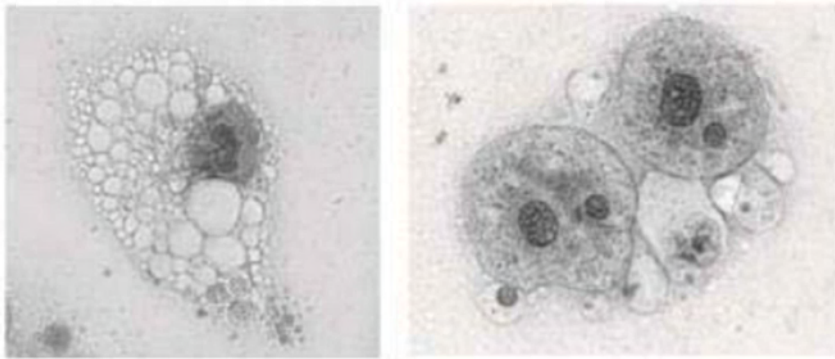
Το κυριότερο χαρακτηριστικό της κυτταρικής γήρανσης είναι η απουσία του πολλαπλασιασμού, συνοδευόμενη από έντονη γονιδιακή αστάθεια όμως δεν είναι πάντα εμφανής η διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και γηρασμένων κυττάρων. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί επιπλέον χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση. Μορφολογικά, τα γηρασμένα κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος (σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και έως 12 φορές του αρχικού μεγέθους) και πλάτος με ταυτόχρονη αύξηση του λόγου κυτταρόπλάσμα/πυρήνας. Επιπλέον, στο κυτταρόπλάσμα τους εμφανίζονται κενοτόπια και αυξημένου μεγέθους λυσοσώματα. Πολλά διαθέτουν πολλαπλούς ή/και γιγάντιους πυρήνες, και πολύ συχνά έχουν κοκκώδη εμφάνιση (Εικόνες 5, 6, 7) (Sikora et al., 2016).



Εικόνα 5. Γηρασμένο γιγάντιο κύτταρο ανάμεσα σε μικρότερα κύτταρα (Sikora et al., 2016)



Εικόνα 6. Κύτταρο με πολλαπλούς πυρήνες. Με τα βέλη σημαίνονται δύο μικροπυρήνες με συμπυκνωμένη χρωματίνη (Sikora et al., 2016)



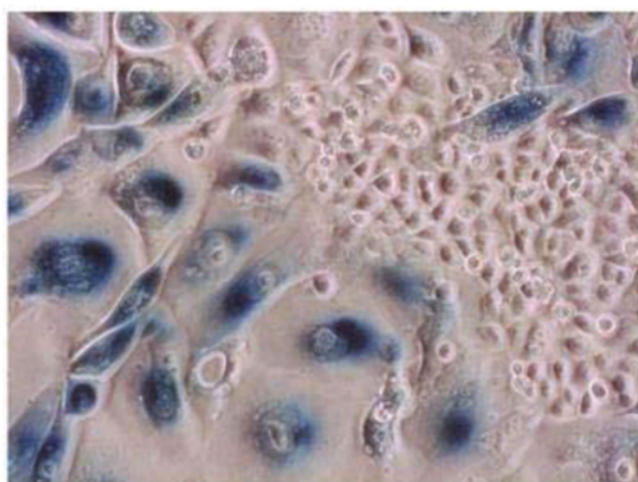
Εικόνα 7. Κύτταρα με κενोटόπια στο κυτταρόπλασμα (Sikora et al., 2016)

Όσον αφορά τους δείκτες που χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση των γηρασμένων κυττάρων, έχουν περιγραφεί διάφοροι τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* και παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω.

Καθώς η συσώρευση βλαβών του DNA είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που ευθύνονται για την κυτταρική γήρανση, οι εστίες βλαβών του DNA μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό δείκτη αυτής. Οι κινάσες ATM και ATR λειτουργούν ως «αισθητήρες» καθώς η πρώτη αναγνωρίζει τις θραύσεις της διπλής έλικας του DNA DBS (Double Strand Breaks) και η δεύτερη τις μονόκλωνες θραύσεις SSB (Single Strand Breaks) καθώς και το μη αντιγραμμένο DNA. Αυτές ενεργοποιούν το μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA DDR (DNA Damage Response), φωσφορυλιώνοντας καθοδικούς διαμεσολαβητές (όπως CHK1, CHK2, p53) που συντονίζουν τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Πολλές από τις πρωτεΐνες του DDR συγκεντρώνονται στις εστίες της βλάβης πάνω στο DNA μόλις μέσα σε λίγα λεπτά από την πρόκληση αυτής και μπορούν να ανιχνευθούν στον πυρήνα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η

εμφανής παρουσία της γ -H2AX στα γηρασμένα κύτταρα, η οποία συνιστά μια φωσφορυλιωμένη μορφή της ιστόνης H2A και η φωσφορυλίωσή της καταλύεται από τις ATM και ATR ως απόκριση στα DSBs (Sikora et al., 2016). Η γ -H2AX εντοπίζεται στις περιοχές βλάβης μαζί με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη 53BP1 η οποία εμπλέκεται ενεργά στο DDR, όταν η κινάση ATM τη φωσφορυλιώνει και αυξάνει τη συγκέντρωσή της. Στη φωσφορυλιωμένη μορφή της η 53BP1 προσδένεται άμεσα στα DSB του DNA και μαζί με άλλα σηματοδοτικά συστατικά του DDR διευκολύνει την ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Fernandez-Capetillo et al., 2002). Μελέτες με πειράματα ανοσοφθορισμού σε γηρασμένους ανθρώπινους πληθυσμούς ινοβλαστών έδειξαν πως σχεδόν σε όλα τα γηρασμένα κύτταρα (ποσοστό ~80%) υπήρχαν ανιχνεύσιμες τοποθεσίες όπου εντοπίζεται η 53BP1 μέσα στους πυρήνες (Fagagna d'Adda et al, 2003). Επομένως, οι πυρηνικές εστίες συσσωρευμένης 53BP1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο μελέτης της γήρανσης των κυττάρων που οφείλεται σε DSBs του DNA συμπληρωματικά με άλλους βιοδείκτες κυτταρικής γήρανσης.

Η αυξημένη ενεργότητα της της β -γαλακτοσιδάσης (SA- β -gal) μετά από χρώση των κυττάρων συνιστά ένα ακόμη χρήσιμο εργαλείο αξιολόγησης της γήρανσης *in vitro*. Τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας της β -γαλακτοσιδάσης σε σχέση με τα νεαρά, λόγω της αύξησης των λυσοσωμάτων τους (Kurz et al, 2000), η οποία ανιχνεύεται βέλτιστα σε τιμή pH= 6 με το χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β D-galactopyranoside) (Dimri et al., 1995). Έτσι, στα γηρασμένα κύτταρα η αυξημένη β -γαλακτοζιδάση διασπά το υπόστρωμα και τα κύτταρα βάφονται μπλε, είναι δηλαδή θετικά στη χρώση, σε αντίθεση με τα νεαρά κύτταρα που έχουν αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης και δε βάφονται όπως φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Κυτταρικός πληθυσμός γηρασμένων κυττάρων (SA- β -gal θετικών) (Sikora et al., 2020).

Έναν ακόμη δείκτη γήρανσης αποτελεί ο σχετιζόμενος με τη γήρανση εκκριτικός φαινότυπος SASP (Senescence-Associated Secretoty Phenotype). Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν αυξημένα επίπεδα διαφόρων συστατικών που συμμετέχουν στην διακυτταρική επικοινωνία συμπεριλαμβανομένων αυξητικών παραγόντων,

προφλεγμονωδών κυτοκινών (πχ. IL-1, IL-6), χημειοκινών (IL-8), εξωκυτταρικών πρωτεασών, και διαφόρων αδιάλυτων συστατικών (Davalos et al., 2010). Οι IL-6 και IL-8 εκκινούν φλεγμονώδεις αποκρίσεις παρόμοιες με αυτές που συμβαίνουν κατά τη φυσιολογική επούλωση των κατεστραμμένων ιστών αλλά και με ηλικιο-σχετιζόμενες παθολογικές καταστάσεις (συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου). Η έκκριση κυτοκινών δεν επάγεται από παροδική ενεργοποίηση του DDR, αλλά μόνο όταν η βλάβη στο DNA καθίσταται μόνιμη, γεγονός που σχετίζεται με τη γήρανση (Sikora et al., 2016).

Τέλος, τα κύτταρα που υφίστανται γήρανση χαρακτηρίζονται από την εκτεταμένη αναδιαμόρφωση της χρωματίνης τους (Adams 2007), γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό των σχετιζόμενων με τη γήρανση ετεροχρωματινικών υποπυρηνικών δομών SAHFs (Senescence-Associated Heterochromatin Foci) (Narita et al. 2005). Πρόκειται για μεταγραφικά ανενεργές περιοχές, κάθε μία από τις οποίες ενδέχεται να αντιπροσωπεύει ένα ετεροχρωματινικό χρωμόσωμα (Zhang et al. 2007). Τα SAHFs είναι πλούσια σε πρωτεΐνες που είναι τροποποιημένες με τέτοιο τρόπο που τις οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπιση, όπως είναι για παράδειγμα η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (H3K9Me3). Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την απώλεια της συνδετικής ιστόνης H1 (Salama et al., 2014). Οι δομές SAHFs φαίνεται πως εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης καθώς έχουν εντοπιστεί με χρώση DAPI πάνω σε υποκινητές γονιδίων που προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οδηγώντας τα σε μεταγραφική καταστολή (Sikora et al., 2016).

Σηματοδοτικά μονοπάτια της κυτταρικής γήρανσης

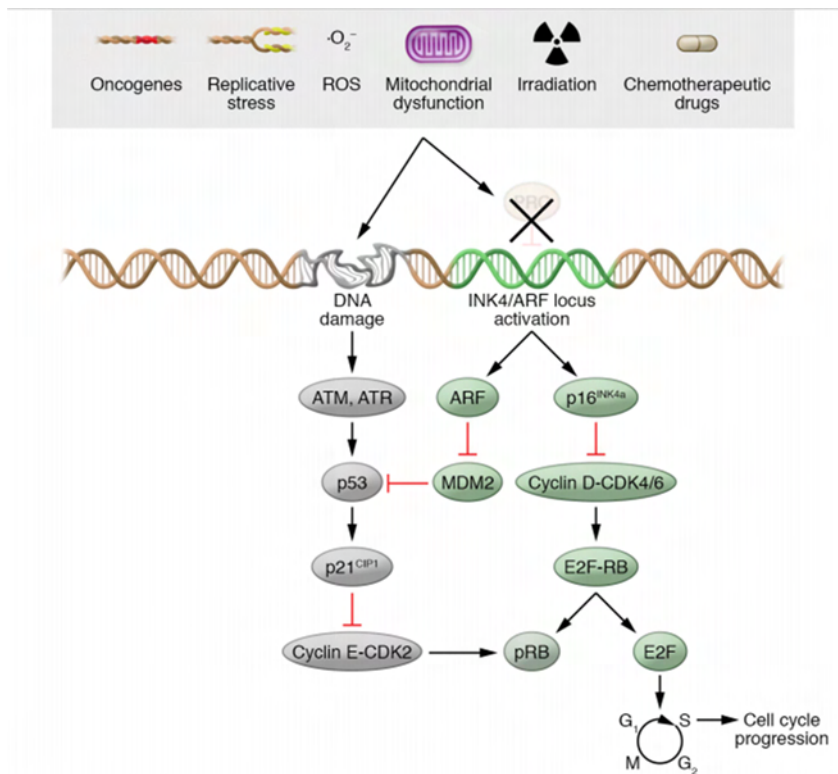
Τα γηρασμένα κύτταρα καθορίζονται από την απουσία κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως και τα quiescent. Αυτές οι διαφορετικές κυτταρικές καταστάσεις διακρίνονται μεταξύ τους από το γεγονός πως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου είναι μόνιμη και μη αναστρέψιμη για τα γηρασμένα, τα οποία δεν εισέρχονται σε κυτταρικό κύκλο καθώς δεν ανταποκρίνονται στην παρουσία μιτογόνων και αυξητικών ερεθισμάτων. Η μη είσοδος στον κυτταρικό κύκλο ελέγχεται από την ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών μονοπατιών p53/p21^{CIP1} και p16^{INK4a}/Rb (Lowe et al., 2004).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η γήρανση που χαρακτηρίζεται από βλάβες στο DNA ενεργοποιεί τις κινάσες ATM, ATR. Η ATM με τη σειρά της, μαζί με την κινάση σημείου ελέγχου Chk2 φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία ως τότε σημαίνεται με ετικέτες ουβικουϊτίνης από τη λιγάση E3 HDM2 (MDM2 στον ποντικό) και οδηγείται στο πρωτεάσωμα όπου καταστρέφεται (Juven-Geshon & Oren, 1999). Η φωσφορυλίωση της p53 οδηγεί σε σταθεροποίησή της και ακολούθως σε αύξηση της συγκέντρωσής της. Ο κύριος ρόλος της ενεργοποιημένης p53 στη διαδικασία της γήρανσης είναι ότι επάγει την έκφραση του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKi) p21^{CIP1}, ο οποίος ακολούθως αναστέλλει την

ενεργότητα του συμπλόκου της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 2 CDK2 με την κυκλίνη E (το οποίο φυσιολογικά προωθεί την πορεία του κύκλου στη φάση S μέσω ενεργοποίησης των ελικάσων MCM στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής), με αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb). Η Rb στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της δρα ως καταστολέας και προσδένεται στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F που ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, το σύμπλοκο Rb/E2F καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον E2F με αποτέλεσμα την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 (d'Adda di Fagagna 2008). Αντιστρόφως, η απενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω της p53 παρεμποδίζει την έναρξη της κυτταρικής γήρανσης (Beausejour et al. 2003), (Shay et al., 1991), (Campisi 2005) και συνδέεται με την καρκινογένεση.

Παρότι η p21^{CIP1} είναι σημαντική κατά την έναρξη της κυτταρικής γήρανσης, έχει βρεθεί πως δεν απαιτείται η συνεχής έκφρασή της στα γηρασμένα κύτταρα (Sharpless & Sherr, 2015). Επίσης, σε επίμονες καταστάσεις στρες ή στην παρουσία άλλων ερεθισμάτων ενεργοποιείται η πρωτεΐνη p16^{INK4a} που συνιστά καταστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσων CDK4 και CDK6, και διατηρεί παρατεταμένα την παύση του κυτταρικού κύκλου (Sharpless & DePinho 2006). Εξάγεται έτσι το συμπέρασμα πως τα κύτταρα επιδέχονται ποικίλες ρυθμίσεις κατά τις διαφορετικές φάσεις της γήρανσής τους (Herranz & Jesus 2018).

Ο γενετικός τόπος INK4/ARF περιέχει το γονίδιο CDKN2A που κωδικοποιεί τα προϊόντα ARF (p14^{ARF} για τον άνθρωπο/p19^{ARF} για τον ποντικό) και p16^{INK4a} καθώς και το γονίδιο CDKN2B που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p15^{INK4b} (Gil & Peters, 2006), (Sharpless, 2005). Στα νεαρά κύτταρα είναι μεταγραφικά ανενεργός λόγω μεθυλίωσης της ιστόνης H3K27 από τα σύμπλοκα PRC1 και PRC2 (Polycomb Repressive Complexes), (Jacobs et al., 1999), (Bracken et al., 2003), (Bracken et al., 2007) (Gil et al., 2004), ενώ κατά τη γήρανση, η απομεθυλάση JMJD3 αφαιρεί τις μεθυλομάδες από τις ιστόνες οδηγώντας στην έκφραση των γονιδίων του (Agger et al., 2009), (Baradas et al., 2009). Τόσο η p14^{ARF}, όσο και η p16^{INK4a} παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της γήρανσης. Η p16^{INK4a} όπως ήδη αναφέρθηκε, απενεργοποιεί επιλεκτικά τις κινάσες CDK4 και CDK6, ενώ η p14^{ARF} προλαμβάνει την αποικοδόμηση της p53 από το πρωτεάσωμα. Επομένως, οι κινάσες Cdk4 και Cdk6 αδυνατούν να δημιουργήσουν σύμπλοκο με την κυκλίνη D το οποίο κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνει την Rb. Εφόσον η Rb δεν είναι φωσφορυλιωμένη, δεσμεύει τον E2F προκαλώντας διακοπή του κύκλου.



Εικόνα 9. Οι αλληλεπιδράσεις κατά τη σηματοδότηση της κυτταρικής γήρανσης (McHugh & Gil 2018).

Η άμεση εμπλοκή του $p16^{INK4a}$ στη ρύθμιση των μονοπατιών της γήρανσης μπορεί εύκολα να τον καταστήσει ως έναν ειδικό δείκτη της γήρανσης των κυττάρων (Krishnamurthy et al., 2004). Η εν λόγω πρωτεΐνη, παρότι είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στα νεαρά και υγιή κύτταρα, αυξάνεται δραματικά κατά τη γήρανση και κατά την καρκινογένεση. Μάλιστα, η απομάκρυνση των θετικών στην $p16^{INK4a}$ κυττάρων σε μοντέλα ποντικών έδειξε να καθυστερεί τη γήρανσή τους. Επιπλέον, σε ιστούς όπως ο σκελετικός μυϊκός, ο λιπώδης και του οφθαλμού, στους οποίους η $p16^{INK4a}$ συμβάλλει στην έναρξη των ηλικιο-σχετιζόμενων παθολογιών, η συνεχόμενη απομάκρυνση των κυττάρων που την εκφράζουν έδειξε να καθυστερεί τα παθολογικά αυτά χαρακτηριστικά. Διαπιστώθηκε επίσης, πως ακόμη και όταν οι ηλικιο-σχετιζόμενες διαταραχές είχαν ήδη εμφανισθεί, η απομάκρυνση των θετικών στην $p16^{INK4a}$ κυττάρων ανέστειλε την πρόοδό τους (Baker et al., 2011). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργικότητας του $p16^{INK4a}$ είναι αρκετά συχνές στους ανθρώπινους κακοήθεις όγκους (Beroukhim et al., 2010) υποδηλώνοντας πως η απώλεια του $p16^{INK4a}$ επιτρέπει στα κύτταρα να «παρακάμψουν» τη γήρανση και να γίνουν καρκινικά (Herranz & Jesus 2018).

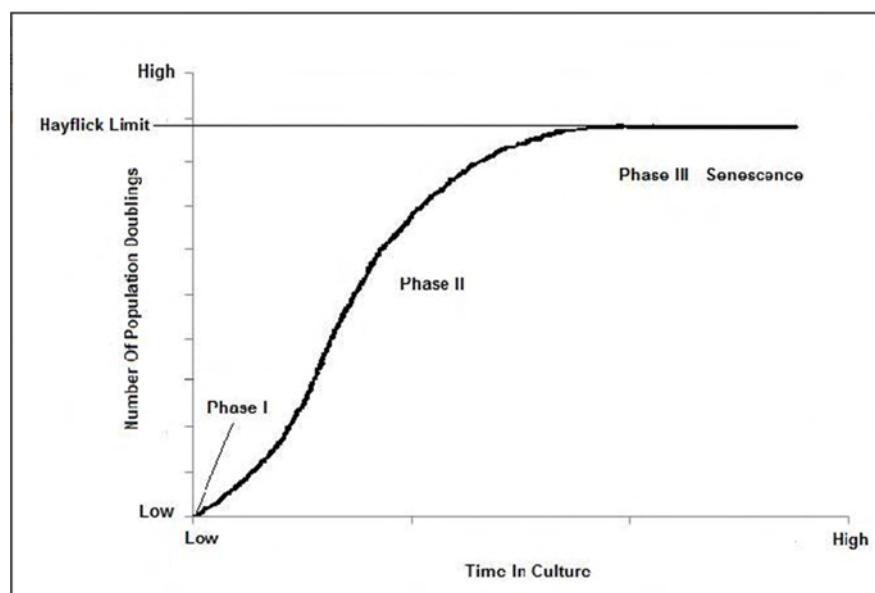
Είδη κυτταρικής γήρανσης

Η γήρανση των κυττάρων δεν προκύπτει από ένα μοναδικό ή καθολικό γεγονός αλλά διακρίνεται σε επιμέρους κατηγορίες βάσει των παραγόντων και των διαδικασιών που την καθοδηγούν. Έτσι, διαχωρίζεται στην «αναδιπλασιαστική» ή

«αντιγραφική» (Replicative Senescence) και στην «πρώιμη» ή «επαγόμενη» από το στρες γήρανση (Stress-Induced Premature Senescence).

Αναδιπλασιαστική κυτταρική γήρανση

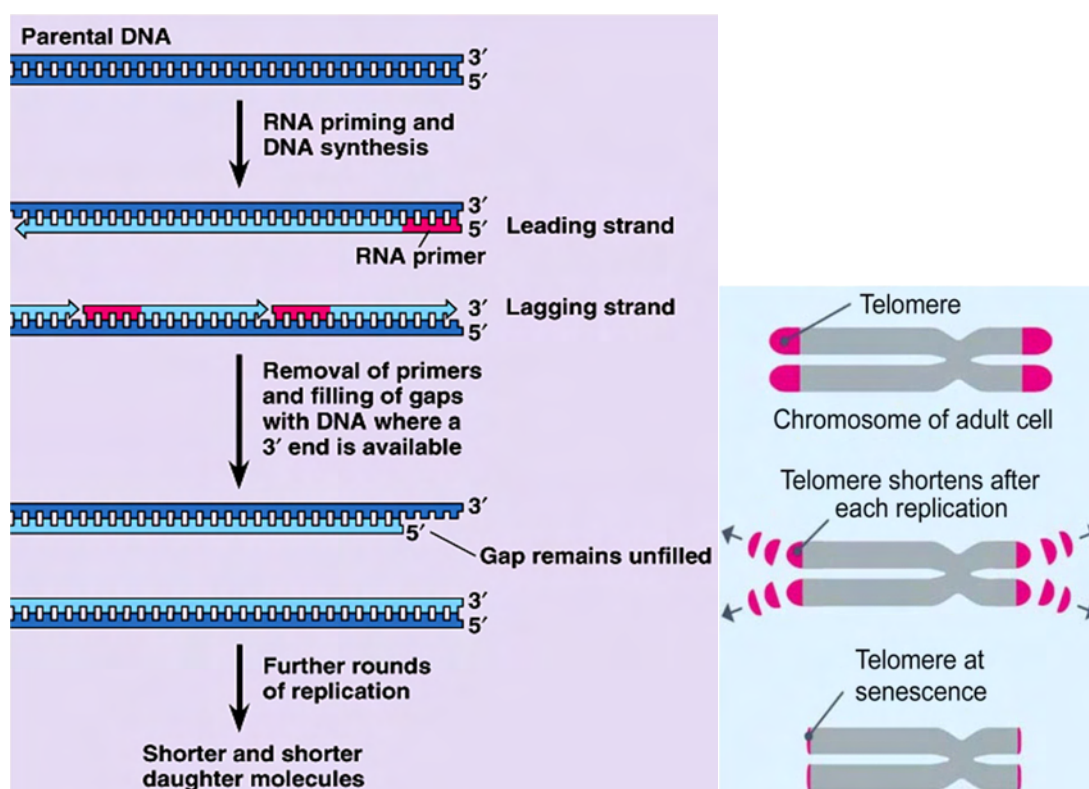
Όταν οι ερευνητές Hayflick και Moorhead απομόνωσαν διπλοειδή κύτταρα από ανθρώπινο ιστό και τα καλλιέργησαν, παρατήρησαν πως ήταν ικανά για ένα πεπερασμένο αριθμό διαιρέσεων. Έτσι αποφάσισαν να προσδιορίσουν το δυναμικό του πολλαπλασιασμού τους μέσω τριών φάσεων: κατά τη φάση 1 τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού αφού εισέλθουν στην καλλιέργεια, στη φάση 2, μετά από πολλούς πολλαπλασιασμούς (population doublings), μειώνουν το ρυθμό αύξησής τους και στη φάση 3 σταματούν να πολλαπλασιάζονται και δεν εισέρχονται ποτέ ξανά σε κυτταρικό κύκλο (Hayflick & Moorhead 1961). Έτσι, ο όρος κυτταρική γήρανση δηλώνει τη σταθερή απώλεια της ικανότητας των κυττάρων να διαιρούνται παρόλο που παραμένουν ζωντανά και μεταβολικά ενεργά (Hayflick, 1965).



Εικόνα 10. “Hayflick limit”: Οι τρεις φάσεις πολλαπλασιασμού που καταλήγουν στη γήρανση (Hayflick 1965).

Σήμερα γνωρίζουμε πως υπεύθυνη για το όριο των κυτταρικών διαιρέσεων που έθεσε ο Hayflick, γνωστό ως “Hayflick limit” (Εικόνα 10) είναι η σταδιακή βράχυνση του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων. Αυτός ο φραγμός στην κυτταρική διαίρεση ονομάστηκε «αναδιπλασιαστική κυτταρική γήρανση». Τα τελομερή συνιστούν σύμπλοκα που αποτελούνται από τελομερικό DNA και από παράγοντες προσκόλλησης TRFs (Telomere-Repeats binding Factors) που δεσμεύονται σε αυτό (de Lang 2004). Το τελομερικό DNA αποτελείται από πολλές διαδοχικές επαναλήψεις της αλληλουχίας TTAGGG (στον άνθρωπο) και από το DNA του 3’ μονόκλωνου προεξέχοντος άκρου που είναι περίπου 300 βάσεις (Bouka,ρ et al., 2005). Τα σύμπλοκα αυτά σχηματίζουν δομές (σαν καλύμματα) στα άκρα των χρωμοσωμάτων και αποτρέπουν τη μεταξύ τους σύντηξη και τα καθιστούν σταθερά,

δηλαδή προστατεύουν από απώλεια γενετικού υλικού μετά από κάθε διπλασιασμό. Σε κάθε διαίρεση του κυττάρου χάνονται μεταξύ 50 bp και 200bp (κατά μέσο όρο 100bp) τελομερικού DNA. Η αιτία της απώλειας αυτής ονομάστηκε “End Replication Problem” από τους ερευνητές Olovnikov (1971) and Watson (1972) και συμβαίνει επειδή η DNA πολυμεράση, κατά την αντιγραφή, αποτυγχάνει να αντιγράψει ολόκληρο τον καθυστερημένο κλώνο του DNA, διότι στο ακραίο τμήμα αυτού δεν υπάρχει χώρος για τη δημιουργία RNA εκκινητή και επομένως ο τελευταίος RNA εκκινητής δεν αντικαθίστανται όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Το μήκος των τελομερών στα εμβρυϊκά κύτταρα είναι περίπου 10kbp και μετά από περίπου 80 κύκλους αντιγραφής του DNA συρρικνώνεται περίπου στα 4kbp που θεωρείται το ελάχιστο μήκος TRF (Terminal Restriction Fragment) πέρα από το οποίο επάγεται το DDR και επέρχεται η αναδιπλασιαστική γήρανση (Εικόνα 12) (Itahana et al., 2001). Έτσι, τα τελομερή λειτουργούν ως ένα «μοριακό ρολόι» που ανακλά το ιστορικό των διαιρέσεων ενός πρωταρχικού κυττάρου (Harley et al., 1990).



Εικόνα 11. End Replication Problem: Στον καθυστερημένο κλώνο υπάρχει κενό εκεί όπου θα έπρεπε να υπάρχει και άλλο τμήμα με κατεύθυνση 5' προς 3'. (Εικόνα από το βιβλίο Campbell's Biology, 5^η έκδοση)

Εικόνα 12. Σταδιακή βράχυνση τελομερών.

Πρώιμη Γήρανση SIPS (Stress Induced Premature Senescence)

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να προκληθεί ακόμη και χωρίς την απώλεια ή δυσλειτουργία των τελομερών, εξαιτίας άλλων παραγόντων και καταστάσεων. Αυτός

ο τύπος κυτταρικής γήρανσης αναφέρεται ως «πρώιμη» γήρανση αφού προκαλείται πριν τα κύτταρα φτάσουν στο σημείο εκείνο που τα τελομερή τους έχουν συρρικνωθεί. Στους στρεσογόνους παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε SIPS περιλαμβάνεται η υπεριώδης (UV) και η ιονίζουσα (IR) ακτινοβολία, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, χημειοθεραπευτικά μέσα, αλλά και τα ογκογονίδια (Suzuki et al., 2001) (Oh, et al., 2001), (Chainiaux et al., 2002), (Chen & Ames 1994), (Robles et al., 1999), (Wang et al., 1998), (Toussaint et al., 2002). Τα κύτταρα που υφίστανται SIPS εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με αυτά που υφίστανται αναδιπλασιαστική γήρανση αλλά διαφέρουν ως προς τη στιγμή που γίνονται εμφανή αυτά τα όμοια χαρακτηριστικά. Η αναδιπλασιαστική γήρανση είναι «προγραμματισμένη» να συμβεί όταν το μήκος των τελομερών συρρικνωθεί σε ένα συγκεκριμένο αριθμό bp και απαιτεί χρόνο, ενώ η πρώιμη συμβαίνει οποιαδήποτε στιγμή τα κύτταρα εκτεθούν σε συνθήκες στρες ανεξαρτήτως του μήκους των τελομερών τους. Ένα από τα κοινά χαρακτηριστικά των δύο τύπων γήρανσης αποτελεί η μόνιμη ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, με τις ανεπανόρθωτες βλάβες που εντοπίζονται σε μη τελομερικές περιοχές να λειτουργούν ως σήμα ενεργοποίησης του SIPS, σε αντίθεση με τις βλάβες στις περιοχές των τελομερών που εξυπηρετούν τη σηματοδότηση της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.

Οξειδωτικό στρες και SIPS

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου ROS (Reactive Oxygen Species) και των αμυντικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός βιολογικού συστήματος, δηλαδή της ικανότητάς του να αδρανοποιεί τις τοξικές αυτές ουσίες και να επιδιορθώνει τις βλάβες που προκαλούν (Pisoschi & Popp, 2015). Τα ROS προκύπτουν από διαδοχικές αντιδράσεις αναγωγής του μοριακού οξυγόνου και χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα που τα καθιστά πολύ ασταθή. Προκειμένου να αποκτήσουν σταθερή δομή χρειάζονται ένα ζεύγος ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στοιβάδα και έτσι αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια ώστε να «τους κλέψουν» ένα ηλεκτρόνιο για να το ζευγαρώσουν με το δικό τους (Riley, 1994). Τα ROS περιλαμβάνουν μόρια (πχ υπεροξειδίο του υδρογόνου), ιόντα, ελεύθερες ρίζες και συνδυασμό ελεύθερων ριζών και ιόντων. Παράγονται τόσο από ενδογενείς (μιτοχόνδρια, μικροσώματα, υπεροξεισώματα, φαγοκύτταρα, μακροφάγα, πρωτεΐνες αίμας), όσο και από εξωγενείς πηγές (ξеноβιοτικές ουσίες, περιβαλλοντικοί ρύποι, απόβλητα βιομηχανιών, ηλιακή και ιονίζουσα ακτινοβολία, μέταλλα, σωματική άσκηση, αλκοόλ, κάπνισμα). Η κυριότερη αιτία παραγωγής τους στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου κατά την οξειδωτική φωσφορύλιωση των μιτοχονδρίων που ευθύνεται για το 90% των επιπέδων ROS. Φυσιολογικά, περίπου το 85% του οξυγόνου του κυττάρου χρησιμοποιείται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο και καταλήγει στο σχηματισμό μορίων νερού, ενώ το υπόλοιπο 1-5% μετατρέπεται σε ROS ως παραπροϊόν (Poyton et al., 2009). Πέρα από τα ROS, οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί και από τις

δραστικές μορφές του αζώτου RNS (Reactive Nitrogen Species) (Hist & Robson 2011).

Σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις τα ROS και τα RNS έχουν ρόλο ζωτικής σημασίας, αφού συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση, και προωθούν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων (Sart et al., 2015). Όταν όμως τα επίπεδά τους γίνουν υψηλότερα των φυσιολογικών, τα ROS καθίστανται βλαβερά για τα κύτταρα, προκαλώντας οξειδωτικές τροποποιήσεις σε όλες βιολογικές δομές των κυττάρων, συμπεριλαμβανωμένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA (Finkel & Holbrook, 2000). Ειδικότερα, η οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλεί μεταβολές στη στερεοδιαμόρφωσή τους και επομένως μεταβάλλει ή και καταργεί τη λειτουργικότητά τους (Davies et al., 2001). Η χρόνια συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών που προκαλείται από τα ROS συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, η υπέρταση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αθηροσκλήρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο διαβήτης (Phaniendra et al., 2015). Η λιπιδική υπεροξείδωση προκαλούμενη από ROS αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε τέτοιο βαθμό που μπορεί να προκαλέσει ακόμη και κυτταρικό θάνατο. Όσον αφορά το DNA, τα ROS ευθύνονται για δίκλωνες ρήξεις στις αλυσίδες του και για διάφορες μεταλλάξεις, καθώς και για βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Η πιο συνήθης βλάβη των ROS στο DNA είναι ο σχηματισμός της 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνης (8-oxo-dG) η οποία ενώνεται με κυτοσίνη αντί αδενίνης και σχετίζεται με τον καρκίνο, τη γήρανση και με τη νόσο Alzheimer (Zawia et al., 2009). Έχει βρεθεί πως τα υψηλά επίπεδα ROS μπορούν να οδηγήσουν σε γήρανση ακόμη και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Sart et al., 2015).

Προκειμένου το κύτταρο να αντιμετωπίσει τα ROS και τις οξειδωτικές τους δράσεις και να επαναφέρει την ομοιόσταση, επιστρατεύει τους αμυντικούς μηχανισμούς που διαθέτει. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των αντιοξειδωτικών κυτταρικών συστημάτων αποτελούν τα ένζυμα δισμουτάση του υπεροξειδίου SOD, καταλάση, υπεροξειδάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η SOD μετατρέπει τη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ οι υπόλοιπες δρουν διασπώντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό. Επιπλέον μόρια όπως είναι οι βιταμίνες A, E και C και τα καροτενοειδή συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική άμυνα έναντι των ελεύθερων ριζών (Finkel & Holbrook, 2000). Αυξημένες συγκεντρώσεις της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης θεωρούνται δείκτες του οξειδωτικού στρες (Halliwell 2012), (Ginter et al., 2014), (Rahal et al., 2014).

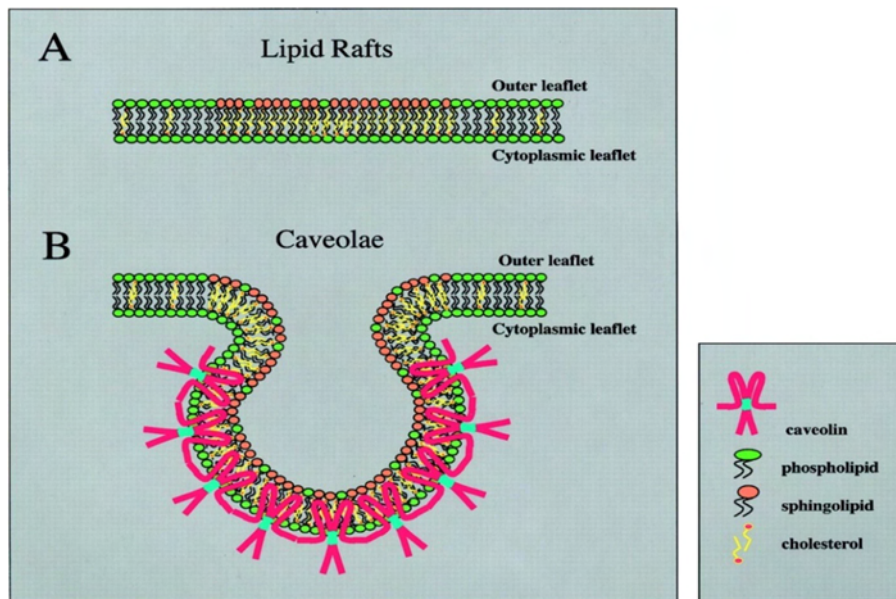
Τα ROS ρυθμίζουν *in vitro* ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές αποκρίσεις μέσω αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών, στέρησης θρεπτικών, υποξίας και εμπλέκονται έτσι στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και σε μεγάλο ποσοστό στην καρκινογένεση (Coso et al., 2012) και μπορούν να οδηγήσουν σε πρόωμη κυτταρική

γήρανση. Όταν ανθρώπινοι ινοβλάστες εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου, διαπιστώθηκε ελάττωση στην ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, στα επίπεδα σύνθεσης του DNA τους και επιπλέον έμοιαζαν φαινοτυπικά με τα γηρασμένα κύτταρα (Chen & Ames, 1994). Επιπλέον, όταν αποσιωπήθηκε το miRNA του αντιοξειδωτικού ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου SOD σε ανθρώπινους ινοβλάστες, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ROS και ακολούθησε η γήρανση των κυττάρων (Blander et al., 2003). Έχει επίσης, προταθεί πως η συσσώρευση των ROS αυξάνει το ρυθμό φθοράς των τελομερών προκαλώντας βλάβες στο DNA και ακολούθως ενεργοποιώντας το DDR. Αναμενόμενο αποτέλεσμα της επαγωγής του DDR είναι η αυξημένη συγκέντρωση της αποκρινόμενης ρυθμιστικής πρωτεΐνης p53 και η αποφωσφορυλίωση της Rb όπως και διαπιστώθηκε από τον Chen και την ομάδα του (2004). Συμπληρωματικά, από τους ίδιους ερευνητές παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών Mdm2 και Cdc6 οι οποίες φυσιολογικά εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA, υποδηλώνοντας την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο.

A.3 Καβεολίνη-1

Caveolae/ Μικροσπήλαια

Τα μικροσπήλαια ή αλλιώς caveolae χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά ως εγκοιλώσεις της πλασματικής μεμβράνης σε σχήμα παρόμοιο με το γράμμα «Ω» και διαμέτρου 7-120 nm, εντοπίζονται από την πλευρά του κυτταροπλάσματος (Palade 1953) (Εικόνα 13) και αποτελούν υποκατηγορία των λιπιδικών σεδίων. Είναι πλούσια σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια και βρίσκονται πιο συχνά μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λιποκύτταρα, είτε μεμονωμένα, είτε ως συμπλέγματα.



Εικόνα 13. Caveolae της κυτταρικής μεμβράνης πλούσια σε μόρια cav-1, χοληστερόλης φωσφολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων (Razani et al., 2002)

Οι κύριες δομικές πρωτεΐνες των μικροσπηλαίων είναι οι καβεολίνες, που συναντώνται σε τρεις ισομορφές (καβεολίνη-1/2/3). Η πρώτη ισομορφή (CAV-1) συναντάται στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, εκτός των κυττάρων του γραμμωτού μυός και ευθύνεται για το σχηματισμό των μικροσπηλαίων (Rothbergh et al, 1992). Η (CAV-2) συμμετέχει μαζί με την CAV-1 στο σχηματισμό των μικροσπηλαίων (Sowa et al, 2003), ενώ η καβεολίνη-3 (CAV-3), δεν συμμετέχει στη βιογένεση των μικροσπηλαίων και εκφράζεται ειδικά στα κύτταρα των γραμμωτών μυών (Way and Parton, 1995), (Tang et al, 1996). Μέσα σε ένα μικροσπήλαιο υπάρχουν περίπου 144 μόρια καβεολίνης (Hayer et al, 2010). Οι καβεολίνες σχηματίζουν ομο-ολιγομερή και ετερο-ολιγομερή υψηλού μοριακού βάρους, για να σχηματίσουν τα μικροσπήλαια και αλληλεπιδρούν άμεσα με σηματοδοτικά μόρια.

Εξωτερικά της μεμβράνης των caveolae εντοπίζονται GPI-αγκυροβολημένες πρωτεΐνες που ενδοκυτταρώνονται από τα μικροσπήλαια, διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί υποδοχείς όπως οι GPCRs, ο υποδοχέας της ινσουλίνης, καθώς και β αδρενεργικοί υποδοχείς, ενώ από το εσωτερικό τμήμα της μεμβράνης εντοπίζονται προσκολλημένες πρωτεΐνες όπως G πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που συνδέονται με χοληστερόλη (όπως οι καβεολίνες και οι κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src) (Malkonian, Ostemeyer & Chen et al, 1999), (Pyenta et al, 2001), (Simons & Toomre, 2000). Τα μικροσπήλαια είναι πλούσια και σε λιπίδια που είναι σημαντικά στη σηματοδότηση, όπως είναι το φωσφατιδικό οξύ, η διγλυκερίδη (σημαντικοί δεύτεροι αγγελιοφόροι) και τα γλυκοσφιγγολιπίδια (Simons & Vaz, 2004), (Liu & Anderson, 1995). Εμπλέκονται σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σηματοδότησης, του μεταβολισμού των λιπιδίων και τη μεταφορά μέσω κυστιδίων διαμέσου της ενδοκυττάρωσης που πραγματοποιούν και ως εκ τούτου

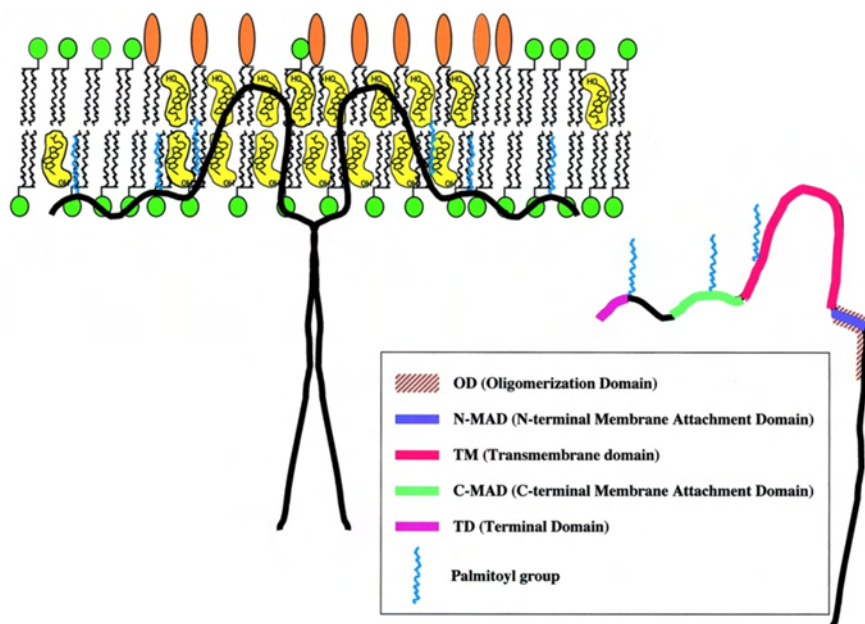
θεωρείται πως έχουν ρόλο σε μια ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος και οι ιογενείς λοιμώξεις.

Δομή καβεολίνης-1

Η καβεολίνη-1 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη με δομή hairpin. Όπως και τα μικροσπύλαια, εντοπίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα λεία μυϊκά κύτταρα, τα λιποκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. (Cohen et al, 2004). Τα δύο άκρα της (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό) εκτίθενται στο κυτταρόπλασμα και διαχωρίζονται από ένα υδρόφοβο τμήμα (αμινοξέα 102-134) (Glennay & Sorpet, 1992) (Εκόνια 14). Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές Cav1a και Cav1b. Η ισομορφή Cav-1a αποτελείται από 178 αμινοξέα και το μοριακό βάρος της είναι 24 kD, ενώ η ισομορφή Cav-1b είναι μικρότερη, με 148 αμινοξέα και μοριακό βάρος 21kD (Scherer PE, Okamoto T, Chun M et al., 1996). Διαθέτει δύο λειτουργικές επικράτειες. Η μία εξ' αυτών αφορά την τυροσίνη στη θέση 14 που αποτελεί χαρακτηριστικό σημείο φωσφορυλίωσης. Η ισομορφή Cav1a (αλλά όχι η ισομορφή Cav1b, καθώς υπολείπεται των 32 πρώτων αμινοξέων) φωσφορυλιώνεται στην τυροσίνη 14 από (Y14) από τις Src κινάση, τη Fyn, τη Yes και τη c-Abl (Li et al., 1996), (Sanguinetti et al, 2003), (Sanguinetti & Mastick, 2003). Η τυροσίνη 14 δεν αποτελεί τη μοναδική θέση φωσφορυλίωσης της καβεολίνης-1, καθώς και η σερίνη στη θέση 80 μπορεί να φωσφορυλιωθεί επηρεάζοντας τη δράση της καβεολίνης αλλά και τη μετακίνηση της χοληστερόλης (Schlegel et al., 2001), (Fielding et al., 2004).

Η δεύτερη λειτουργική περιοχή αποτελεί την επικράτεια ολιγομερισμού (αμινοξέα 61-101) που επιτρέπει την αλληλεπίδραση πολλών μονομερών καβεολίνης-1 προκειμένου να σχηματιστούν ολιγομερή με 14-16 μόρια καβεολίνης, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό δομών με μοριακό βάρος έως και 400 kD (Monier et al, 1995), (Couet et al, 1997). Στην ίδια περίπου περιοχή (αμινοξέα 82-101) βρίσκεται και το τμήμα της που δρα ως ικρίωμα (CSD-caveolin scaffolding domain) και το οποίο προσδένει μία πληθώρα μορίων σηματοδότησης, τα οποία φέρουν μια ειδική αλληλουχία σύνδεσης με την καβεολίνη-1 (CBD-caveolin binding domain: ΦΧΦΧΧΧΦ, ΦΧΧΧΧΦΧΧΦ ή ΦΧΦΧΧΧΧΦΧΧΦ, όπου Χ=οποιοδήποτε αμινοξύ και Φ= αρωματικό αμινοξύ: Phe, Tyr, Trp) (Couet et al, 1997), (Jagannadham et al, 2002). Τα μόρια που αλληλεπιδρούν με την καβεολίνη-1 μέσω της CBD αλληλουχίας τους είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών Src, πρωτεΐνες G, GTPάσες της οικογένειας Ras, η συνθάση του νιτρικού οξειδίου, φωσφολιπάσες, πρωτεϊνική κινάση C, η πρωτεϊνική κινάση A, η αδενυλική κυκλάση, και υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Mineo et al., 1996), (Couet & Okamoto et al., 1997), (Yamamoto et al., 1998), (Venema et al., 1997). Επιπλέον, η περιοχή CSD μαζί με την περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 135-178 ευθύνονται για τον εντοπισμό της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη (Schegel et al., 2000). Η επικράτεια-ικρίωμα έχει την ικανότητα να προσδένει άμεσα μόρια χοληστερόλης συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στην οργάνωση των σχεδίων και τη μεταφορά της

χοληστερόλης (Murata et al., 1995), (Uittenbogaard et al., 1998), (Pol et al., 2001), (Tagawa et al., 2005).



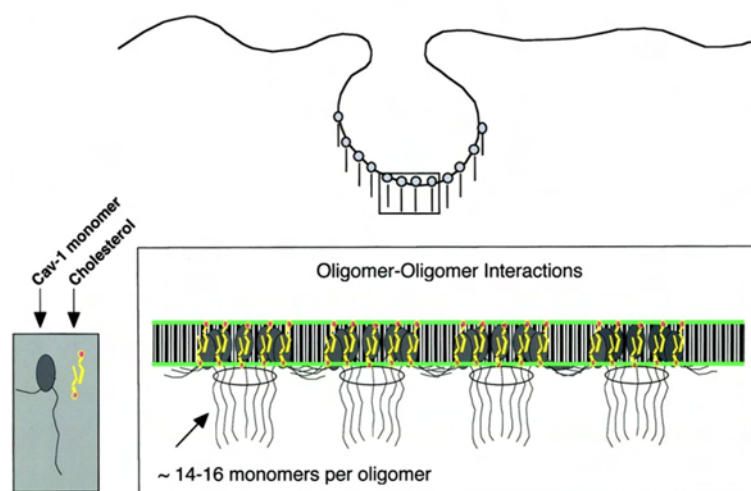
Εικόνα 14. Δομή της καβεολίνης-1 στην κυτταρική μεμβράνη (Razani et al., 2002)

Σύνθεση και μεταφορά της καβεολίνης-1 στην κυτταρική μεμβράνη

Η καβεολίνη συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο διαμέσου μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από το signal recognition particle (SRP) (ριβονουκλεοπροτεϊνικό σύμπλοκο που αναγνωρίζει και προσδένει συγκεκριμένη αμινοτελική σηματοδοτική αλληλουχία νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών που αναδύονται από το ER) (Milstein et al, 1972). Εντός του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) σχηματίζει ολιγομερή μικρού μοριακού βάρους τα οποία μετακινούνται στο σύμπλεγμα Golgi μέσω του συμπλέγματος coat protein complex-II (COPII), όπου υφίστανται επιπλέον ολιγομερισμό (Hayer et al, 2009), (Pol et al, 2005). Στη συνέχεια, υφίσταται παλμυτουιλίωση στο καρβοξυτελικό της άκρο και συγκεκριμένα στις κυστεΐνες των θέσεων 133, 143 και 156, γεγονός που απαιτείται προκειμένου να προσδέσει τα μόρια χοληστερόλης και να τα μεταφέρει στα caveolae (Bastiani et al., 2010). Η παλμυτουιλίωση στις παραπάνω θέσεις φαίνεται να είναι απαραίτητη και για τη φωσφορυλίωσή της στην τυροσίνη 14 από την Src κινάση (Uittenbogaard & Smart, 200), (Lee, Woodman, Engelman et al., 2001), αλλά όχι για τον εντοπισμό της στα μικροσπύλαια (Dietzen et al, 1995), (Parat & Fox, 2001). Ένας αριθμός μονομερών καβεολίνης μεταφέρεται απευθείας από το σύμπλεγμα Golgi στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των κυστιδίων exocytic caveolar carriers, τα οποία ουσιαστικά αποτελούν πρόδρομες μορφές των μικροσπηλαίων (caveolae) (Εικόνα 15) (Parton & Simons, 2007), (Tagawa et al, 2005). Τα γλυκοσφιγγολιπίδια και η χοληστερόλη

φαίνεται πως συμμετέχουν σημαντικά στη μεταφορά της καβεολίνης στην πλασματική μεμβράνη (Pol et al, 2005).

Caveolar Biogenesis



Εικόνα 15. Ολιγομερή cav-1 σχηματίζουν τα πρόδρομα caveolae (Razani et al., 2002)

Πολλαπές λειτουργίες καβεολίνης-1

Η καβεολίνη-1 μπορεί να εντοπιστεί και εκτός των μικροσπληαίων σε άλλα οργανίδια ή τοποθεσίες, συμπεριλαμβανομένων πολλών ενδοκυτταρικών και εξοκυτταρικών κυστιδίων (Tagawa et al., 2005), του ενδοπλασματικού δικτύου ER (Smart et al., 1994), του συμπλέγματος Golgi (Gkantiragas et al., 2001), των μιτοχονδρίων (Li et al., 2001), (Frodolfsson et al., 2012), του πυρήνα (Jeong et al., 2012), των ενδοσωμάτων (Pol et al., 1998), των λυσοσωμάτων (Mundy et al., 2012), των περοξισωμάτων (Woudenberg et al., 2010) και των λιπιδικών σωματίων (Ostemeyer et al., 2001), ρυθμίζοντας τη λιπιδική μεταφορά, τη γονιδιακή έκφραση, τη λειτουργία των μιτοχονδρίων κ.ά.

Μεταγωγή σήματος

Η καβεολίνη προσδένει μέσω της CSD επικράτειας διάφορα σηματοδοτικά μόρια όπως είναι οι υποδοχείς G πρωτεϊνών GPCRs, οι κινάσες Src, ιοντικοί δίαυλοι, η συνθάση του νιτρικού οξειδίου eNOS, οι αδενυλικές κυκλάσες, η πρωτεϊνική κινάση PKA και οι κινάσες MAPs (Patel et al., 2008) και τα διατηρεί ανενεργά έως ότου λάβει κάποιο σήμα απελευθέρωσής τους. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα της ανασταλτικής δράσης της αφορά την άμεση αλληλεπίδρασή της με τη συνθάση νιτρικού οξειδίου eNOS. Συγκεκριμένα, όταν έγινε knock-out για την καβεολίνη-1 σε ποντίκια, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα στην παραγωγή νιτρικού οξειδίου, γεγονός που προκάλεσε καρδιαγγειακές επιπλοκές στα ποντίκια (Maniatis et al., 2008). Ο ρόλος της στη σηματοδότηση δεν είναι αποκλειστικά ανασταλτικός, καθώς

έχει βρεθεί πως ρυθμίζει θετικά τη λειτουργία του υποδοχέα της ινσουλίνης (Yamamoto et al., 1998).

Ενδοκυττάρωση, Εξωκυττάρωση & Διακυτταρική Μεταφορά

Η καβεολίνη-1 επηρεάζει τη λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών σηματοδότησης μέσω ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης (Fridolfson et al., 2014). Λόγου χάριν, ρυθμίζει αρνητικά το σηματοδοτικό μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα TGF-β (Razani et al., 2001). Επιπλέον, ο TGF-β μπορεί να υποστεί ενδοκυττάρωση που ρυθμίζεται από τα caveolae (Di Guglielmo et al., 2003). Η εξαρτώμενη από καβεολίνη ενδοκυττάρωση ρυθμίζει επίσης την κυτταρική προσκόλληση ενσωματώνοντας ιντεγκρίνες και συστατικά στεγανών συνδέσμων και συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης (Del Pozo et al., 2005), (Marchiando et al., 2010), (Orlichenko et al., 2009). Όσον αφορά τη διακυτταρική μεταφορά που διαμεσολαβείται από την καβεολίνη, αυτή αποτελεί έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό μεταφοράς της αλβουμίνης, των θρεπτικών συστατικών που είναι συζευγμένα με την αλβουμίνη, των λιπαρών οξέων και ορμονών κατά μήκος του ενδοθηλίου (Schubert et al., 2001), (Minshall et al., 2002).

Ενδοκυτταρική μεταφορά χοληστερόλης και λιπιδίων

Η χοληστερόλη αποτελεί βασικό συστατικό των caveolae και απαιτείται για την μετακίνηση της καβεολίνης στην πλασματική μεμβράνη. Η καβεολίνη ρυθμίζει τη μετακίνηση και την ομοιόσταση της χοληστερόλης δεσμεύοντάς την (Murata et al., 1995). Μία επικρατής μετάλλαξη της καβεολίνης που οδηγεί σε κολόβωση της πεπτιδικής αλυσίδας της προκαλεί δυσλειτουργία στη μεταφορά της χοληστερόλης, με αποτέλεσμα την εξάντληση της ποσότητας της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη (Pol et al., 2001). Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση της καβεολίνης-1 σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν την εκφράζουν διευκολύνει την πρόσληψη λιπαρών οξέων και αυξάνει τα κυτταρικά επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης αλλά και την εξαγωγή της χοληστερόλης (Fielding et al., 1995), (Meshulam et al., 2006). Για τη διατήρηση των κατάλληλων επιπέδων της ελεύθερης χοληστερόλης εντός των λιπιδικών σωματίων μέσα στα λιποκύτταρα απαιτούνται τόσο η καβεολίνη όσο και η ενδοκυττάρωση από τα caveolae (Le Ray et al., 2006). Ποντίκια knock-out για την καβεολίνη-1 εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στα λιποκύτταρά τους, μειωμένη λιπαρότητα και αντίσταση στην παχυσαρκία που επάγεται από διατροφή (Le Ray et al., 2006).

Στην ενδοκυτταρική μεταφορά της χοληστερόλης πιθανότατα εμπλέκεται μια διαλυτή μορφή της καβεολίνης η οποία είναι ενσωματωμένη σε ένα λιπιδικό σωματίο και συνδέεται με τη χοληστερόλη (Pol et al., 2005), (Liu et al., 1999). Βρέθηκε πως η καβεολίνη μετακινείται από την κυτταρική μεμβράνη για να δεσμευθεί με λιπιδικά

σωμάτια ως απόκριση στην εισαγωγή λιπιδίων στο κύτταρο, και αναλόγως επιστρέφει στην μεμβράνη όταν απομακρύνεται η πηγή λιπιδίων (Pol et al., 2005). Ερευνητές ανακάλυψαν πως η καβεολίνη-1 συσσωρεύεται (με αναστρέψιμο τρόπο) στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση της χοληστερόλης ή όταν τα κύτταρα στερούνται ορού και η τιμή του pH εντός των λυσοσωμάτων αυξάνεται (Mundy et al., 2012). Όταν αποκαθίσταται η ισορροπία, μια ποσότητα καβεολίνης-1 επιστρέφει στην πλασματική μεμβράνη (Fridolfson et al., 2014). Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελούν τα μόρια χοληστερόλης που έχουν υποστεί οξείδωση ή άλλου είδους βλάβη και διεγείρουν την άμεση μετατόπιση της καβεολίνης από την πλασματική μεμβράνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο και από εκεί στη συσκευή Golgi (Smart et al., 1994). Μόλις αποκατασταθεί η βλάβη της χοληστερόλης, η καβεολίνη επιστρέφει στη μεμβράνη. Επομένως, η καβεολίνη λειτουργεί ως αισθητήρας που ανιχνεύει τα κυτταρικά επίπεδα λιπιδίων και διατηρεί την ομοιόσταση της χοληστερόλης (Fridolfson et al., 2014).

Η καβεολίνη μπορεί να ρυθμίζει την ομοιόσταση των λιπιδίων και εντοπίζεται στην επιφάνεια ενδοκυτταρικών λιπιδικών σωματίων (Ostemeyer et al., 2001), (Pol et al., 2001), (Fujimoto et al., 2001). Ειδικότερα έχει βρεθεί πως ρυθμίζει τη σύνθεση της επιφάνειας των λιπιδικών σωματίων μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και αναδιαμόρφωσης φωσφολιπιδίων, γεγονός που διευκολύνει την αύξηση του μεγέθους των λιπιδικών σωματίων (Bluin et al., 2010). Ορισμένες από τις πρωτεΐνες που απαιτούν την έκφραση της καβεολίνης-1 προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με τα λιπιδικά σωματία, έχουν βρεθεί και στα μικροσπύλαια (Bluin et al., 2010).

Μιτοχόνδρια

Ποντίκια με μεταλλάξεις ή έλλειμα για την καβεολίνη εμφανίζουν πολλές διαταραχές που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων διαβήτη, μυϊκή δυστροφία, καρκίνο, λιποδυστροφία, καρδιαγγειακή νόσο και πνευμονική ίνωση (Razani et al., 2001). Κύρια αιτία των παραπάνω διαταραχών είναι η μιτοχονδριακή και μεταβολική δυσλειτουργία (Fridolfson et al., 2014). Δεδομένα υποστηρίζουν πως ο ρόλος της καβεολίνης στη μεταφορά και την ομοιόσταση της χοληστερόλης μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια φυσιολογικά είναι φτωχά σε χοληστερόλη, η οποία όμως μπορεί να εισέλθει σε αυτά μέσω ειδικών επεκτάσεων του ενδοπλασματικού δικτύου που περιέχουν καβεολίνη και λέγονται MAMs (Mitochondrial-associated membranes) (Hayashi et al., 2009), (Sano et al., 2009). Η καβεολίνη ρυθμίζει έμμεσα τα επίπεδα της χοληστερόλης μέσα στα μιτοχόνδρια προωθώντας την εκροή της χοληστερόλης από το ενδοπλασματικό δίκτυο, περιορίζοντας τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στα MAM και κατ' επέκταση την είσοδό της στα μιτοχόνδρια (Bosch et al., 2011). Απουσία καβεολίνης-1, η χοληστερόλη συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και παρεμποδίζει τη λειτουργία τους, μειώνοντας τόσο τη ρευστότητα της μεμβράνης τους, όσο και τα ποσά ενέργειας που παράγουν, αυξάνοντας παράλληλα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου

(ROS) (Bosch et al., 2011). Επιπλέον, όταν έγινε knock-out του γονιδίου της καβεολίνης-1 σε μοντέλα ποντικών, αυτά εμφάνισαν λιποδυστροφία, αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων, μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικής και μειωμένα επίπεδα σηματοδότησης μέσω ινσουλίνης στο λιπώδη ιστό (Razani et al., 2002), (Cohen et al., 2003), (Cohen et al., 2004). Μιτοχόνδρια λιπώδους ιστού στον οποίο έχει γίνει knock-out για την καβεολίνη-1 χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη (Asterholm et al., 2012).

Πυρήνας

Θεωρείται ότι σε κάποιες περιπτώσεις η λειτουργία της καβεολίνης στην πλασματική μεμβράνη επεκτείνεται έως τον πυρήνα, όπου ενδέχεται να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση (Fridolfson et al., 2014). Για παράδειγμα, οι μεμβρανικοί υποδοχείς PDGF (platelet-derived growth factor) και EGF (epidermal growth factor) βρίσκονται στα μικροσπύλαια, αλλά όταν ενεργοποιούνται υφίστανται ενδοκυττάρωση και μετατοπίζονται στον πυρήνα (Moroianu, Riordan, 1994), (Rakowicz-Szulczynska et al., 1986). Ο παράγοντας VEGF (vascular endothelial growth factor) διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη και μετανάστευση προκαλώντας σηματοδότηση διαμέσου δύο υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης και της ενεργοποίησης της eNOS, τα οποία συνυπάρχουν με την καβεολίνη-1 μέσα στα caveolae (Ferrara, Davis-Smyth, 1997), (Feng et al., 1999). Η ενεργοποίηση των EGF και PDGF φαίνεται να επάγει την πυρηνική μετατόπιση της καβεολίνης-1, του VGF και της eNOS (Feng et al., 1999). Η μετατόπιση στον πυρήνα της καβεολίνης και της eNOS μπορεί να αποτελεί έναν μηχανισμό εντοπισμού της παραγωγής του νιτρικού οξειδίου και ελέγχου της γονιδιακής ενεργοποίησης, καθώς έχει δειχθεί ότι η καβεολίνη-1 δεσμεύει την eNOS και περιορίζει το νιτρικό οξύ σε συγκεκριμένα κυτταρικά σημεία (Feron et al., 1996). Η καβεολίνη αποτελεί ογκοκαταστολέα και θεωρείται πως επιδρά στη ρύθμιση των γονιδίων μέσω της πρόσδεσής της με το DNA. Σε ορισμένους τύπους καρκίνου έχει βρεθεί πως το γονίδιο της καβεολίνης-1 έχει διαγραφεί. Συγκεκριμένα, μειωμένα επίπεδα καβεολίνης-1 έχουν βρεθεί σε καρκίνο μαστού και ωοθηκών (Engelman et al., 1998), (Fiucci et al., 2002) (Bagnoli et al., 2000). Ινοβλάστες οι οποίοι είχαν μετασχηματιστεί με ογκογονίδια v-ABL και H-ras είχαν μειωμένη έκφραση καβεολίνης-1 και στερούνταν φυσιολογικών μικροσπυλαίων (Koleske et al., 1995). Όταν όμως έγινε επανεισαγωγή της καβεολίνης-1 στους μετασχηματισμένους ινοβλάστες ή αποκατάσταση της έκφρασής της σε καρκινικά κύτταρα μαστού, αυτή είχε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου (Engelman et al., 1997), (Lee et al., 1998). Η καβεολίνη-1 που εκφράζεται είτε ενδογενώς είτε εκτοπικά, εντοπίζεται στους πυρήνες καρκινικών κυττάρων ωοθηκών και αλληλεπιδρά κυρίως με την πυρηνική μήτρα (το δίκτυο ινών στο εσωτερικό του πυρήνα, ανάλογο του κυτταροσκελετού) δημιουργώντας συμπλέγματα υψηλού μοριακού βάρους (Sanna et al., 2007). Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη ότι η διαλυτή καβεολίνη μετατοπίζεται στον πυρήνα προκειμένου να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση, αν και δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιο σημαντικό

μονοπάτι που να το υποδεικνύει ξεκάθαρα. (Fridolfson et al., 2014). Έχει πάντως παρατηρηθεί πως η καβεολίνη-1 εντός του πυρήνα δεσμεύεται στους υποκινητές δύο γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφρασή τους. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν την κυκλίνη D1, καθώς και τον υποδοχέα του φυλλικού οξέος (Sanna et al., 2007).

A.4 Καβεολίνη-1 και κυτταρική γήρανση

Τα τελευταία 15 χρόνια έχουν βρεθεί πολλές ενδείξεις ότι ο σηματοδοτικός ρόλος της καβεολίνης-1 επεκτείνεται στην ανάπτυξη και τη ρύθμιση του γηρασμένου κυτταρικού φαινοτύπου, όταν αυτός προέρχεται τόσο από αναδιπλασιαστική, όσο και από πρόωμη γήρανση. Γίνεται ολοένα και πιο εμφανές ότι η λειτουργία της καβεολίνης-1 και των caveolae καθορίζουν τις φυσιολογικές και παθολογικές συνέπειες της γήρανσης.

Καβεολίνη-1 και αναδιπλασιαστική γήρανση

Οι ερευνητές Park (2000) και Wheaton (2001) παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 και caveolae σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες που είχαν γεράσει λόγω αναδιπλασιαστικής γήρανσης, καθώς η μη απόκριση των γηρασμένων κυττάρων στη σηματοδότηση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF σχετίζεται με την ανασταλτική δράση που έχει η καβεολίνη-1 στον υποδοχέα του EGF-R. Επιπλέον, όταν ερευνητές προκάλεσαν μείωση στην έκφραση της καβεολίνης-1 σε γηρασμένους ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες μέσω siRNA και antisense ολιγονουκλεοτιδίων, διαπίστωσαν πως είχε αποκατασταθεί η ενεργότητα της κινάσης Erk, η σύνθεση του DNA και η διέγερση του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στη σηματοδότηση του EGF, με συνακόλουθη μείωση στην έκφραση των δεικτών κυτταρικής γήρανσης p21 και p53 (Cho et al., 2003). Ακόμη, σε γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών, η καβεολίνη-1 βρέθηκε αυξημένη και η υπερέκφρασή της φάνηκε να διεγείρει την έκφραση των p53 και p21 (Zhang et al., 2014). Παρόμοιο με τα παραπάνω ευρήματα αποτελεί το γεγονός πως σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (hMSCs) που είχαν γεράσει, η καβεολίνη-1 εντοπίστηκε σε αυξημένες συγκεντρώσεις, ενώ όταν υπερεκφράστηκε σε αντίστοιχα νεαρά hMSCs προκάλεσε καταστολή της διαφοροποίησής τους σε λιποκύτταρα (Park et al., 2005). Αυξημένη έκφρασή της έχει επίσης παρατηρηθεί σε γηρασμένα μακροφάγα (Lim et al., 2015), στρωματικά κύτταρα μυελού των οστών (Sun et al., 2009), αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Sun et al. 2019).

Καθώς αυξάνεται η διάρκεια ζωής, τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται στους ιστούς των θηλαστικών. Μέσω μελετών σε ποντίκια με σύνδρομο προγηρίας

διαπιστώθηκε πως η απομάκρυνση των κυττάρων που εκφράζουν p16 καθυστέρησε την ανάπτυξη των ηλικιο-σχετιζόμενων φαινοτύπων (Baker et al., 2011). Έχει βρεθεί πως η καβεολίνη-1 αυξάνεται ποσοτικά σε διάφορα όργανα γηρασμένου αρουραίου, όπως είναι ο σπλήνας, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος (Baker et al., 2011), (Kang et al., 2006), καθώς και στους σκελετικούς μύες γηρασμένων ποντικών (Oh et al., 2008). Αυξημένες συγκεντρώσεις της έχουν εντοπιστεί και σε άλλα όργανα γηρασμένων ζώων, όπως για παράδειγμα στον ιππόκαμπο και τον εγκεφαλικό φλοιό αρουραίων και φαίνεται να παίζει ρόλο στην επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς APP (Amyloid Precursor Protein) από την πρωτεάση β-σεκρετάση (Kang et al., 2006). Μάλιστα, έρευνες σε ανθρώπους ασθενείς με νόσο Alzheimer, έδειξαν αυξημένα τα πρωτεϊνικά επίπεδά της στον ιππόκαμπο καθώς και τα mRNA επίπεδά της στο μετωπιαίο φλοιό (Gaudreault et al., 2004). Τα αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 σε ινοβλάστες του δέρματος που έχουν υποστεί γήρανση τόσο αναδιπλασιαστική, όσο και επαγόμενη από UV ακτινοβολία έχουν συσχετισθεί με τις αλλαγές που συμβαίνουν στο δέρμα ως συνέπειες της γήρανσης. Τέτοιες αλλαγές είναι το μειωμένο κολλαγόνο, η λέπτυνση του δέρματος, αλλαγές στην ποσότητα του υαλουρονικού οξέος, εκτεταμένη φλεγμονή και η αύξηση του λευκού λιπώδους ιστού στο δέρμα (Kruglikov et al., 2019), (Lee et al., 2015). Αντίθετα, όταν έγινε θεραπεία με μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (MβCD), αυξήθηκαν τα επίπεδα του κολλαγόνου με παράλληλη μείωση της καβεολίνης-1 και ως αποτέλεσμα αυξήθηκε το πάχος του δέρματος (Lee et al., 2015). Όταν οι Roitenberg και συνεργάτες (2018) μείωσαν τα επίπεδα της καβεολίνης-1 στον *C. Elegans* διαπίστωσαν πως η διάρκεια ζωής του είχε επεκταθεί. Στον άνθρωπο, η συγκέντρωση της καβεολίνης-1 αυξάνεται με την ηλικία στο λείο μυ όσο και το επιθήλιο του προστάτη (Herbert et al., 2007), καθώς και στον εγκεφαλικό φλοιό των ηλικιωμένων ατόμων (Kang et al., 2006).

Καβεολίνη-1 & επαγόμενη από το στρες κυτταρική γήρανση (SIPS)

Από το 2000 και έπειτα, γίνονται πολλές αναφορές που υποστηρίζουν επαρκώς τη σχέση της σηματοδοτικής λειτουργίας της καβεολίνης-1 με την πρόκληση γηρασμένου φαινοτύπου σε κύτταρα που δέχονται στρεσογόνα ερεθίσματα. Πειράματα σε ινοβλάστες έχουν δείξει πως τα ενδογενή επίπεδα της καβεολίνης-1 αυξάνονται οδηγώντας σε πρόωμη γήρανση, εξαιτίας υποκυτταροτοξικών επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου ή εξαιτίας έκθεσης των κυττάρων σε UV ακτινοβολία (Volonte & Galbiati 2020). Ειδικότερα, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από ROS, προάγει την πρόωμη γήρανση διεγείροντας τη μεταγραφή του γονιδίου της καβεολίνης-1, καθώς η p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ρυθμίζει θετικά τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 που προσδένεται ειδικά στις δύο πλούσιες σε GC περιοχές του υποκινητή του γονιδίου της καβεολίνης-1 (Dasari et al., 2006). Αντίθετα, όταν εφαρμόστηκαν οι αντιοξειδωτικές ουσίες κερκετίνη και βιταμίνη E, εμπόδισαν την ενίσχυση των επιπέδων της καβεολίνης-1, και την ανάπτυξη της πρόωμης γήρανσης εξαιτίας του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Volonte et al., 2002). Αξιοσημείωτες είναι οι μελέτες που απέδειξαν πως η επαγόμενη από οξειδωτικό

στρες γήρανση καταστάθηκε σε κύτταρα ποντικού που περιείχαν antisense μόρια καβεολίνης-1 και σε εμβρυονικούς ινοβλάστες γενετικά τροποποιημένων ποντικών ώστε να μην εκφράζουν καβεολίνης-1 (Volonte et al., 2002), (Bartholomew et al., 2009), παρέχοντας ισχυρή απόδειξη της λειτουργίας της καβεολίνης-1 στο SIPS. Μάλιστα, οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες διαγονιδιακών ποντικών που υπερέκφραζαν την καβεολίνης-1 είχαν μικρότερη ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με ινοβλάστες που προέρχονταν από έμβρυα ποντικών αναφοράς (χωρίς υπερέκφραση καβεολίνης-1) και παράλληλα είχαν αυξημένη ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης και μορφολογικά ήταν πλατιά και μεγάλα σε μέγεθος (Volonte et al., 2002). Η άποψη αυτή ενισχύεται περισσότερο από την έρευνα του Galbiati και της ομάδας του (2001) που όταν προκάλεσαν υπερέκφραση της καβεολίνης-1 σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών διαπίστωσαν πως αρκούσε για να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο G₀/G₁ μέσω του μονοπατιού p53/p21. Ομοίως με τα παραπάνω, το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε μέσω επίδρασης με tBuOOH (tert-butyl hydroperoxide) σε κύτταρα του μεσοσπονδύλιου δίσκου (nucleus pulposus cells), ενίσχυσε τα επίπεδα mRNA καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1, ενώ η μείωση της καβεολίνης-1 μέσω παρεμβολής shRNA κατάφερε να αναστείλει την πρόκληση της πρώιμης γήρανσης (Ding et al., 2017). Αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 και των caveolae προκλήθηκε επίσης και από εσκεμμένη επαγωγή γήρανσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα με υπεροξειδίου του υδρογόνου (Powter et al., 2015). Ακόμη, η απώλεια της ειδικής για τα ενδοθηλιακά κύτταρα φωσφατάσης τυροσίνης 1B (PTP1B) μέσω γενετικής τροποποίησης ή φαρμακολογικής αναστολής προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε ποντίκια, με επιπλέον αύξηση της ποσότητας της καβεολίνης-1 και κυτταρική γήρανση η οποία μπορούσε να ανασταλεί με μείωση της καβεολίνης-1 (Jager et al., 2019). Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι η καβεολίνης-1 ενδέχεται να συνδέει την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση με καρδιαγγειακές νόσους (Volonte & Galbiati 2020).

Επιπλέον παράγοντες που μπορούν να επάγουν κυτταρική γήρανση αποτελούν η γλυκόζη και η βλεομυκίνη που χρησιμοποιείται σε αντικαρκινικές θεραπείες. Η γλυκόζη σε υψηλές συγκεντρώσεις οδηγεί σε κυτταρική γήρανση, η οποία όμως φάνηκε πως καταργήθηκε σε πειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα των νεφρών που περιείχαν siRNA για την καβεολίνης-1 (Feng et al., 2017). Ένα ακόμη νόσημα που σχετίζεται με την αύξηση της καβεολίνης-1, την κυτταρική γήρανση και το εκτεταμένο οξειδωτικό στρες αποτελεί ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 καθώς οι παραπάνω συνθήκες έχουν εντοπιστεί σε ινοβλάστες διαβητικών ασθενών (Liu et al., 1997). Παρόμοια δεδομένα έχουν βρεθεί και σε διαβητικά ποντίκια στα οποία όταν μειώθηκε η συγκέντρωση της καβεολίνης-1 περιορίστηκε η πρώιμη γήρανση προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες, ενώ ταυτόχρονα η αποκατάσταση των ιστών φάνηκε να επιταχύνεται (Bitar et al., 2013). Όσον αφορά τη βλεομυκίνη, αυτή προκαλεί θραύσεις στις αλυσίδες του DNA, (Blasiak et al., 2017) και όταν μελετήθηκε σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα φάνηκε να επάγει την έκφραση της καβεολίνης-1, ενώ η μείωση της καβεολίνης-1 μέσω shRNA βρέθηκε πως αναστέλλει την επαγόμενη από βλεομυκίνη γήρανση

(Linge et al., 2007). Επίσης, βρέθηκαν περιορισμένες τόσο η γήρανση των επιθηλιακών κυττάρων, όσο και η πνευμονική ίνωση που επάχθηκαν με ενστάλλαξη βλεομυκίνης ενδοτραχειακά σε ποντίκια με απώλεια έκφρασης καβεολίνης-1, (Shivshankar et al., 2012).

Παρότι η κύρια θέση της καβεολίνης-1 είναι τα caveolae της πλασματικής μεμβράνης, η δράση που ασκεί στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης δεν περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η πρώτη αναφορά για την πυρηνική μετατόπιση της καβεολίνης-1 σε γηρασμένα κύτταρα έγινε το 2008 από τους Chretien και συνεργάτες, όταν μετά από πρόκληση SIPS με υπεροξείδιο του υδρογόνου σε διπλοειδείς ανθρώπινους ινοβλάστες, παρατήρησαν πως εντοπίζεται και εντός του πυρήνα και ενδέχεται να ρυθμίζει τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσής της και στο κυτταρόπλασμα. Δεν έχει αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο εισέρχεται στον πυρήνα και μία πρόταση για το πώς συμβαίνει αυτό, είναι πως ίσως συνδέεται με τη χοληστερόλη και εισχωρεί είτε με διάχυση, είτε μέσω μιας πρωτεΐνης-συνοδού (Chretien et al., 2008).

Η καβεολίνη-1 επάγει το SIPS μέσω του μονοπατιού p53-p21^{Waf1/Cip}

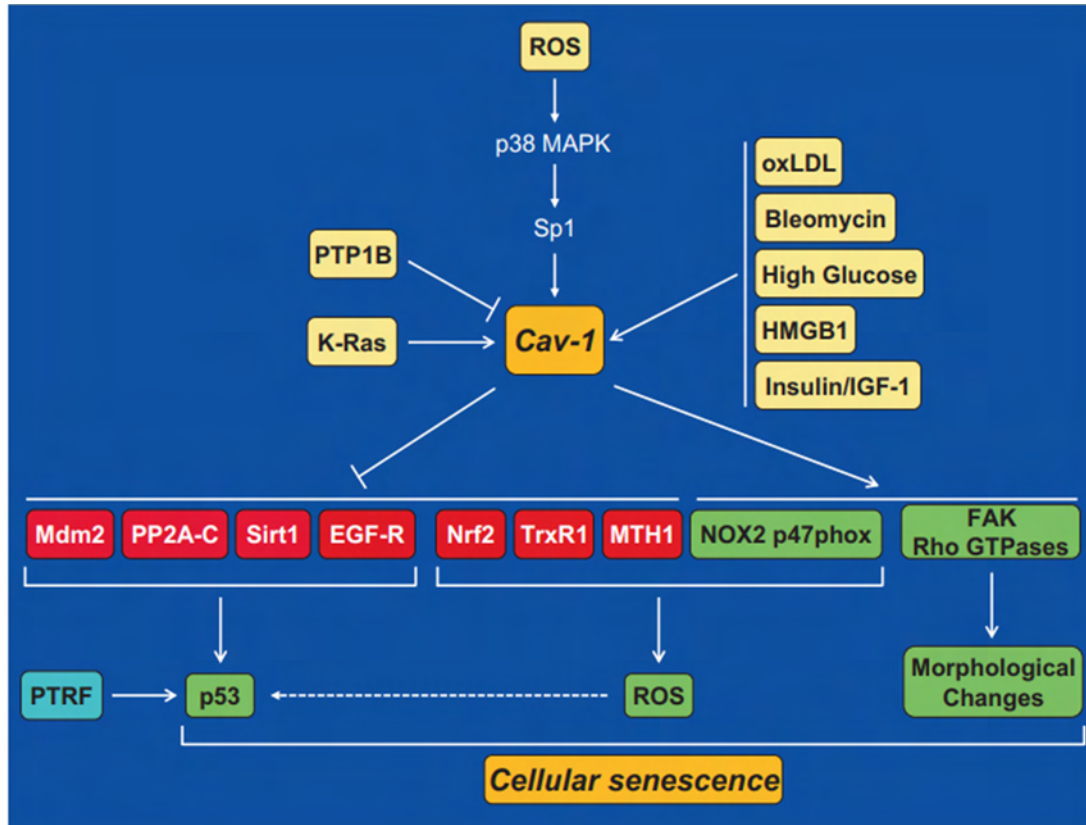
Όπως έχει ήδη συζητηθεί, η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού p53-p21 αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Αρχικά, αποδείχθηκε *in vitro* πως η υπερέκφραση της καβεολίνης-1 αρκεί για να καθοδηγήσει τη γήρανση και να ενεργοποιήσει το μονοπάτι p53-p21 (Volonte et al., 2002), (Galbiati et al., 2001). Στη συνέχεια, ερευνητικές ομάδες διαπίστωσαν πως η επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες ενεργοποίηση του μονοπατιού και το SIPS καταργούνται εξαιτίας της περιορισμένης ή της ελλείπουσας έκφρασης της καβεολίνης-1 (Bartholomew et al., 2009), (Ding et al., 2017), (Linge et al., 2007), (Dai et al., 2006). Έχουν ανακαλυφθεί διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η καβεολίνη-1 ασκεί τη δράση της και ενεργοποιεί την p53 στα πλαίσια του SIPS και περιλαμβάνουν κυρίως την άμεση αλληλεπίδρασή της με μια σειρά μορίων (Nrf2, Mdm2, Sirt1, PP2A-C, MTH1, TrxR 1) τα οποία παγιδεύει εντός των μεμβρανών των caveolae μετά το οξειδωτικό στρες, όπως διαφαίνεται και στο σχήμα (Εκόνα 16).

- Ο Nrf2 (nuclear erythroid 2 p45-related factor-2) συνιστά ένα μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιεί προστατευτικούς μηχανισμούς ως απόκριση στο στρες που υφίστανται τα κύτταρα και συνεντοπίζεται με την καβεολίνη-1 στις μεμβράνες των caveolae σε συνθήκες ηρεμίας (Volonte et al., 2013). Όταν υπάρχει οξειδωτικό στρες, η καβεολίνη-1 περιορίζει τη μετατόπιση του Nrf2 στον πυρήνα και ως εκ τούτου αναστέλλει την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού p53-p21 που οδηγεί σε κυτταρική γήρανση (Volonte et al., 2013). Μάλιστα, έχει βρεθεί πως μια μετάλλαξη του Nrf2 που εμποδίζει την

αλληλεπίδρασή του με την καβεολίνη-1, του επιτρέπει να εισέλθει στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους του, αναστέλλοντας το μονοπάτι p53-p21, όπως και το SIPS (Volonte et al., 2013). Η καβεολίνη-1 αντίθετα, αναστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που επάγεται από τον Nrf2, προωθώντας την αλληλεπίδραση του Nrf2 με τον καταστολέα του Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Li et al., 2012). Η μείωση της καβεολίνης-1 οδηγεί σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Keap1, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενεργότητα του Nrf2 (Petriello et al., 2014). Η σχέση της καβεολίνης-1 με τον Nrf2 επιβεβαιώθηκε επιπλέον όταν η απώλειά της σε καρκινικά κύτταρα μαστού προκάλεσε ενεργοποίηση του Nrf2 και η αποκατάστασή της στα ίδια κύτταρα ανέστειλε τη μεταγραφή γονιδίων που καθοδηγείται από τον Nrf2 (Hart et al., 2016).

- Η Mdm2 είναι μια λιγάση ουβικουιτίνης του ποντικού (Hdm2 στον άνθρωπο) που προωθεί την αποικοδόμηση της p53 και όταν απομονώνεται μέσα στα caveolae χάνει την ενεργότητά της με αποτέλεσμα η p53 να σταθεροποιείται και να καθοδηγεί την πρόωπη γήρανση (Bartholomew et al., 2009). Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση καβεολίνης-1 και καβίνης-1 που έχει βρεθεί σε ινοβλάστες ασθενών με διαβήτη τύπου 2 φαίνεται να απομακρύνει την Mdm2 από την p53 επιτρέποντας την πρόοδο του μονοπατιού p53-p21. Η ανταγωνιστική σχέση της Mdm2 με την καβεολίνη-1 απαντάται και κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση, αφού όταν υπερεκφράστηκε η καβεολίνη-1 σε ST2 σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μυελού των οστών που είχαν γεράσει λόγω των πολλών πολλαπλασιασμών που είχαν επιτελέσει, ενίσχυσε την ενεργότητα των p53 και p21 (Zhang et al., 2014).
- Η Sirt1 (sirtuin 1) είναι μία αποακετυλάση που ρυθμίζει μεταξύ άλλων και τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Μία από τις λειτουργίες της είναι να απενεργοποιεί την p53 με αποακετυλίωση. Το οξειδωτικό στρες ενισχύει την αλληλεπίδρασή της με την καβεολίνη-1, γεγονός που οδηγεί σε απώλεια της ενεργότητάς της, με συνέπεια την ακετυλίωση και επομένως ενεργοποίηση της p53 που οδηγεί στη γήρανση (Volonte et al., 2015). Δεδομένα υποστηρίζουν πως η μετα-μεταφραστική φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 στην τυροσίνη 14 που επάγεται από οξειδωτικό στρες με έναν τρόπο εξαρτώμενο από την p38 MAPK, επάγει και την εναπόθεση της Sirt1 μέσα στα caveolae με αποτέλεσμα την πρόκληση γήρανσης καθοδηγούμενης από την p53 σε ινοβλάστες (Volonte et al., 2015).
- Η φωσφατάση PP2A ρυθμίζει αρνητικά την ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης της κινάσης ATM και την ενεργότητά της in vivo (Goodarzi et al., 2004). Όπως είναι γνωστό, η ATM βοηθά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53. Μετά την επίδραση οξειδωτικού στρες, η καβεολίνη-1 καθοδηγεί την εναπόθεση της PP2A-C (the catalytic subunit of protein phosphatase PP2A) μέσα στα caveolae και επομένως επιτρέπει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της p53 από την ATM που στη συνέχεια θα οδηγήσει στη γήρανση (Volonte et al., 2009).

- Η MTH1 (MutT homolog 1) αποτελεί το βασικό μέσο αποτοξίνωσης των θηλαστικών από το οξειδωμένο πρόδρομο μόριο 8-oxo-dGTP, διότι αποτρέπει την ενσωμάτωση της τοξικής 8-οξογουανίνης στο DNA, απομακρύνοντάς την από τη «δεξαμενή» των dNTPs. Με αυτό τον τρόπο, προλαμβάνει την έναρξη του επιδιορθωτικού μηχανισμού του DNA που συμβάλλει στην κυτταρική γήρανση (Gad et al., 2014), (Huber et al., 2014), (Patel et al., 2015), (Rai et al., 2009), (Rai et al., 2011), (Rai 2012). Επιπλέον, η ογκογόνος K-Ras προωθεί την αλληλεπίδρασή της με την καβεολίνη-1, με αποτέλεσμα η MTH1 να καταστέλλεται και να ενεργοποιείται το μονοπάτι p53-p21 επάγοντας γήρανση (Volonte et al., 2018).
- Το TrxR1 (thioredoxin reductase 1) είναι ένα ζωτικής σημασίας αντιοξειδωτικό ένζυμο που ελέγχει την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Πιο αναλυτικά, μειώνει τη θειορεδοξίνη χρησιμοποιώντας το φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Mustacich et al., 2000). Η καβεολίνη-1 αποτελεί ενδογενή καταστολέα του TrxR 1, το οποίο φυσιολογικά εντοπίζεται στη μεμβράνη των caveolae (Volonte & Galbiati, 2009). Τα μέχρι στιγμής δεδομένα υποστηρίζουν πως μια μεταλλαγμένη μορφή του TrxR 1 η οποία αδυνατεί να δεσμευτεί με την καβεολίνη-1 και επομένως είναι μονίμως ενεργή, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του μονοπατιού p53-p21 και της κυτταρικής γήρανσης, ακόμη και σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Volonte et al., 2009).



Εικόνα 16. Το σύνολο των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων η καβεολίνη-1 συμμετέχει στην κυτταρική γήρανση. (Volonte & Galbiati, 2020)

Η μείωση της καβεολίνης-1 μπορεί να επάγει πρόωμη γήρανση

Παρότι η πλειοψηφία των μελετών συσχετίζει την αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 με την πρόοδο της αναδιπλασιαστικής κυτταρικής γήρανσης και του SIPS, η καβεολίνη-1 μπορεί επίσης να οδηγήσει σε γηρασμένο φαινότυπο εξαιτίας της ελάττωσης στη συγκέντρωσή της. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως η μείωση ή η πλήρης απώλεια στην έκφραση της καβεολίνης-1 σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες, όπως και σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού προκάλεσε γήρανση που συσχετίστηκε με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μιας και η καβεολίνη-1 εμπλέκεται ενεργά στη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Yu et al., 2017). Η έλλειψη καβεολίνης-1 προκαλεί μείωση στην αναλογία NAD/NADH και την οξειδωτική φωσφορύλιωση. Άλλες μελέτες σε ινοβλάστες καρκίνου του μαστού δείχνουν τη συσσώρευση των βιοδεικτών της γήρανσης να συμβαίνει παράλληλα με σημαντική μείωση στην έκφραση της καβεολίνης-1 (Caparelli et al., 2012), (Mercier et al., 2008). Επομένως, η δράση της καβεολίνης-1 στη γήρανση είναι διττή, καθώς μετά από στρεσογόνο επίδραση ελέγχει τη σηματοδότηση που προάγει την εξέλιξη της γήρανσης, ενώ αντίστοιχα όταν τα επίπεδά της μειωθούν κάτω των φυσιολογικών σε resting κύτταρα (τα οποία δε διαιρούνται ή είναι quiescent) επάγει την πρόωμη γήρανσή τους.

Γήρανση επαγόμενη από την καβεολίνη-1 και ηλικιο-σχετιζόμενα νοσήματα

Η χρόνια έκθεση στον καπνό του τσιγάρου μπορεί να προκαλέσει πνευμονικό εμφύσημα, καθώς ο καπνός είναι πλούσιος σε οξειδωτικά μόρια και θεωρείται πως το οξειδωτικό στρες είναι κρίσιμος παράγοντας στην παθογένεση της νόσου (MacNee 2005). Ερευνητές πραγματοποίησαν επιδράσεις με καπνό τσιγάρου σε κυτταροκαλλιέργειες από πνευμονικούς ινοβλάστες και διαπίστωσαν πως προκλήθηκε γήρανση, η οποία όμως μπορούσε να ανασταλεί με αντιοξειδωτική θεραπεία (Volonte et al., 2009), (Nyunoya et al., 2006). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως ινοβλάστες ασθενών με πνευμονικό εμφύσημα είχαν αυξημένη ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης και ταυτόχρονα εμφάνιζαν πολύ περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού (Holz et al., 2004), (Muller et al., 2006). Θεωρείται πως η καβεολίνη-1 αποτελεί μόριο-κλειδί στη σχέση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου με την κυτταρική γήρανση, αφού η επίδραση του καπνού φαίνεται να αυξάνει την ποσότητά της (Volonte et al., 2009). Ενδιαφέρον εύρημα είναι πως η ανάπτυξη του πνευμονικού εμφυσήματος ανετράπη σε ποντίκια με μηδενικά επίπεδα καβεολίνης-1, τα οποία όμως είχαν εκτεθεί σε καπνό τσιγάρου για διάστημα 6 μηνών (Volonte et al., 2009). Υποστηρίζεται η άποψη πως η σηματοδότηση που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου και από την καβεολίνη-1 οδηγεί σε γήρανση ενεργοποιώντας την επιδιόρθωση του DNA από την ATM. Πράγματι, ο καπνός του τσιγάρου που είναι γνωστό ότι προκαλεί βλάβες στο DNA,

ενεργοποιεί την ATM και ενισχύει τα επίπεδα των p53 και p21 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες πνευμόνων, αλλά το ίδιο συμβαίνει σε πολύ μικρότερο επίπεδο σε ινοβλάστες που στερούνται καβεολίνη-1 (Volonte et al., 2009). Άλλες μελέτες στις οποίες απομονώθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα από χρόνιους καπνιστές με πρόωμη αθηροσκλήρωση, έδειξαν πως τα κύτταρα αυτά, παρουσίαζαν πολλά από τα χαρακτηριστικά της γήρανσης, εκτεταμένο οξειδωτικό στρες και αυξημένες συγκεντρώσεις της καβεολίνης-1, σε σύγκριση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μη καπνιστών (Farhat et al., 2008). Επίσης, σε ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών με σοβαρή στεφανιαία νόσο, η κυτταρική γήρανση φάνηκε να επιταχύνεται από το οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα και τα επίπεδα έκφρασης της καβεολίνης-1 ήταν αυξημένα (Voghel et al., 2007).

Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη μελέτη του Εργαστηρίου Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η καβεολίνη-1 εμπλέκεται ενεργά στην παθοφυσιολογία μίας ακόμη ηλικιο-σχετιζόμενης νόσου, της οστεοαρθρίτιδας. Οι ερευνητές μελέτησαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και τον κυτταρικό εντοπισμό της καβεολίνης-1 σε χονδροκύτταρα υγιών δοτών (control) και σε χονδροκύτταρα από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα (OA) τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες, όσο και υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες μέσω υπεροξειδίου του υδρογόνου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στα OA χονδροκύτταρα η καβεολίνη-1 εκφραζόταν σε πολύ αυξημένο βαθμό (σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο) σε σχέση με τα control κύτταρα, ενώ επιπλέον ανιχνεύθηκε και εντός του πυρήνα, σε αντίθεση με τα control χονδροκύτταρα που εντοπίστηκε στις συνηθισμένες θέσεις της δηλαδή στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη. Μετά την πρόκληση του οξειδωτικού στρες, παρατηρήθηκε μετατόπιση της καβεολίνης-1 στους πυρήνες των control κυττάρων με παράλληλη αύξηση των επιπέδων της, η οποία έπειτα από 3-24 ώρες ανάκαμψης επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδά της και στην αρχική θέση της (κυτταρόπλασμα/μεμβράνη). Μάλιστα, η αύξηση και αργότερα η μείωση των επιπέδων της καβεολίνης-1, καθώς και ο εντοπισμός της στον πυρήνα συνέπεσαν με την εμφάνιση βλαβών του DNA (που υποδηλώνονταν από ανιχνεύσιμες εστίες συσσωρευμένης γ -H2AX και 53BP1) και τη μετέπειτα επιδιόρθωσή τους παρέχοντας απόδειξη για την εμπλοκή της στους κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Αντίθετα, τα OA κύτταρα που υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες δεν έδειξαν αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 ούτε και μετατόπισή της στον πυρήνα, ενώ παράλληλα αδυνατούσαν να αποκαταστήσουν τις βλάβες στο DNA τους (Goutas et al., 2020).

A.5 Σκοπός

Έχοντας πρόσφατα καταγράψει το ρόλο της καβεολίνης-1 στην ηλικιο-σχετιζόμενη οστεοαρθρίτιδα και την ανταπόκρισή της στις βλάβες του DNA που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες, φάνηκε να κατέχει ιδιαίτερο ρόλο στην καθοδήγηση της κυτταρικής γήρανσης. Σε πολλές ακόμη μελέτες έχει βρεθεί σημαντικά αυξημένη η συγκέντρωσή της κατά την πρόοδο της γήρανσης των κυττάρων και κάποιες λίγες μελέτες αναφέρουν τη μετακίνησή της εντός και εκτός του πυρήνα. Αντίθετα, άλλες μελέτες συσχετίζουν τη μείωση των επιπέδων της με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης. Έτσι, θελήσαμε να διερευνήσουμε πώς αυτό το μόριο συμπεριφέρεται σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που γερνούν φυσιολογικά αλλά και πρόωρα μέσω επαγωγής οξειδωτικών βλαβών, με την παράλληλη μελέτη και άλλων δεικτών γήρανσης, όπως είναι η θετική χρώση sen-beta-gal και η πρωτεΐνη p16 που ρυθμίζει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον στόχος μας ήταν και η ανάλυση του υποκυτταρικού εντοπισμού της καβεολίνης-1 σε σχέση με τον εντοπισμό της 53BP1 που σηματοδοτεί τις βλάβες του γενετικού υλικού κατά την εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης.

B. Υλικά και μέθοδοι

Τα κυτταρικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας ως προς το ρόλο της πρωτεΐνης «καβεολίνη-1» κατά την πορεία της γήρανσής τους (τόσο στην αναδιπλασιαστική, όσο και στην επαγόμενη) ήταν ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (hMSC) που απομονώθηκαν από το Wharton's Jelly του ομφάλιου λώρου δύο δοτών και καλλιεργήθηκαν σε βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.

B.1 Υλικά & συνθήκες καλλιέργειας

- **Θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο**
Ως θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια των κυτταρικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco's Modified Medium (DMEM). Στο αρχικό αυτό μέσο, προστέθηκαν οι αντιβιοτικοί παράγοντες Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη

(Pen-Strep) σε περιεκτικότητα 1% v/v προκειμένου να μην επιμολυνθούν τα δείγματα από βακτήρια και μύκητες. Προστέθηκε επίσης σε περιεκτικότητα 10% v/v βοδινός ορός εμβρύου (Fetal Bovine Serum-FBS) που περιέχει μιτογόνους παράγοντες, οι οποίοι προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το θρεπτικό υλικό αποθηκεύεται στους 4° C και προκειμένου να είναι κατάλληλο για χρήση εισάγεται στο υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει τους 37 °C.

- **Διάλυμα πλύσης (Hank's Balanced Solution)**

Πρόκειται για ένα ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffered Saline –PBS) που χρησιμοποιείται για πλύση της κυτταροκαλλιέργειας, διατηρώντας σταθερό το pH αυτής, κατά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων (προκειμένου να ανανεωθούν τα θρεπτικά υλικά και τα κύτταρα να συνεχίσουν να αναπτύσσονται). Το συγκεκριμένο διάλυμα διατηρείται και χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου 25° C.

- **Θρυψίνη**

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διαθέτουν υψηλή ικανότητα προσκόλλησης στην επιφάνεια της φλάσκας μέσα στην οποία αναπτύσσονται. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που διασπά τους δεσμούς μεταξύ των κυττάρων που καλλιεργούνται και του πολυστυρένιου, οδηγώντας σε αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο της φλάσκας. Όπως και το θρεπτικό μέσο DMEM, η θρυψίνη αποθηκεύεται στους 4° C και τοποθετείται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 ° C πριν από κάθε χρήση.

Συνθήκες Καλλιέργειας

Τα βλαστοκύτταρα καλλιεργήθηκαν στο πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM σε φλάσκες πολυστυρένιου με διαπερατό φίλτρο, μέσα σε κλίβανο ρυθμισμένο ώστε να παρέχει τις βέλτιστες συνθήκες επώασης. Αυτές οι συνθήκες προβλέπουν ότι η θερμοκρασία είναι σταθερή στους 37 ° C, και τα επίπεδα υγρασίας και 5% CO₂ είναι εξίσου σταθερά. Επιπλέον, εντός του κλιβάνου υπήρχε ανεμιστήρας που εξασφάλιζε την ομοιόμορφη κατανομή των προαναφερθέντων παραμέτρων στο εσωτερικό του. Οι καλλιέργειες παρακολουθούνταν καθημερινά σε όλες τις φάσεις ανάπτυξής τους σε μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι τα δείγματα ήταν ελεύθερα μικροβίων, καθώς και ότι είχε συμβεί population doubling των κυττάρων, το οποίο απαιτεί ανακαλλιέργεια. Ο χειρισμός των κυτταρικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε στείρο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθούν πιθανές επιμολύνσεις.

B2. Απόψυξη & ανακαλλιέργεια βλαστοκυττάρων

Μετά την απομόνωσή τους από τον ομφάλιο λώρο τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν σε συνθήκες ψύξης σε υγρό άζωτο στους -150°C για πιθανή μελλοντική χρήση. Για τη διαδικασία της ψύξης χρησιμοποιούνται ειδικά φιαλίδια, τα cryovials. Σε ένα cryovial εισάγεται κυτταρικό δείγμα συγκέντρωσης 4×10^6 κύτταρα/ml θρεπτικού μέσου DMEM μαζί με 30% FBS και 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Το DMSO εξυπηρετεί τη σταδιακή ψύξη των κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό τους οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική λύση. Απαιτείται απόψυξη των βλαστοκυττάρων στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς ή ερευνητικούς σκοπούς. Το πρωτόκολλο της απόψυξης παρατίθεται παρακάτω:

- Προσθήκη 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM (+ Pen-Strep, FBS) σε falcon χωρητικότητας 15 ml
- Τοποθέτηση του cryovial με το κατεψυγμένο κυτταρικό δείγμα στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C και ανακίνηση για 10-15 sec
- Απόχυση του περιεχομένου του cryovial στο falcon με το θρεπτικό μέσο
- Φυγοκέντρηση στα 1800 rpm σε θερμοκρασία δωματίου 25°C για 5-7 min
- Απόρριψη υπερκευμένου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου
- Φυγοκέντρηση στα 1800 rpm σε θερμοκρασία δωματίου 25°C για 5-7 min
- Απόρριψη υπερκευμένου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου
- Μεταφορά του περιεχομένου του falcon σε φλάσκα και συμπλήρωση με 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου
- Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο για επώαση σε πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας

Ανακαλλιέργεια βλαστοκυττάρων απαιτείται μόλις τα καλλιεργούμενα κύτταρα καλύψουν το 80% της επιφάνειας του πάτου της φλάσκας (80% confluency). Αυτό σημαίνει πως τόσο ο διαθέσιμος χώρος της φλάσκας, όσο και τα συστατικά του θρεπτικού μέσου έχουν εξαντληθεί λόγω της ταχείας ανάπτυξης των βλαστοκυττάρων. Επομένως, τα βλαστοκύτταρα χρειάζεται να τοποθετηθούν σε δύο νέες φλάσκες με καινούργιο θρεπτικό μέσο, ώστε να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους. Η ανακαλλιέργεια των βλαστοκυττάρων πραγματοποιείται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και το αντίστοιχο πρωτόκολλο παρατίθεται παρακάτω:

- Απόρριψη του παλιού θρεπτικού από τη φλάσκα (τα καλλιεργούμενα κύτταρα είναι προσκολλημένα στον πάτο της φλάσκας και δεν απορρίπτονται)
- Δύο πλύσεις της φλάσκας με 5 ml PBS

- Προσθήκη 1,5 ml θρυψίνης και τοποθέτηση στον κλίβανο για 3 min. (Το βήμα αυτό απαιτείται για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας.)
- Επιβεβαίωση πως τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από τη φλάσκα με παρατήρηση στο μικροσκόπιο
- Προσθήκη στη φλάσκα 10 ml νέου θρεπτικού μέσου που απενεργοποιεί τη δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά όλης της ποσότητας του θρεπτικού μέσου μαζί με τα κύτταρα σε δύο νέες φλάσκες (κάθε φλάσκα από 5 ml)
- Συμπλήρωση 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου σε κάθε φλάσκα ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε φλάσκα να είναι 10 ml
- Τοποθέτηση των φλασκών στον κλίβανο για επώαση σε πρότυπες συνθήκες

B3. Επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

Υλικά:

- Πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM
- Σκέτο θρεπτικό μέσο DMEM (χωρίς FBS και αντιβιοτικά Pen-Strep)
- Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 9,8 M H₂O₂ (Sigma)

Διαλύματα:

Διάλυμα A: 50 ml σκέτου θρεπτικού υλικού με 2 μL διαλύματος H₂O₂ (τελική C_{H₂O₂}=400 μM)

Διάλυμα B: 50 ml σκέτου θρεπτικού υλικού με 1 μL H₂O₂ (τελική C_{H₂O₂}=200 μM)

Πρωτόκολλο επίδρασης με H₂O₂

- Αφαίρεση παλιού θρεπτικού από τη φλάσκα
- Πλύση με 1-2 ml PBS
- Προσθήκη 10 ml διαλύματος A ή B (ανάλογα με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση H₂O₂)
- Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο για 2 ώρες με καπάκι με διαπερατό φίλτρο
- Πλύση με 1-2 ml PBS
- Προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM και τοποθέτηση στον κλίβανο με καπάκι με διαπερατό φίλτρο
- Ανακαλλέργεια για 1 ή 2 passages μέχρι την ανίχνευση sen-beta-Gal

B4. Απομόνωση & ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών από κύτταρα απαιτούνται:

α) Αναστολείς πρωτεασών (ώστε να μην αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες που πρόκειται να μελετηθούν)

β) Διάλυμα που θα προκαλέσει λύση των κυττάρων (Lysis Buffer), το οποίο αποτελείται από: 30 mM Tris, 10% Glycerol, 150 mM NaCl και 1% NP40

Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τη φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS δύο φορές
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 3 min στον κλίβανο
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο αν έχει επέλθει αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού για να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml PBS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1800 στροφές για 5-7 min σε θερμοκρασία δωματίου 25°C
- Προσθήκη 100μl διαλύματος λύσης στο οποίο είχε προστεθεί 15μl διαλύματος που περιέχει αναστολείς πρωτεασών
- Επαναδιάλυση του ιζήματος και μεταφορά του σε eppendorf
- Διατήρηση της πρωτεΐνης στον πάγο για 40 min και ανάδευση σε vortex κάθε 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο eppendorf
- Αποθήκευση της στους -80oC

Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών- μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Blue G-250, η οποία μεταβάλλει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460 nm στα 595 nm όταν προσδεθεί σε πρωτεΐνη, καθώς επίσης και πρωτεϊνικά δείγματα γνωστής συγκέντρωσης. Έτσι, δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη που δείχνει τη συσχέτιση των τιμών απορρόφησης με τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και βάσει της οποίας υλοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων της παρούσας εργασίας.

Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η απορρόφηση που προέκυψε από 5 μL άγνωστης πρωτεΐνης διαλυμένη σε 495 μL διαλύματος Bradford (5%).

Πρωτόκολλο υπολογισμού πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

- Ποσότητες από 1 μg έως 20 μg αλβουμίνης ορού βοδινού (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800 μl ddH₂O
- Προσθήκη 200 μl χρωστικής Coomassie Blue σε κάθε δείγμα
- Επώαση μίγματος για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου 25°C
- Ήπια ανάδευση των δειγμάτων
- Μεταφορά σε 96wells και φωτομέτρηση στα 595nm
- Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ανάλογα με τις τιμές απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE)

Η τεχνική SDS–PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, και άλλων μακρομορίων όπως είναι το DNA και το RNA, βάσει του μοριακού βάρους τους. Η τεχνική χρησιμοποιεί τον αποδιατακτικό παράγοντα SDS ώστε οι πρωτεΐνες να αποκτήσουν την γραμμική, πρωτοταγή δομή τους. Επιπλέον, αυτός ο SDS φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, ώστε το συνολικό τους φορτίο να μην επηρεάζει την κινητικότητά τους κατά μήκος της πηκτής, αλλά και να προωθείται η κίνησή τους προς τον αντίθετο πόλο της συσκευής που είναι θετικά φορτισμένος λόγω της διαφοράς ηλεκτρικού δυναμικού που εφαρμόζεται σε αυτή. Η πηκτή αποτελείται από πολυμερή ακρυλαμίδιου και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πόρων διαμέσου των οποίων διέρχονται οι πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες του δείγματος που έχουν μικρότερο μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα και επομένως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης εντοπίζονται πιο κοντά στο θετικό πόλο της συσκευής, σε σχέση με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες. Η ταχύτητα (U) με την οποία μετακινείται μια πρωτεΐνη στην πηκτή πολυακρυλαμίδης εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E) που εφαρμόζεται σε αυτή, από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και από το συντελεστή τριβής (f). Οι παραπάνω μεταβλητές συνδέονται με τη σχέση $U = E z / f$

Υλικά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample buffer)
- Αναγωγικό διάλυμα (Reducing buffer)
- Gel πολυακρυλαμίδης – SDS (NuPage Novex Tris – Acetate Mini Gels)
- Μάρτυρας (Ladder) γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (Precision Plus Protein Standards)

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (NuPage MES or MOPS Running buffer)
- Διπλά απεσταγμένο H₂O (DEMO_{S.A.})

Προετοιμασία και αποδιάταξη πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες προτού διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, αποδιάσσονται σε θερμικό κυκλοποιητή για 10 λεπτά στους 95°C μέσα σε διάλυμα αποδιάταξης. Η σύσταση του διαλύματος αυτού ήταν:

- y μL πρωτεϊνών συγκέντρωσης 20μgr
- 4 μL Sample buffer 6x (Reducing buffer και Loading Buffer)
- x μL ddH₂O, ώστε V_{τελ} = 20 μL

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Για την παρασκευή του gel πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής συστατικά:
Για το stacking gel (3,9% acrylamide):

- 0,65 ml 30% acrylamide/0,8% bisacrylamide
- 1,25 ml 4x Tris-CI/SDS pH 6.8
- 3,05 ml H₂O
- 25 μL 10% (w/v) ammonium persulfate
- 5 μL TEMED

Για το separating gel (12% acrylamide):

- 2 ml 30% acrylamide/0,8% bisacrylamide
- 1,25 ml 4x Tris-CI/SDS pH 8.8
- 1,75 ml H₂O
- 0,017 ml 10% (w/v) ammonium persulfate
- 0,003 ml TEMED

Διαχωρισμός πρωτεϊνών

- Συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad)
- Προσθήκη 600 ml (50 ml Running Buffer σε 950 ml ddH₂O) στο εμπρόσθιο και το οπίσθιο τμήμα της συσκευής
- Προσθήκη 200 ml Running Buffer στο ενδιάμεσο τμήμα της συσκευής
- Ενεργοποίηση της συσκευής στα 70 V για 15 min και στη συνέχεια στα 180 V για 40 min

B5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western Blot

Με το αποτύπωμα (blotting) κατά Western επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσα σε ένα πολύπλοκο πρωτεϊνικό μίγμα. Στη συγκεκριμένη τεχνική, το πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών αρχικά διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) σε πήκτωμα ακριλαμίδης παρουσία του παράγοντα SDS που πραγματοποιείται σε κατεύθυνση κάθετη ως προς το επίπεδο του gel. Οι ζώνες των πρωτεϊνών μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene difluoride) ή μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Στη συνέχεια, γίνεται εντοπισμός της πρωτεΐνης που αναζητείται μέσω επώασης της μεμβράνης με αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη. Η σύσταση της μεμβράνης υποβοηθά τη σύνδεση των αντισωμάτων με την υπό αναζήτηση πρωτεΐνη. Το αντίσωμα που έχει προσδεθεί στην πρωτεΐνη, αναγνωρίζεται και προσδένει ειδικά ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (Horseradish Peroxidase). Ακολουθεί αυτοραδιογραφία κατά την οποία σχηματίζονται σκοτεινές ζώνες σε ένα φιλμ ακτινών X. Οι ζώνες αυτές είναι αντιπροσωπευτικές των επιπέδων έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης, δηλαδή της καβεολίνης-1. Τα ίδια βήματα εφαρμόζονται και για την ταυτοποίηση και εμφάνιση στο φιλμ της β-ακτίνης που λειτουργεί ως control.

Υλικά ανοσοαποτύπωσης κατά Western

- Transfer buffer (διάλυμα μεταφοράς) (1000 ml)
- 100 ml 5% Transfer buffer 10x (NuPage Transfer buffer)
- 200 ml 1% Μεθανόλη (Applichem)
- 700 ml H₂O
- Χαρτί Whitman
- Μεμβράνη PVDF
- Χρωστική μεμβράνης
- Διάλυμα πλύσης (TBT-T)
- 100 ml TBS 10x
- 900 ml H₂O
- 1 ml Tween20
- Διάλυμα για μπλοκάρισμα 5% (2,5 gr σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος διαλυμένα σε 50 ml TBS-T) που εμποδίζει τη μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος σε άλλες πρωτεΐνες εκτός της επιθυμητής
- Ορός αλβουμίνης βοδινού (BSA)

- Ενισχυτικό σήματος ECL (GE Healthcare)
- Rabbit polyclonal anti-caveolin-1, 1:500)
- Rabbit monoclonal anti-actin, 1:3000)
- HRP (Goat anti-rabbit, 1:10000)
- Rabbit monoclonal anti-p16^{INK4a}

Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης κατά Western

Για τη μεταφορά των διαχωρισμένων πλέον πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Trans-Blot Wet Transfer Cell (Bio-Rad):

- Επώαση της μεμβράνης PVDF για 15 min σε διάλυμα μεθανόλης που προκαλεί ενεργοποίησή της
- Επώαση του gel πολυακρυλαμίδης, της μεμβράνης PVDF, των δύο χαρτακίων Whitman, και των δύο σφουγγαράκιων στο Transfer Buffer για 20 min
- Συναρμολόγηση του sandwich με την εξής σειρά των υλικών: σφουγγαράκι, χαρτάκι Whitman, μεμβράνη PVDF, χαρτάκι Whitman, σφουγγαράκι
- Τοποθέτηση του sandwich στη συσκευή και ενεργοποίησή της στα 400 mA για 90 min
- Προσεκτική αποσυναρμολόγηση του sandwich μετά το πέρας των 90 λεπτών
- Χρώση της μεμβράνης PVDF με Ponceau κατά την οποία διακρίνεται μία ευθεία ζώνη στα 42 kD που αντιπροσωπεύει τη β-ακτίνη (εικόνα)
- Χρώση του gel ακρυλαμίδης με τη χρωστική Coomassie Blue προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως οι πρωτεΐνες έχουν μεταφερθεί επιτυχώς από το gel στη μεμβράνη
- Ξέπλυμα της μεμβράνης PVDF με TBS-T για 10 min υπό ανάδευση (3 φορές)
- Μεταφορά της μεμβράνης PVDF στο διάλυμα μπλοκαρίσματος
- Ξέπλυμα της μεμβράνης PVDF με TBS-T για 10 min υπό ανάδευση (3 φορές)
- Ολονύκτια επώαση της μεμβράνης PVDF με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C
- Ξέπλυμα της μεμβράνης PVDF με TBS-T για 10 min υπό ανάδευση (3 φορές)
- Επώαση της μεμβράνης PVDF με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C υπό ανάδευση
- Ξέπλυμα της μεμβράνης PVDF με TBS-T για 10 min υπό ανάδευση (3 φορές)

Ακολουθεί αυτοραδιογραφία κατά την οποία αποτυπώνεται το σήμα των αντισωμάτων και ποσοτικοποιούνται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης. Η ανίχνευση του σήματος περιλαμβάνει το μη ραδιενεργό υπόστρωμα ECL που βασίζεται στο luminol καθώς και το ένζυμο HRP που οδηγεί σε οξείδωση του luminol παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και καθώς η χημική ενέργεια μετατρέπεται σε φωτεινή, παράγεται σήμα φωτός. Το πρωτόκολλο της αυτοραδιογραφίας παρατίθεται παρακάτω:

- Επώαση της μεμβράνης PVDF στο ενισχυτικό σήματος ECL για 3 min
- Απομάκρυνση του ενισχυτικού σήματος με διηθητικό χαρτί
- Μεταφορά της μεμβράνης PVDF στο ειδικό μηχάνημα UVITEC
- Οπτικοποίηση του φωτεινού σήματος των πρωτεϊνικών ζωνών με χρήση κατάλληλου προγράμματος του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το μηχάνημα UVITEC
- Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων με χρήση του προγράμματος IMAGE J

B6. Ανοσοφθορισμός

Πρόκειται για μια τεχνική ανοσοϊστοχημείας η οποία βασίζεται στη χρήση φθοριοχρωμάτων (μόρια που φθορίζουν όταν διεγερθούν με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος) προκειμένου να οπτικοποιηθούν διάφορα αντιγόνα του κυττάρου, όπως είναι οι πρωτεΐνες και απαιτεί επώαση του βιολογικού δείγματος με ειδικό αντίσωμα για την υπό αναζήτηση πρωτεΐνη. Το αντίσωμα αυτό μπορεί να είναι συζευγμένο με ένα φθοριόχρωμα (άμεσος ανοσοφθορισμός) ή διαφορετικά μπορεί στο ειδικό αντίσωμα να προσδεθεί ένα δεύτερο αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με κάποιο φθοριόχρωμα (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Στη συνέχεια, η υπό μελέτη πρωτεΐνη μπορεί να παρατηρηθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού και να προσδιορισθεί η θέση της εντός του κυττάρου.

Μονιμοποίηση κυττάρων

- Πλύση με 1 ml PBS στα wells που περιέχουν τις καλυπτρίδες
- Προσθήκη 300 μ L μεθανόλης (η οποία αποθηκεύεται στους -20°C) σε κάθε well
- Μεταφορά του 6-well plate στους -20°C για >10 λεπτά
- Αφαίρεση μεθανόλης
- Πλύση με 1 ml PBS και καλή απομάκρυνση του

- Κάλυψη του 6-well plate με αλουμινόχαρτο και αποθήκευση στους -20 °C μέχρι τη στιγμή του ανοσοφθορισμού

Υλικά ανοσοφθορισμού

- Αντικειμενοφόροι πλάκες
- Καλυπτρίδες
- Πρωτογενές αντίσωμα για την καβεολίνη-1 (mouse anti-caveolin-1 clone Z034 100 µg/200 µL REF 036000)
- Πρωτογενές αντίσωμα για τη 53BP1 (anti-53BP1 clone BP13 mouse monoclonal IgG1 200 µg/ 235 µL# 05-726)
- Δευτερογενές (φθορίζων) αντίσωμα για την καβεολίνη-1 και για 53bp1 (cav anti-rabbit, 53BP1 anti-mouse 1:500)

Διαλύματα:

- 1% Triton-X-100 σε PBS (Διάλυμα Α)
- 0,02% Tween20 σε PBS (Διάλυμα Β)
- 0,02% Tween20 σε PBS και 1% BSA (Διάλυμα Γ)
- Διάλυμα Hank's Balanced Solution (PBS)
- Διάλυμα χρωστικής DAPI

Πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού

- Πλύση με 1 ml PBS για 5 min χωρίς ανάδευση στα wells (3 φορές)
- Προσθήκη 50 µL από το διάλυμα Α στα wells και παραμονή για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου 25°C
- Πλύση με 1 ml από το διάλυμα Β για 5 min
- Προσθήκη 1 ml από το διάλυμα Γ ώστε να γίνει blocking (δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με την αλβουμίνη, ώστε τα αντισώματα να προσδεθούν μόνο στις ειδικές θέσεις) και απομάκρυνσή του μετά από 10 min
- Προσθήκη 50 µL του δύο πρωτογενών αντισωμάτων (ένα για καβεολίνη-1 και ένα για 53BP1), επώαση για 1 ώρα και στη συνέχεια απομάκρυνσή του
- Πλύση με 1 ml από το διάλυμα Β για 5 min σε rocking platform shaker

- Προσθήκη 50 μL του δευτερογενούς αντισώματος και επώαση για 45 – 60 min στο σκοτάδι
- Πλύση 1 ml με το διάλυμα Β για 5 λεπτά σε rocking platform shaker
- Πλύση με 1 PBS για 5 λεπτά σε rocking platform shaker
- Αφαίρεση των καλυπτρίδων από το 6-well plate και στέγνωμά τους
- Προσθήκη 10 μL χρωστικής DAPI
- Τοποθέτηση των καλυπτρίδων ανάποδα σε αντικειμενοφόρους πλάκες
- Σφράγισμα των άκρων των καλυπτρίδων πάνω στην επιφάνεια των αντικειμενοφόρων πλακιδίων με υγρή κόλλα ή βερνίκι
- Αποθήκευση των αντικειμενοφόρων πλακιδίων στους 4°C στο σκοτάδι

B7. Ανίχνευση γήρανσης με χρώση Senescence-Associated β -galactosidase (SA- β -gal)

Η γήρανση των κυττάρων μπορεί να οπτικοποιηθεί μέσω ταυτοποίησης της αυξημένης ενεργότητας του λυσοσωματικού ενζύμου β -γαλακτοσιδάσης (Kurz et al., 2000). Τα φυσιολογικά κύτταρα που δεν έχουν γεράσει παράγουν φυσιολογικά επίπεδα β -γαλακτοσιδάσης από τα λυσοσώματα, η ενεργότητα της οποίας ανιχνεύεται σε βέλτιστη τιμή pH= 4, χρησιμοποιώντας το χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β D-galactopyranoside) (Miller, 1972). Αντίθετα, τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα β -γαλακτοσιδάσης λόγω της αύξησης στο μέγεθος των λυσοσωμάτων τους (Kurz et al, 2000), η οποία ανιχνεύεται βέλτιστα σε τιμή pH= 6 με το ίδιο υπόστρωμα X-gal (Dimri et al., 1995). Έτσι, μόνο τα γηρασμένα κύτταρα βάφονται με μπλε χρώμα και διακρίνονται από τα υπόλοιπα στο μικροσκόπιο.

Υλικά:

Διάλυμα μονιμοποίησης (fixative) 8 ml: 2% formaldehyde/0,2% glutaraldehyde σε PBS

- 1,6 ml HCHO 10%
- 0,032 ml Glut 50%
- 6,368 ml PBS

Διάλυμα χρώσης (staining):

- 40 mM Na_2HPO_4 buffer pH=6
- 5mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$
- 5mM $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$

- 150 mM NaCl
- 2mM MgCl₂
- 1mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

Πρωτόκολλο sen-beta-gal

- Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από το well plate της κυτταροκαλλιέργειας συγκέντρωσης $0,3-2 \times 10^5$
- Πλύση με παγωμένο PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη μονιμοποιητικού διαλύματος και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 25°C
- Πλύση με παγωμένο PBS (δύο φορές)
- Προσθήκη 1-2 ml διαλύματος χρώσης σε κάθε well
- Επώαση στους 37 °C για 6 – 24 ώρες σε κλίβανο χωρίς CO₂
- Αφαίρεση διαλύματος χρώσης
- Πλύση με παγωμένο PBS (τρεις φορές)
- Λήψη φωτογραφιών από το μικροσκόπιο

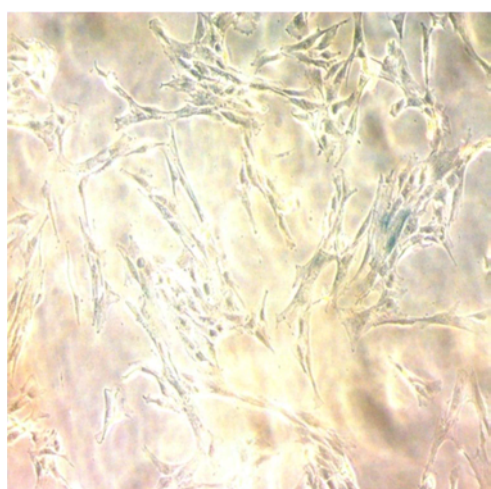
Γ. Αποτελέσματα

Αρχικά απομονώθηκαν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από γέλη του Wharton του ομφάλιου λώρου (WJ-MSCs) δύο ανθρώπινων δοτών, τα οποία στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Κυτταρικής Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα κύτταρα διαχωρίζονταν σε καινούργιες φλάσκες όταν έφταναν σε confluency ~80%.

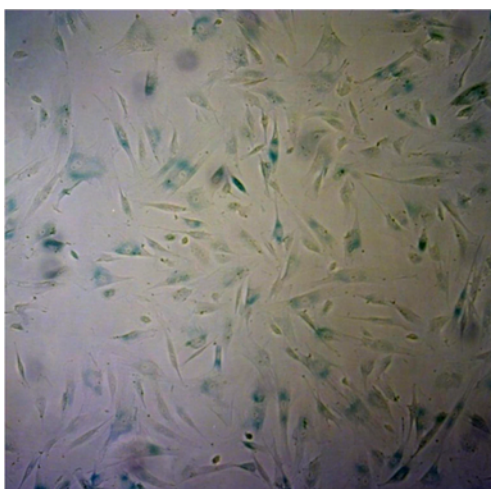
Για την επαγωγή πρόωρης γήρανσης μέσω εξωγενούς οξειδωτικού στρες τα βλαστοκύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 200 μM ή 400μM υπεροξείδιο του υδρογόνου για δύο ώρες και αφέθηκαν στην καλλιέργεια σε κανονικές συνθήκες για 1-2 passages έτσι ώστε να επιτευχθεί γήρανση στο μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων.

Γ1. Οπτικοποίηση της γήρανσης των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε SIPS μέσω SA-βgal

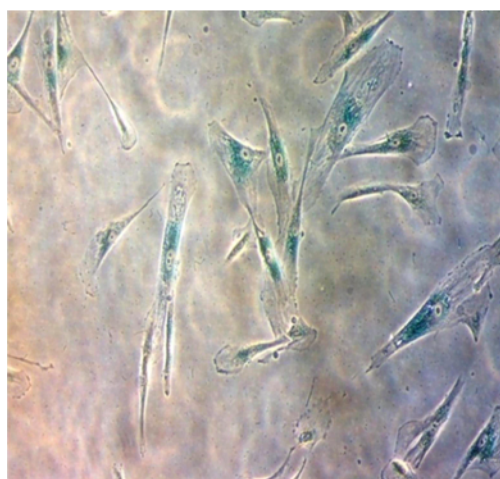
Τα βλαστοκύτταρα (passage 15) επωάστηκαν για δύο ώρες μέσα στο διάλυμα του σκέτου θρεπτικού μέσου με 200μM και 400μM H₂O₂. Έπειτα από 1-2 passages, ακολούθησε το πρωτόκολλο χρώσης sen-beta-gal, σύμφωνα με το οποίο μόνο τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης και βάφονται μπλε λόγω του χρωμογόνου υποστρώματος x-gal που διασπάται από την β-γαλακτοσιδάση. Η δοκιμασία SA-βgal είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης μόνο των γηρασμένων κυττάρων μέσα σε έναν κυτταρικό πληθυσμό. Στη συνέχεια, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να επιβεβαιωθεί αν η παρουσία του H₂O₂ τα οδήγησε τελικά σε πρόωμη γήρανση, όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες (17, 18, 19, 20, 21).



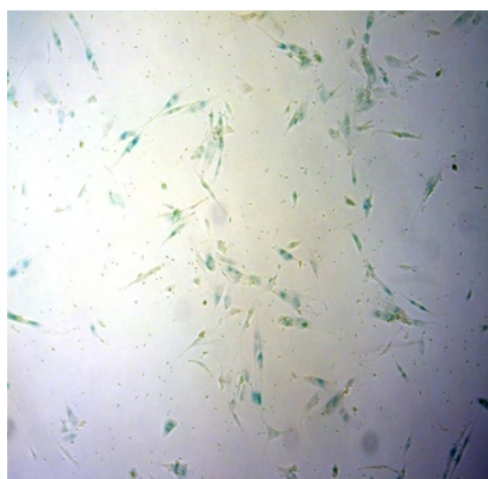
Εικόνα 17. p15 No Treatment



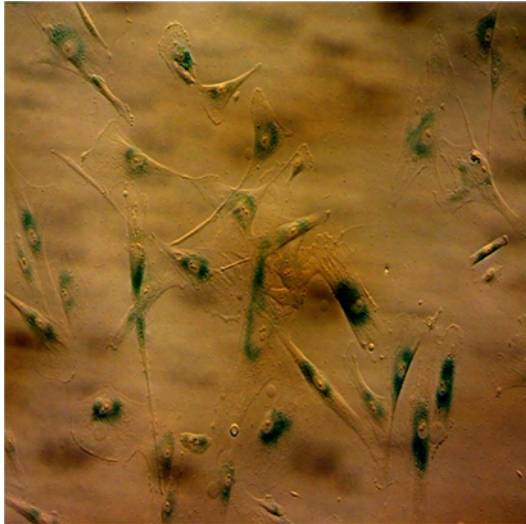
Εικόνα 18. p15. p1 after 200μM H₂O₂



Εικόνα 19. (induced) p15. p2 after 200μM H₂O₂



Εικόνα 20. (induced) p15. p1 after 400μM H₂O₂

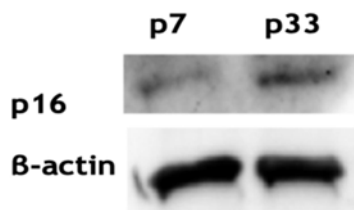


Εικόνα 21. Φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα (old p38).

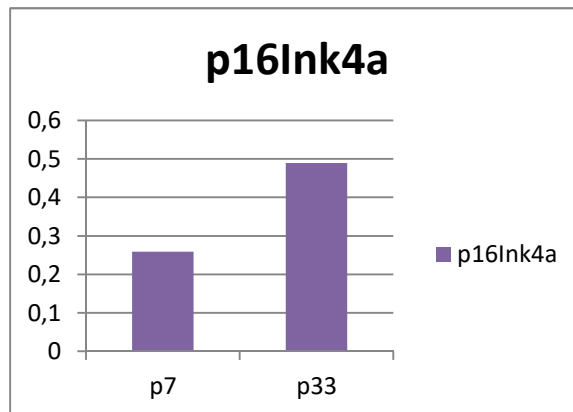
Πράγματι, οι **Εικόνες 18, 19, 20** στο οπτικό μικροσκόπιο επιβεβαίωσαν τη γήρανση που επήλθε στα μέχρι τότε νεαρά βλαστοκύτταρα, λόγω του οξειδωτικού στρες που προκάλεσε σε αυτά το υπεροξείδιο το υδρογόνου, αφού σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του p2 έπειτα από την επίδραση 200 μM H_2O_2 ή p1 έπειτα από την επίδραση 400 μM H_2O_2 διακρίνεται το μπλε χρώμα πάνω τους και συνεπώς εξάγεται το συμπέρασμα πως όντως έχουν γεράσει. Ομοίως και στην **Εικόνα 21**, τα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα (passage 38) φαίνονται σχεδόν όλα να έχουν υποστεί χρώση. Αντίθετα, στην εικόνα των πιο νεαρών κυττάρων (passage 15) τα οποία δεν έχουν δεχθεί επίδραση με οξειδωτικό στρες, ελάχιστα μόνο κύτταρα φαίνεται να έχουν αγνό μπλε χρώμα.

Γ2. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της p16INK4a σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η πρωτεΐνη p16^{INK4a} αποτελεί ενίοτε έναν από τους βιοδείκτες της κυτταρικής γήρανσης, καθώς φαίνεται να εκφράζεται ελάχιστα στα νεαρά κύτταρα, σε αντίθεση με αυτά που έχουν πραγματοποιήσει έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και επομένως έχουν εισέλθει στη φάση της γήρανσης στα οποία η έκφρασή της είναι εμφανής. Ο ρόλος της στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης είναι να απενεργοποιεί τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες Cdk4/Cdk6 που συμμετέχουν στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, επιδιώξαμε με στύπωμα Western να προσδιορίσουμε τα πρωτεϊνικά της επίπεδα σε δείγμα νεαρών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (passage 7) και σε δείγμα γηρασμένων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (passage 33) ώστε να συγκριθούν τα επίπεδά της.



Εικόνα 22. από το λογισμικό UVITEC Alliance.

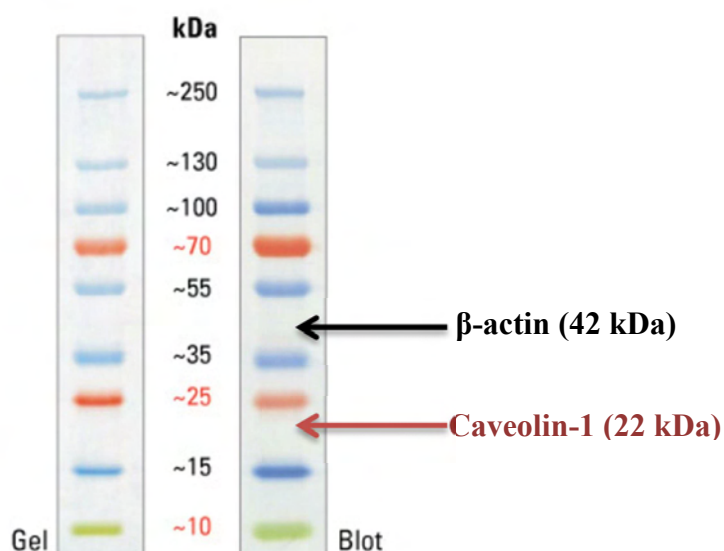


Διάγραμμα 1. Πρωτεϊνικά επίπεδα της $p16^{INK4a}$ σε νεαρό (p7) και γηρασμένο (p33) κυτταρικό δείγμα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης $p16^{INK4a}$ είναι περίπου διπλάσια στο δείγμα των γηρασμένων κυττάρων σε σχέση με το νεαρό κυτταρικό δείγμα, υποδηλώνοντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου για τα κύτταρα του passage 33, και άρα τη γήρανσή τους (**Εικόνα 22 & Διάγραμμα 1**). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με την εικόνα X-gal που προσδιορίσαμε για τα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα (p38, **Εικόνα 21**).

Γ3. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της καβεολίνης-1 σε βλαστοκύτταρα με αναδιπλασιαστική και με επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση.

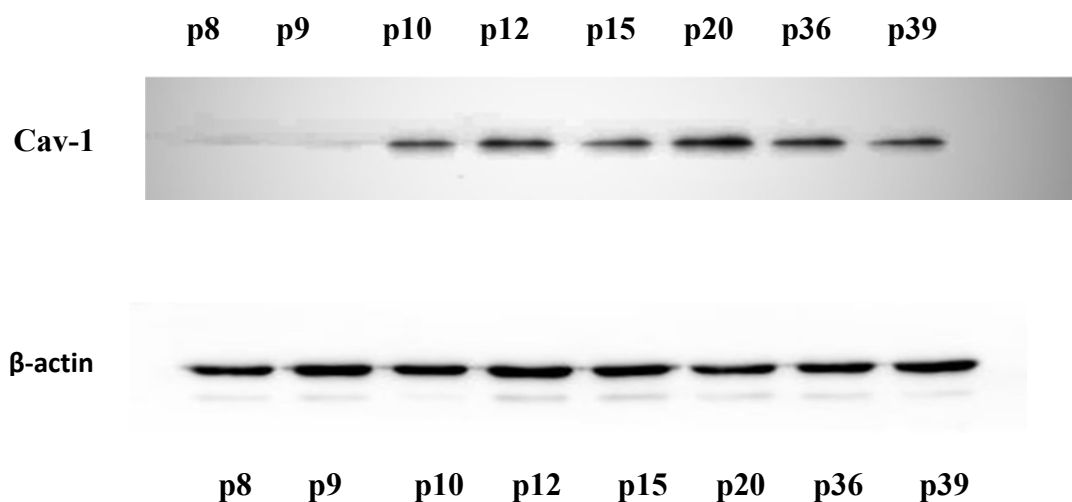
Για τον εντοπισμό της υπό μελέτης πρωτεΐνης στο gel ηλεκτροφόρησης απαιτείται η παρουσία ενός ladder δηλαδή ενός μάρτυρα με γνωστά μοριακά βάρη πρωτεϊνών. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa) (**Εικόνα 25**). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ως loading control η β-ακτίνη η οποία κωδικοποιείται από ένα «housekeeping» γονίδιο. Τα housekeeping γονίδια ή αλλιώς γονίδια αναφοράς χαρακτηρίζονται από ιδιοστατική έκφραση, δηλαδή εκφράζονται σταθερά και σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, διότι συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες. Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των επιπέδων της καβεολίνης-1, καθώς τα επίπεδα της παραμένουν σταθερά και ουσιαστικά επιβεβαιώνει πως έχουν φορτωθεί ίσες ποσότητες των πρωτεϊνικών δειγμάτων στα πηγαδάκια του gel. Στην παρακάτω εικόνα διαφαίνεται μια σειρά γνωστών μοριακών βαρών του ladder (**Εικόνα 23**). Τα μοριακά βάρη της καβεολίνης-1 (22 kD), καθώς και της β-ακτίνης (42 kD) είναι σημειωμένα πάνω στην εικόνα, στα ύψη όπου αναμένεται να φανούν ζώνες.



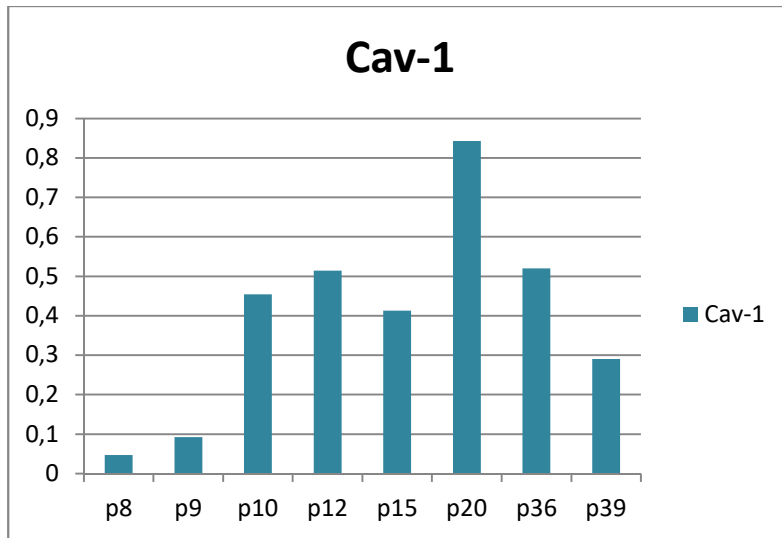
Εικόνα 23. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, n.d.)

Αναδιπλασιαστική Γήρανση

Τα καλλιεργούμενα βλαστοκύτταρα από ορισμένες φλάσκες διατηρήθηκαν για συνεχόμενες ανακαλλιέργειες προκειμένου να επιτελέσουν πολλές διαιρέσεις και να γεράσουν με αναδιπλασιαστικό τρόπο, ενώ ένα μέρος των βλαστοκυττάρων καταψύχθηκαν ώστε να διατηρηθούν στα επιθυμητά στάδια ανάπτυξης (passage) για τις ανάγκες της έρευνας. Η μελέτη της αναδιπλασιαστικής γήρανσης έγινε συγκρίνοντας την πρωτεϊνική έκφραση της καβεολίνης-1 ανάμεσα στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή τα διαφορετικά “passages” (p8, p9, p10, p12, p15, p20, p36, p39) στα οποία έγινε η απομόνωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια η ανοσοαποτύπωση Western blot.



Εικόνα 24. Από το λογισμικό UVITEC Alliance.

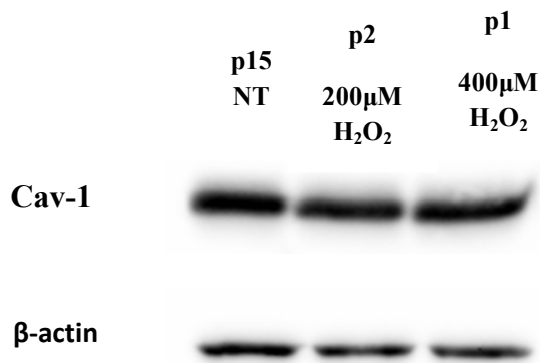


Διάγραμμα 2. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση στα επιμέρους στάδια ανάπτυξης (p8, p9, p12, p10, p15, p20, p36, p39).

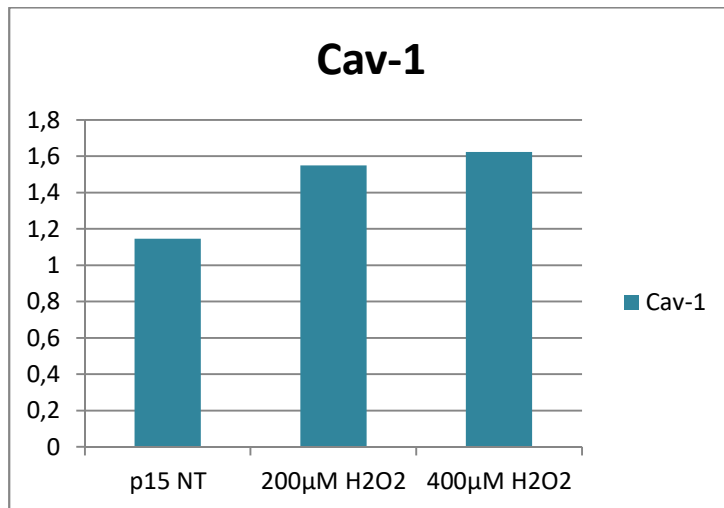
Όπως φαίνεται στις μπάντες του φιλμ, και ακόμη πιο ξεκάθαρα στο ραβδόγραμμα, η καβεολίνη-1 εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα νεαρά κύτταρα (passages 8 & 9). Η συγκέντρωσή της ξεκινά να αυξάνεται από το passage 10, συνεχίζει την αύξηση μέχρι το passage 12, στο passage 15 σημειώνει μικρή μείωση και κορυφώνεται στο passage 20. Στα πολύ γηρασμένα κύτταρα (passages 36 & 39) μειώνεται αρκετά, αλλά και πάλι τα επίπεδά της παραμένουν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με αυτά των νεαρών κυττάρων (**Διάγραμμα 2, Εικόνα 24**). Συνολικά, θα μπορούσαμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι στα μεσαία passages (middle aged cells) παρατηρούμε μια αύξηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 που ακολουθείται από μια μείωση των επιπέδων της στα μεγαλύτερα passages (aged cells).

Stress-Induced Premature Senescence (SIPS)

Επιπλέον, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 σε WJ-MSCs (80% confluency) τα οποία είχαν γεράσει με SIPS. Τα κύτταρα προκειμένου να γεράσουν πρόωρα δέχθηκαν την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων (200μM και 400μM) H_2O_2 . Μετά το πέρας των δύο ωρών το διάλυμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου αφαιρέθηκε και στη συνέχεια προστέθηκε πλήρες θρεπτικό μέσο και συνεχίστηκε η καλλιέργειά τους για 1-2 passages. Ακολούθησε απομόνωση των πρωτεϊνών τους και αργότερα Western blot για τον ποσοτικό προσδιορισμό της καβεολίνης-1. Στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιήθηκε επιπλέον δείγμα μη γηρασμένων βλαστοκυττάρων χωρίς επίδραση οξειδωτικού στρες (No Treatment) ώστε να συγκριθούν οι μεταβολές της ποσότητας της καβεολίνης-1 που συμβαίνουν στο SIPS.



Εικόνα 25. Από το λογισμικό UVITEC Alliance.



Διάγραμμα 3. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 σε φυσιολογικά NT βλαστοκύτταρα, μετά την πρόκληση οξειδωτικού στρες με διάλυμα 200µM H₂O₂ και αφού καλλιεργήθηκαν για δύο ακόμη passages και μετά την επίδραση οξειδωτικού στρες με διάλυμα 400µM H₂O₂ αφού καλλιεργήθηκαν για ένα ακόμη passage.

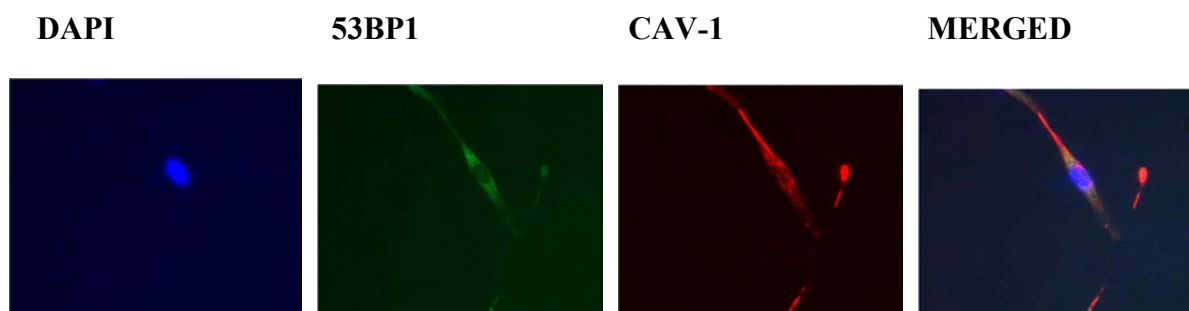
Η πρωτεϊνική έκφραση της καβεολίνης-1 στα κύτταρα που γέρασαν πρόωρα είναι ελαφρώς αυξημένη σε σχέση με τα κύτταρα NT. Μάλιστα, στο δείγμα που δέχθηκε επίδραση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση του H₂O₂ (400µM), η αύξηση της ποσότητας της καβεολίνης-1 φαίνεται ακόμη μεγαλύτερη σε σχέση με το δείγμα που δέχθηκε επίδραση με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 200 µM. (Εικόνα 25 & Διάγραμμα 3)

Γ4. Έλεγχος του κυτταρικού εντοπισμού της καβεολίνης-1 και της 53BP1 σε νεαρά NT, σε επαγόμενα γηρασμένα κύτταρα και σε κύτταρα μέσης ηλικίας με μικροσκοπία φθορισμού.

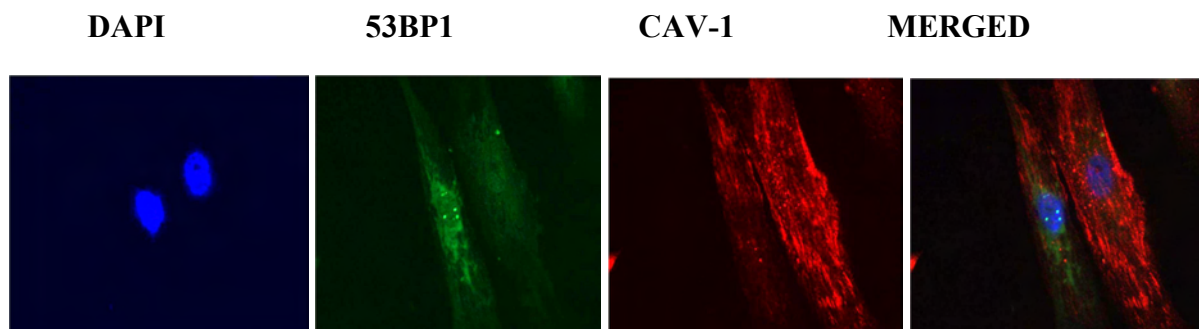
Ελέγχθηκε ο εντοπισμός της καβεολίνης-1 με την τεχνική του ανοσοφθορισμού σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα τριών κατηγοριών: α) νεαρά κύτταρα (passage 7) No Treatment (χωρίς επίδραση), β) κύτταρα μέσης ηλικίας (passage 18) και γ)

γηρασμένα (stress-induced) μέσω της επίδρασης σε αυτά με οξειδωτικό στρες (H_2O_2). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 6-well plates και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων με τη χρωστική DAPI η οποία προσδιορίζει τις θέσεις του πυρήνα, αφού δεσμεύεται εκλεκτικά στη χρωματίνη και εκπέμπει σήμα χρώματος μπλε. Για τον εντοπισμό της υποκυτταρικής θέσης καβεολίνης-1 χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα που εκπέμπει κόκκινο σήμα. Το πράσινο σήμα αντιπροσωπεύει τις εστίες συσσώρευσης της πρωτεΐνης 53BP1 που υποδηλώνουν την εκτεταμένη παρουσία βλαβών στο DNA και έμμεσα τη γήρανση των κυττάρων.

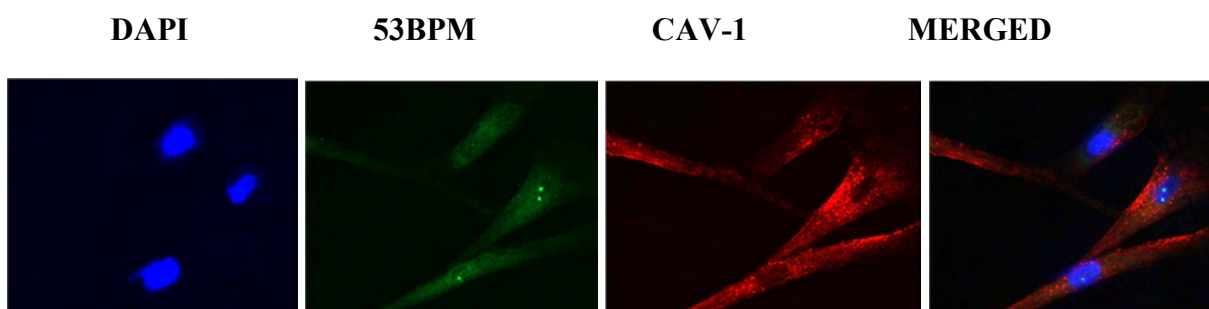
NT YOUNG (passage 7)



INDUCED



MIDDLE AGED (passage 18)



Στα νεαρά κύτταρα (passage 7 No Treatment) δεν ανιχνεύονται εστίες της 53BP1, επομένως τα κύτταρα δεν παρουσιάζουν βλάβες στο DNA. Όσον αφορά την καβεολίνη-1, φαίνεται κύρια να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και σε περιοχές της μεμβράνης.

Στα επαγόμενα με H₂O₂ γηρασμένα κύτταρα (induced) οι περισσότεροι πυρήνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία έντονων πράσινων εστιών που υποδηλώνουν την παρουσία της 53BP1 και επομένως την ύπαρξη βλαβών στο DNA εξαιτίας του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, η καβεολίνη-1 εκτός του φυσιολογικού της εντοπισμού στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα φαίνεται να εντοπίζεται και στον πυρήνα.

Στα middle aged κύτταρα (passage 18) τα αποτελέσματα εμφανίζουν ετερογένεια. Μόνο σε κάποιους από τους πυρήνες φαίνονται εστίες συσσωρευμένης 53BP1, όπως και καβεολίνης-1. Στους περισσότερους πυρήνες δεν ανιχνεύονται ούτε εστίες (dots) 53BP1, ούτε και η καβεολίνη-1, η οποία φαίνεται να διατηρεί το φυσιολογικό της εντοπισμό (κυρίως στη μεμβράνη).

Δ. Συζήτηση

Η γήρανση των κυττάρων χαρακτηρίζεται από τη μόνιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007; Kuilman et al., 2010). Έχουν περιγραφεί δύο είδη κυτταρικής γήρανσης, η αναδιπλασιαστική και η πρόωμη/επαγόμενη (SIPS). Η πρώτη προκαλείται λόγω της βράχυνσης των τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων, η οποία ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, DDR (Itahana et al., 2001). Αυτό με τη σειρά του σηματοδοτεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο μέσω των μονοπατιών p53/p21^{CIP1} και p16^{INK4a}/Rb. Το είδος της πρόωμης γήρανσης δεν απαιτεί τη βράχυνση των τελομερών, αλλά επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες στους οποίους συγκαταλέγεται και το οξειδωτικό στρες που έχει συσχετισθεί έντονα με την κυτταρική γήρανση (Blander et al., 2003; Chen et al., 2004; Chen & Adams, 1994), αφού οδηγεί σε οξείδωση των κυτταρικών συστατικών και σε εκτεταμένες βλάβες στο DNA, όπως είναι τα DBS. Οι βλάβες αυτές αναγνωρίζονται από συγκεκριμένα μόρια που ενεργοποιούν και καθοδηγούν το DDR επάγοντας πρόωρη γήρανση. Η κυτταρική γήρανση συνοδεύεται από μια ποικιλία φαινοτυπικών μεταβολών των κυττάρων, όπως η αυξημένη ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, ο εκκριτικός φαινότυπος SASP, οι δομές SAHFs (Adams 2007; Sikora et al., 2016; Dimri et al., 1995) καθώς και η αύξηση ή και τροποποίηση ορισμένων κυτταρικών μορίων όπως είναι η φωσφορυλίωση των H2AX και 53BP1 που σηματοδοτούν τις βλάβες του DNA και έμμεσα τη γήρανση (Fernandez-Capetillo et al., 2002).

Ένα από τα μόρια που έχουν συσχετισθεί με τη διαδικασία της γήρανσης και τα ηλικιο-σχετιζόμενα νοσήματα αποτελεί η καβεολίνη-1. Πρόκειται για ένα από τα κύρια συστατικά των εγκοιλώσεων (caveolae) της κυτταρικής μεμβράνης που συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών. Η σύγχρονη βιβλιογραφία έχει αναδείξει έναν ιδιαίτερο ρόλο της καβεολίνης-1 και στα δύο είδη κυτταρικής γήρανσης. αφού έχει βρεθεί σε πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις σε φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα (Park 200; Wheaton 2001; Zhang et al., 2014; Park et al., 2005; Lim et al., 2015; Sun et al., 2009). Αναφορικά με την επαγόμενη γήρανση, έχει βρεθεί πως η έκθεση στο υπεροξειδίο του υδρογόνου προάγει τη μεταγραφή της καβεολίνης-1 και αυξάνει τα επίπεδά της και πως η ίδια καθοδηγεί την πρόιμη γήρανση μέσω του μονοπατιού p53-p21^{Waf1/Cip} (Volonte & Galbiati 2020; Dasari et al., 2006).

Αρχικά, επιχειρήσαμε να προσδιορίσουμε στο οπτικό μικροσκόπιο τη γήρανση των κυττάρων εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο sen-beta-gal σε συνθήκες pH=6, σύμφωνα με το οποίο μόνο τα γηρασμένα κύτταρα έχουν αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση εξαιτίας του αυξημένου λυσοσωμικού τους περιεχομένου, η οποία διασπά το υπόστρωμα X-gal και οδηγεί στην εμφάνιση μπλε χρώσης στα κύτταρα (Dimri et al., 1995). Χρησιμοποιήσαμε δείγμα κυττάρων στο passage 15 χωρίς επίδραση στρεσογόνου παράγοντα (NT), δείγμα κυττάρων που είχαν γεράσει με αναδιπλασιαστικό τρόπο (passage 38) και δείγματα κυττάρων που είχαν δεχθεί επίδραση με διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκεντρώσεων 200μM και 400μM το οποίο προκάλεσε οξειδωτικό στρες. Το αποτέλεσμα ήταν πως σε όλα τα δείγματα εκτός του πρώτου (NT) η πλειοψηφία των κυττάρων εμφανίζουν μπλε χρώση υποδηλώνοντας τη γήρανσή τους.

Επίσης, θελήσαμε να διερευνήσουμε με ανοσοαποτύπωση κατά Western τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p16^{INK4a} και να τα συγκρίνουμε ανάμεσα σε ένα δείγμα νεαρών hMSCs (passage 7) και σε δείγμα γηρασμένων hMSCs (passage 33). Η πρωτεΐνη αυτή συνιστά έναν από τους σημαντικότερους ρυθμιστές των μονοπατιών της κυτταρικής γήρανσης καθώς αναστέλλει εκλεκτικά τα σύμπλοκα κυκλίνης D-Cdk4/Cdk6 επιτρέποντας στην Rb να προκαλέσει την αναστολή των γονιδίων που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κυτταρικής γήρανσης (Krishnamurthy et al., 2004). Η σύγκριση των πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων μεταξύ των δύο δειγμάτων έδειξε πως η p16^{INK4a} εκφράζεται σε διπλάσιο βαθμό στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά, υποδεικνύοντας έτσι πως τα γηρασμένα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Δεδομένης της ισχυρής συσχέτισης της καβεολίνης-1 με την κυτταρική γήρανση, θελήσαμε να ελέγξουμε τις αυξομειώσεις στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που γερνούν με φυσιολογικό τρόπο, όπως και σε κύτταρα που γέρασαν πρόωρα έπειτα από την επίδραση οξειδωτικού στρες με επώαση των κυττάρων σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Μελετώντας την πορεία της έκφρασης της καβεολίνης-1 ανάμεσα σε διαδοχικά αναπτυξιακά στάδια καλλιέργειας των βλαστοκυττάρων μέσω ποσοτικοποίησης των

πρωτεϊνικών της συγκεντρώσεων με την τεχνική Western blot, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωσή της κατά την πορεία της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε μεγάλη αύξηση από το passage 10 και έπειτα, η οποία μεγιστοποιήθηκε στο passage 20 και έπειτα μειώθηκε στα πολύ γηρασμένα κύτταρα δηλαδή στα passages 36 και 39. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδει με τις έρευνες των Park (2000), Powter και Wheaton (2001) και εν μέρει με αυτή του Park και της ομάδας του, καθώς το 2005 έδειξαν πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 συνέχισαν να αυξάνονται και μετά το passage 40 σε ανθρώπινα μεσεγχοματικά βλαστοκύτταρα. Όσον αφορά την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση των κυττάρων, το πείραμά μας συμφωνεί με τις υπάρχουσες μελέτες που υποστηρίζουν πως το οξειδωτικό στρες διεγείρει την έκφραση της καβεολίνης-1. Ειδικότερα, προσδιορίσαμε μέσω Western blot τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 και διαπιστώσαμε πως ήταν αυξημένα σε κυτταρικές καλλιέργειες που είχαν επωαστεί για δύο ώρες με διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου διαφορετικών συγκεντρώσεων (200 μ M και 400 μ M) σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (passage 15 No Treatment). Μάλιστα, η συγκέντρωση της καβεολίνης-1 ήταν ακόμη μεγαλύτερη στην καλλιέργεια που δέχθηκε επίδραση με την υψηλότερη συγκέντρωση H_2O_2 . Η αύξηση πάντως της καβεολίνης-1 σε κύτταρα στα οποία η γήρανση είχε επαχθεί μέσω οξειδωτικού στρες δε φαίνεται να είναι των επιπέδων που παρατηρούμε στα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, γεγονός που ενδέχεται να υποδηλώνει διαφορετική συμπεριφορά του μορίου ανάμεσα στις δύο καταστάσεις και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Τέλος, επιχειρήσαμε να ελέγξουμε στο μικροσκόπιο φθορισμού την απόκριση της καβεολίνης-1 κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση αλλά και την επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες γήρανση, μέσω ανάλυσης του υποκυτταρικού εντοπισμού της και σε συνδυασμό με τις εστίες της πρωτεΐνης 53BP1. Η συνήθης τοποθεσία της καβεολίνης-1 είναι κυρίως στην πλασματική μεμβράνη διότι συνιστά το κύριο δομικό συστατικό των caveolae που είναι δομές της μεμβράνης, αλλά συχνά βρίσκεται και στο κυτταρόπλασμα. Σύμφωνα με την πρόσφατα δημοσιευμένη έρευνα του εργαστηρίου Βιολογίας της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η καβεολίνη-1 μπορεί να ανιχνευθεί και μέσα στους πυρήνες οστεοαρθρικών (επομένως γηρασμένων) κυττάρων, καθώς και στους πυρήνες χονδροκυττάρων που υποβλήθηκαν σε οξειδωτικό στρες. Μάλιστα, η υποπυρηνική της ανίχνευση ήταν παροδική (καθώς μετά από ανάκαμψη βρέθηκε στις αρχικές της θέσεις) και συνέπεσε με την ανίχνευση της πρωτεΐνης 53BP1 που συσσωρεύεται στις εστίες βλαβών του DNA (Goutas et al., 2020). Έτσι, μελετήσαμε τον εντοπισμό της καβεολίνης-1 και της 53BP1 σε τρεις κατηγορίες hMSCs: νεαρά (passage 7), επαγόμενα γηρασμένα με H_2O_2 και σε φυσιολογικά μεγαλύτερης ηλικίας κύτταρα (passage 18). Στα νεαρά κύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν εστίες 53BP1 και ταυτόχρονα η καβεολίνη-1 εντοπίστηκε στις φυσιολογικές της θέσεις (κυτταρόπλασμα/πυρήνας). Στην κατηγορία των επαγόμενων γηρασμένων κυττάρων εμφανίστηκαν σχεδόν σε όλους τους πυρήνες εστίες 53BP1 που αντιπροσωπεύουν τις βλάβες στο γενετικό υλικό, γεγονός που ήταν αναμενόμενο. Παράλληλα, εντοπίστηκε έντονο σήμα καβεολίνης-1 περιπυρηνικά και

μέσα στους πυρήνες, γεγονός που υποδηλώνει τη μετακίνηση μορίων καβεολίνης-1 προς αυτούς. Στα φυσιολογικά μεγαλύτερης ηλικίας κύτταρα (passage 18), ανιχνεύθηκαν περισσότερες εστίες βλαβών που αντιπροσωπεύονται από την 53BP1. Η καβεολίνη-1 ανιχνεύθηκε σε κάποιο βαθμό σε περιοχές ορισμένων πυρήνων που άλλοτε είχαν εστίες 53BP1 και άλλοτε όχι. Παρατηρούμε συνεπώς μια χαμηλού βαθμού μετακίνηση της καβεολίνης-1 στον πυρήνα που σε καμία περίπτωση δε συγκρίνεται με τα ποσοστά των επαγόμενων μέσω οξειδωτικού στρες γηρασμένων κυττάρων. Πιθανά η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα στο passage 18 δεν έχουν ακόμη γεράσει και συνεπώς ο υποκυτταρικός εντοπισμός της καβεολίνης-1 πρέπει να ελεγχθεί και σε κύτταρα μεγαλύτερου passage, στο οποίο θα εξακριβωθεί και η γήρανση.

Τα αποτελέσματά μας εν πολλοίς συμφωνούν με τα πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου. Οι όποιες διαφορές επισημάναμε πιθανώς αντικατοπτρίζουν διαφορές που σχετίζονται με το διαφορετικό κυτταρικό τύπο. Προκειμένου να διαλευκανθεί η λειτουργία της καβεολίνης-1 κατά τη γήρανση, προτείνεται να πραγματοποιηθούν περισσότερα πειράματα και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή σε passages μεγαλύτερα του 18 και φυσικά σε κύτταρα από περισσότερους δότες για να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα. Επιπλέον, η μελέτη της καβεολίνης-1 θα μπορούσε να συνδυαστεί και με τη μελέτη μορίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης, όπως είναι για παράδειγμα οι πρωτεΐνες p21 και p14. Μία ακόμη προσέγγιση είναι η αναστολή της έκφρασής της σε νεαρά κύτταρα και μετέπειτα η μελέτη μορίων που σχετίζονται με την απόκριση στις βλάβες του DNA (53BP1, p53, ATM/ATR, κά.) ή/και η μελέτη μορίων που ρυθμίζουν την απόκριση στο οξειδωτικό στρες (πχ. Nrf2, Sirt1, TrxR1).

E. Βιβλιογραφία

A. I. Caplan, "Chapter 15 - mesenchymal stem cells in regenerative medicine," in *Principles of Regenerative Medicine*, A. Atala, R. Lanza, A. G. Mikos, and R. Nerem, Eds., pp. 219–227, Academic Press, Boston, MA, USA, 3rd Edition edition, 2019. doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00015-1

Adams PD. Remodeling chromatin for senescence. *Aging Cell*. 2007;6(4):425-427

Agger, K., Cloos, P. A. C., Rudkjær, L., Williams, K., Andersen, G., Christensen, J., & Helin, K. (2009). The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A–ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes & Development*, 23(10), 1171–1176. doi.org/10.1101/gad.510809

Aline Chrétien, Neil Piront, Edouard Delaive, Catherine Demazy, Noëlle Ninane, Olivier Toussaint, Increased abundance of cytoplasmic and nuclear caveolin 1 in human diploid fibroblasts in H2O2-induced premature senescence and interplay with p38αMAPK, *FEBS Letters*, Volume 582, Issue 12, 2008 Pages 1685-1692, ISSN 0014-5793 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.026>.

Antioxidants 2020, 9(8), 766; <https://doi.org/10.3390/antiox9080766>

Asterholm I. W., Mundy D. I., Weng J., Anderson R. G., Scherer P. E. (2012) Altered mitochondrial function and metabolic iflexibility associated with loss of caveolin-1. *Cell. Metab.* 15, 171-185 [PMCID: PMC3278712] [PubMed: 22326219]

Bagnoli M., Tomassetti A., Figini M., Flati S., Dolo V., Canevari S., Miotti S. (2000) Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to alpha-folate receptor overexpression. *Oncogene* 19, 4754–4763

Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonina, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., et al. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>

Barradas, M., Anderton, E., Acosta, J. C., Li, S., Banito, A., Rodriguez-Niedenführ, M., Maertens, G., Banck, M., Zhou, M.-M., Walsh, M. J., Peters, G., & Gil, J. (2009). Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes & Development*, 23(10), 1177–1182. doi.org/10.1101/gad.511109

Bartholomew, J. N., Volonte, D., & Galbiati, F. (2009). Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Research*, 69(7), 2878–2886

Bastiani M, Liu L, Hill MM, Jedrychowski MP, Nixon SJ, Lo HP, Abankwa D, Luetterforst R, Fernandez-Rojo M, Breen MR, Gygi SP, Vinten J, Walser PJ, North KN, Hancock JF, Pilch PF, Parton RG. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol*. 2009 Jun 29;185(7):1259-73

- Beausejour CM, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 2003;22(16):4212-4222
- Beroukhir R, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2020;463(7283):899-905
- Biswas A, Hutchins R (2007) Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 16: 213- 222
- Bitar, M. S., Abdel-Halim, S. M., & Al-Mulla, F. (2013). Caveolin-1/PTRF upregulation constitutes a mechanism for mediating p53-induced cellular senescence: implications for evidence-based therapy of delayed wound healing in diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(8), E951–E963. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2013>
- Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., & Guarente, L. (2003). Superoxide Dismutase 1 Knock-down Induces Senescence in Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38966–38969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307146200>
- Blanpain C, Horsley V, Fuchs E (2007) Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 128: 445-458.
- Blasiak, J. (2017). DNA-damaging anticancer drugs - a perspective for DNA repair- oriented therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 24(15), 1488–1503. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170124145557>
- Blouin C. M., Le Lay S., Eberl A., Kofeler H. C., Guerrera I. C., Klein C., Le Liepvre X., Lasnier F., Bourron O., Gautier J. F., Ferre P., Hajduch E., Dugail I. (2010) Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J. Lipid Res.* 51, 945–956
- Bongso A, Fong C-Y. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev Reports* 2013;9:226–40
- Bosch M., Mari M., Herms A., Fernandez A., Fajardo A., Kassan A., Giralt A., Colell A., Balgoma D., Barbero E., Gonzalez-Moreno E., Matias N., Tebar F., Balsinde J., Camps M., Enrich C., Gross S. P., Garcia-Ruiz C., Perez-Navarro E., Fernandez-Checa J. C., Pol A. (2011) Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr. Biol.* 21, 681–686
- Bosi A, Bartolozzi B, Guidi S (2005) Allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 37: 2667-2669.
- Boukamp, P., Popp, S. and Kronic, D (2005) Telomere-dependent chromosomal instability. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 10:89-94
- Boyd NL, Park H, Yi H et al. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(3):H1113-H1122
- Bracken AP, et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* 2007;21(5):525-530
- Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 2003;22(20):5323-5335
- Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J.-C., Hansen, K. H., & Helin, K.

- (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & Development*, 21(5), 525–530. doi.org/10.1101/gad.415507
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F 2007. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729–740
- Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120(4):513-522
- Canelles M (2011) The Universality of Asymmetric Division. *J Stem Cell Res Ther* 1: e103
- Cao H, Courchesne WE, Mistack CC. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 2002; 277(11):8771-8774
- Capparelli, C., Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Balliet, R., Pestell, T. G., et al. (2012). Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle*, 11(12), 2285–2302. <https://doi.org/10.4161/cc.20718>
- Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliares, F., Remacle J. and Toyssaint, O. (2002) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1331-1339
- Chen, J.-H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S. E., Williams, G. H., & Hales, C. N. (2004). Loss of Proliferative Capacity and Induction of Senescence in Oxidatively Stressed Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49439–49446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409153200>
- Chen, Q. and Ames, B. N. (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4130-4134
- Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4130–4134. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4130>
- Cheng H, Qiu L, Ma J, Zhang H, Cheng M, Li W, et al. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Mol Biol Rep* 2011;38:5161–8
- Cheng ZJ, Singh RD, Sharma DK, et al. Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol Cell Biol* 2006; 17:3197-3210
- Childs BD, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015;21(12):1424-1435
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H. P., et al. (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42270–42278
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Park, J. S., Jang, I. S., Ahn, J. S., Kim, K. T., et al. (2003). Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27789–27795.

Choudhury, A., Marks, D. L., Proctor, K. M., Gould, G. W. and Pagano, R. E. (2006). Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface. *Nat. Cell. Biol.* 8, 317-328

Cohen A. W., Hnasko R., Schubert W. & Lisanti M.P., (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, 84(4), 1341-1379

Cohen A. W., Razani B., Schubert W., Williams T. M., Wang X. B., Iyengar P., Brasaemle D. L., Scherer P. E., Lisanti M. P. (2004) Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53, 1261–1270

Cohen A. W., Razani B., Wang X. B., Combs T. P., Williams T. M., Scherer P. E., Lisanti M. P. (2003) Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285, C222–C235

Collado M, Blasco MA, Serrano M 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130: 223–233

Coso S., Harrison I., Harrison C. B., et al. NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2012;16(11):1229–1247. doi: 10.1089/ars.2011.4489

Couet J, Li S, Okamoto T et al. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 1997;272(10):6525-6533

Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem.* 1997 Nov 28;272(48):30429-38

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., & Lisanti, M. P. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolinscaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 6525–6533

Cruz M, Siden Å, Tasat DR, Yakisich JS (2010) Are all Glioma Cells Cancer Stem Cells? *J Cancer Sci Ther* 2: 100-106.

d’Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev Cancer.* 2008;8(7):512-522

Dai, S. M., Shan, Z. Z., Nakamura, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., et al. (2006). Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(3), 818–831

Dasari, A., Bartholomew, J. N., Volonte, D., & Galbiati, F. (2006). Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Research*, 66(22), 10805–10814

Dávalos A, Fernández-Hernando C, Sowa G, Derakhshan B, Lin MI, Lee JY, Zhao H, Luo R, Colangelo C, Sessa WC. Quantitative proteomics of caveolin-1-regulated proteins: characterization of polymerase i and transcript release factor/CAVIN-1 IN endothelial cells. *Mol Cell Proteomics.* 2010 Oct;9(10):2109-24

Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 273-83

David BA, Gabriela ANC, Hooi LN, Craig JM, Michael WP, et al. (2008) Novel Therapeutic Approaches to Treat Alzheimer's Disease and Memory Disorders. *J Proteomics Bioinform* 1: 464-476.

De Lange, T. (2004) T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:323-329

Del Pozo M. A., Balasubramanian N., Alderson N. B., Kiosses W. B., Grande-Garcia A., Anderson R. G., Schwartz M. A. (2005) Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* 7, 901–908

Di Guglielmo G. M., Le Roy C., Goodfellow A. F., Wrana J. L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* 5, 410–421

Dietzen, D. J., Hastings, W. R. and Lublin, D. M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270, 6838-6842

G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. L inskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92 (1995), pp. 9363-9367

Ding, L., Zeng, Q., Wu, J., Li, D., Wang, H., Lu, W., et al. (2017). Caveolin1 regulates oxidative stress-induced senescence in nucleus pulposus cells primarily via the p53/p21 signaling pathway in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9521–9527. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7789>

Dulhunty, A. F., & Franzini-Armstrong, C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *The Journal of Physiology*, 250(3), 513–539

Engelman J. A., Wykoff C. C., Yasuhara S., Song K. S., Okamoto T., Lisanti M. P. (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* 272, 16374–16381

Engelman J. A., Zhang X. L., Galbiati F., Lisanti M. P. (1998) Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3). Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett.* 429, 330–336

Escribá PV, Nicolson GL. Membrane structure and function: relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun;1838(6):1449-50

Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., ... Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194-198. doi:10.1038/nature02118

Farhat, N., Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Villeneuve, L., Mamarbachi, M., Perrault, L. P., et al. (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(11), 761–769

Feng Y., Venema V. J., Venema R. C., Tsai N., Behzadian M. A., Caldwell R. B. (1999) VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 157–167

Feng Y., Venema V. J., Venema R. C., Tsai N., Caldwell R. B. (1999) VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 192–197

Feng, X., Gao, W., & Li, Y. (2017). Caveolin-1 is involved in high glucose accelerated human glomerular mesangial cell senescence. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 32(5), 883–889. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.254>

Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, et al. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol.* 2002;4(12):993-997. doi:10.1038/ncb884

Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T. W., Kelly R. A., Michel T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 22810–22814

Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4–25

Fielding P. E., Fielding C. J. (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34, 14288–14292

Fielding PE, Chau P, Liu D et al. Mechanism of platelet derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80. *Biochemistry* 2004; 43(9):2578-2586

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>

Fiucci G., Ravid D., Reich R., Liscovitch M. (2002) Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21, 2365–2375

Fridolfsson H. N., Kawaraguchi Y., Ali S. S., Panneerselvam M., Niesman I. R., Finley J. C., Kellerhals S. E., Migita M. Y., Okada H., Moreno A. L., Jennings M., Kidd M. W., Bonds J. A., Balijepalli R. C., Ross R. S., Patel P. M., Miyanochara A., Chen Q., Lesnefsky E. J., Head B. P., Roth D. M., Insel P. A., Patel H. H. (2012) Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury. *FASEB J.* 26, 4637–4649

Fridolfsson HN, Roth DM, Insel PA, Patel HH. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J.* 2014;28(9):3823-3831. doi:10.1096/fj.14-252320

Fujimoto T., Kogo H., Ishiguro K., Tauchi K., Nomura R. (2001) Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell. *J. Cell Biol.* 152, 1079–1085

Gad, H., Koolmeister, T., Jemth, A. S., Eshtad, S., Jacques, S. A., Strom, C. E., et al. (2014). MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*, 508(7495), 215–221. <https://doi.org/10.1038/nature13181>

Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P. G., Zhu, L., et al. (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2229–2244

Gaudreault, S. B., Dea, D., & Poirier, J. (2004). Increased caveolin-1 expression in Alzheimer’s disease brain. *Neurobiology of Aging*, 25(6), 753–759

Gervasio O. L., Whitehead N. P., Yeung E. W., Phillips W. D., Allen D. G. (2008) TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* 121, 2246–2255

Gil J. Bernard D, Beach D. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell. Bio.* 2004;6(1):67-72

Gil J. Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumor suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):667-677

Ginter E., Simko V., Panakova V. Antioxidants in health and disease. *Bratislava Medical Journal*. 2014;115(10):603–606. doi: 10.4149/BLL_2014_116.

Gkantitagas I., Brugger B., Stuvén E., Kaloyanova D., Li X. Y., Lohr K., Lottspeich F., Wieland F. T., Helms J. B. (2001) Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 1819-1833

Glenney JR Jr, Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10517- 21

Goodarzi, A. A., Jonnalagadda, J. C., Douglas, P., Young, D., Ye, R., Moorhead, G. B., et al. (2004). Autophosphorylation of ataxiatelangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *The EMBO Journal*, 23(22), 4451–4461

Goutas, A.; Papathanasiou, I.; Mourmoura, E.; Tsesmelis, K.; Tsezou, A.; Trachana, V. Oxidative Stress Response Is Mediated by Overexpression and Spatiotemporal Regulation of Caveolin-1. *Antioxidants* **2020**, *9*, 766.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 2012;70(5):257–265. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458–460

Hart, P. C., Ratti, B. A., Mao, M., Ansenberger-Fricano, K., Shajahan-Haq, A. N., Tyner, A. L., et al. (2016). Caveolin-1 regulates cancer cell metabolism via scavenging Nrf2 and suppressing MnSOD-driven glycolysis. *Oncotarget*, 7(1), 308–322. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5687>

Hayashi T., Rizzuto R., Hajnoczky G., Su T. P. (2009) MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 19, 81–88

Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C., & Helenius, A. (2009). Biogenesis of Caveolae: Stepwise Assembly of Large Caveolin and Cavin Complexes. *Traffic*, 11(3), 361-382.

Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585–621.

Hayflick L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614–636.

Heathfield, S. K., Le Maitre, C. L., & Hoyland, J. A. (2008). Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Research & Therapy*, 10(4), R87

Herbert, Z., Botticher, G., Aschoff, A., Sendemir, E., Zermann, D. H., Arnold, R., et al. (2007). Changing caveolin-1 and oxytocin receptor distribution in the ageing human prostate. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 36(5), 361–365

Herberts CA, Kwa MSG, Hermsen HPH. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* 2011;9:29

Hima Bindu A, Srilatha B (2011) Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 1:115. doi:10.4172/2157-7633.1000115
Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffry M. Jones. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (1998): 1145–147
Rumman M, Dhawan J, Kassem M. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells:

- Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem Cells*. 2015;33(10):2903-2912. doi:10.1002/stem.2056
- Hirst D. G., Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods in Molecular Biology*. 2011;704:1–13. doi: 10.1007/978-1-61737-964-2_1
- Holz, O., Zuhlke, I., Jaksztat, E., Muller, K. C., Welker, L., Nakashima, M., et al. (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *The European Respiratory Journal*, 24(4), 575–579
- Horie M, Ito A, Kawabe Y, Kamihira M (2011) A Genetically Engineered STO Feeder System Expressing E-Cadherin and Leukemia Inhibitory Factor for Mouse Pluripotent Stem Cell Culture. *J Bioprocess Biotechniq S3*: 001
- Huber, K. V., Salah, E., Radic, B., Gridling, M., Elkins, J. M., Stukalov, A., et al. (2014). Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature*, 508(7495), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature13194>
- Itahana, K., Dimri, G., & Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53: P53 and cellular senescence. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2784–2791. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02228.x>
- Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6098–6102. doi: 10.1073/pnas.91.13.6098
- Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. the oncogene and Polycomb-group bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*. 1999;397(6715):164-168
- Jagannadham MV, Sharadadevi A, Nagaraj R. Effects of deleting a tripeptide sequence observed in muscular dystrophy patients on the conformation of synthetic peptides corresponding to the scaffolding domain of caveolin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 25;298(2):203-6
- Jager, M., Hubert, A., Gogiraju, R., Bochenek, M. L., Munzel, T., & Schafer, K. (2019). Inducible knockdown of endothelial protein tyrosine phosphatase-1B promotes neointima formation in obese mice by enhancing endothelial senescence. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(7), 927–944. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7169>
- Jeevani T (2011) Stemcell Transplantation- Types, Risks and Benefits. *J Stem Cell Res Ther* 1: 114
- Jeong K., Kwon H., Lee J., Jang D., Hwang E. M., Park J. Y., Pak Y. (2012) Rab6-mediated retrograde transport regulates inner nuclear membrane targeting of caveolin-2 in response to insulin. *Traffic* 13, 1218–1233
- Juven-Gershon, T., & Oren, M. (1999). Mdm2: The ups and downs. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 5(2), 71–83.
- Kang L, Kou Z, Zhang Y, Gao S (2010) Induced pluripotent stem cells (iPSCs)- a new era of reprogramming. *J Genet Genomics* 37: 415-421
- Kang, M. J., Chung, Y. H., Hwang, C. I., Murata, M., Fujimoto, T., Mook-Jung, I. H., et al. (2006). Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(2), 126–133

Kang, M. J., Chung, Y. H., Hwang, C. I., Murata, M., Fujimoto, T., Mook-Jung, I. H., et al. (2006). Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(2), 126–133

Karmakar S, Roy Choudhury S, Banik NL, Ray SK (2010) Activation of Multiple Molecular Mechanisms for Increasing Apoptosis in Human Glioblastoma T98G Xenograft. *J Cancer Sci Ther* 2: 107-113.

Kim, S. R., Park, J. H., Lee, M. E., Park, J. S., Park, S. C., & Han, J. A. (2008). Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(12), 706–713

Kirkham, M., Nixon, S. J., Howes, M. T., Abi-Rached, L., Wakeham, D. E., Hanzal-Bayer, M., Ferguson, C., Hill, M. M., Fernandez-Rojo, M., Brown, D. A., et al (2008). Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis. *J. Cell Sci.* 121, 2075-2086

Koleske A. J., Baltimore D., Lisanti M. P. (1995) Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1381–1385

Krishnamurthy J, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1299-1307

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134: 657-67

Kruglikov, I. L., Zhang, Z., & Scherer, P. E. (2019). Caveolin-1 in skin aging - from innocent bystander to major contributor. *Ageing Cancer Metastasis Rev Research Reviews*, 55, 100959. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100959>

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS 2010. The essence of senescence. *Genes Dev* 24: 2463–2479

L.L. Liao, B.H.I. Ruzymah, M.H. Ng, J.X. Law (2020) Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells *Science Direct* doi.org/10.1016/j.retram.2019.09.001

Lazarow P. B. (1978) Rat liver peroxisomes catalyze the beta oxidation of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 253, 1522–1528

Le Lay S., Hajduch E., Lindsay M. R., Le Liepvre X., Thiele C., Ferre P., Parton R. G., Kurzchalia T., Simons K., Dugail I. (2006) Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic* 7, 549–561

Lee H, Woodman SE, Engelman JA et al. Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine-kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR14). *J Biol Chem* 2001; 276(37):35150—35158

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL et al. (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103: 1669-1675

Lee S. W., Reimer C. L., Oh P., Campbell D. B., Schnitzer J. E. (1998) Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16, 1391–1397

Lee, J. A., Choi, D. I., Choi, J. Y., Kim, S. O., Cho, K. A., Lee, J. B., et al. (2015). Methyl-beta-cyclodextrin up-regulates collagen I expression in chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity. *Oncotarget*, 6(4), 1942–1953. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3039>

- Lee, J., & Schmid-Schönbein, G. W. (1995). Biomechanics of skeletal muscle capillaries: Hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. *Annals of Biomedical Engineering*, 23(3), 226–246
- Li J, Wang T, Zhang X, Yang X (2011) The Contribution of Next Generation Sequencing Technologies to Epigenome Research of Stem Cell and Tumorigenesis . *Human Genet Embryol S2*: 001
- Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3863-8
- Li S, Setz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Bio Chem* 1996; 271(7):3863-3868
- Li W. P., Liu P., Pilcher B. K., Anderson R. G. (2001) Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J. Cell Sci.* 114, 1397–1408
- Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med* 2014;34:695–704.
- Li, W., Liu, H., Zhou, J. S., Cao, J. F., Zhou, X. B., Choi, A. M., et al. (2012). Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 20922–20930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352336>
- Lim WL, Liao LL, Ng MH, Shiplu RC, Law JX. Current progress in tendon and ligament tissue engineering. *Tissue Eng Regen Med* 2019, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s13770-0
- Lim, J. S., Nguyen, K. C., Nguyen, C. T., Jang, I. S., Han, J. M., Fabian, C., et al. (2015). Flagellin-dependent TLR5/caveolin-1 as a promising immune activator in immunosenescence. *Aging Cell*, 14(5), 907–915. <https://doi.org/10.1111/accel.12383>
- Linge, A., Weinhold, K., Blasche, R., Kasper, M., & Barth, K. (2007). Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular senescence in A549 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(10), 1964–1974
- Lionetti V (2011) How Resident Stem Cells Communicate with Cardiac Cells in Beating Heart? *J Stem Cell Res Ther* 1: e104
- Liu L, Pilch PF. A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):4314-22.
- Liu P, Anderson RG. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem* 1995; 270(45):27179-27185
- Liu P., Li W. P., Machleidt T., Anderson R. G. (1999) Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 369–375
- Liu S, Yuan M, Hou K, Zhang L, Zheng X, Zhao B, et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cell Immunol* 2012;278:35–44
- Liu, P., Ying, Y., & Anderson, R. G. (1997). Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13666–13670

- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumor suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307-315
- Lowry WE, Huang J, Ma YC et al. Csk, a critical link of g protein signals to actin cytoskeletal reorganization. *Dev Cell* 2002; 2(6):733-744
- Luoma, K., Riihimaki, H., Luukkonen, R., Raininko, R., ViikariJuntura, E., & Lamminen, A. (2000). Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*, 25(4), 487–492
- M. Serrano, A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, S.W. Lowe Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a
- MacNee, W. (2005). Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(1), 50–60
- Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y (2008) Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 456: 250-254
- Marchiando A. M., Shen L., Graham W. V., Weber C. R., Schwarz B. T., Austin J. R., 2nd, Raleigh D. R., Guan Y., Watson A. J., Montrose M. H., Turner J. R. (2010) Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J. Cell Biol.* 189, 111–126
- Mastrodonato M., Calamita G., Rossi R., Mentino D., Bonfrate L., Portincasa P., Ferri D., Liquori G. E. (2011) Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 41, 642–651
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, et al. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114: 241–253
- McMahon KA, Zajicek H, Li WP, Peyton MJ, Minna JD, Hernandez VJ, Luby-Phelps K, Anderson RG. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J.* 2009 Apr 22;28(8):1001-15
- Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ et al. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* 1999; 274(6):3910-3917
- Mercier, I., Casimiro, M. C., Wang, C., Rosenberg, A. L., Quong, J., Minkeu, A., et al. (2008). Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation and RB tumor suppressor functional inactivation: implications for the response to hormonal therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 7(8), 1212–1225
- Mercier, I., Jasmin, J. F., Pavlides, S., Minetti, C., Flomenberg, N., Pestell, R. G., Frank, P. G., Sotgia, F. and Lisanti, M. P. (2009). Clinical and translational implications of the caveolin gene family: lessons from mouse models and human genetic disorders. *Lab. Invest.* 89, 614-623
- Meshulam T., Simard J. R., Wharton J., Hamilton J. A., Pilch P. F. (2006) Role of caveolin-1 and cholesterol in transmembrane fatty acid movement. *Biochemistry* 45, 2882–2893
- Michael J. Davies, Roger J.W. Truscott (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (63) 1–3, 114-125 [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00208-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00208-1).
- Michele Bastiani, Robert G. Parton Caveolae at a glance *Journal of Cell Science* 2010 123: 3831-3836; doi: 10.1242/jcs.070102

- Milstein C, Brownlee GG, Harrison TM, Mathews MB (September 1972). "A possible precursor of immunoglobulin light chains". *Nature New Biology*. 239 (91): 117–20. doi:10.1038/newbio239117a0. PMID 4507519.
- Mineo C, James GL et al. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem* 1996; 271(20):11930-11935
- Minshall R. D., Tiruppathi C., Vogel S. M., Malik A. B. (2002) Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem. Cell. Biol.* 117, 105–112
- Mittal R (2011) Mesenchymal Stem Cells: The New Players in the Pathogenesis of Tuberculosis. *J Microbial Biochem Technol* 3: ii-0
- Monier S1, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*. 1995 Jul;6(7):911-27
- Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. and Kurzchalia, T. V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6, 911-927
- Moroianu J., Riordan J. F. (1994) Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1677–1681
- Muller, K. C., Welker, L., Paasch, K., Feindt, B., Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., et al. (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respiratory Research*, 7, 32.
- Muller, M. (2009). Cellular Senescence: Molecular Mechanisms, *In Vivo* Significance, and Redox Considerations. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(1), 59–98. doi.org/10.1089/ars.2008.2104
- Munˆ oz-Espiˆ n D, Canˆ amero M, Maraver A, Goˆ mez-Loˆ pez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodrıˆ guez-Baeza A, VarelaNieto I, Ruberte J, Collado M, et al. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104–1118.
- Mundy D. I., Li W. P., Luby-Phelps K., Anderson R. G. (2012) Caveolin targeting to late endosome/lysosomal membranes is induced by perturbations of lysosomal pH and cholesterol content. *Mol. Biol. Cell* 23, 864–880
- Murata M, Peranen J, Schreiner R et al. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(22):10339-10343
- Murata M., Peranen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T. V., Simons K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10339–10343
- Mustacich, D., & Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal*, 346(Pt 1), 1–8. 158. Volonte, D., & Galbiati, F. (2009). Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Reports*, 10(12), 1334–1340
- Narita M, Lowe SW. 2005. Senescence comes of age. *Nat Med* 11: 920–922
- Neokleous N, Sideri A, Peste-Tsilimidis C (2011) Double cord blood transplantation: cooperation or competition? *Hematol Rep* 3:e6

- Nyunoya, T., Monick, M. M., Klingelutz, A., Yarovinsky, T. O., Cagley, J. R., & Hunninghake, G. W. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(6), 681–688
- Oh, C. W., Bump, E. A., Kim J. S., Janigro, D. and Mayberg, M. R. (2001) Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 156: 232-240
- Oh, Y. S., Khil, L. Y., Cho, K. A., Ryu, S. J., Ha, M. K., Cheon, G. J., et al. (2008). A potential role for skeletal muscle caveolin-1 as an insulin sensitivity modulator in ageing-dependent non-obese type 2 diabetes: studies in a new mouse model. *Diabetologia*, 51(6), 1025–1034
- Ohshima, S. (2004) Apoptosis is stress-induced and spontaneously senescent human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 241-246
- Oleg, Semenov. (2011). Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly and their Potential for Cardio-Vascular Tissue Engineering. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*. 4. 64-71. 10.2174/1875043501104010064.
- Olovnikov AM. 1971. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201: 1496–1499.
- Orlichenko L., Weller S. G., Cao H., Krueger E. W., Awoniyi M., Beznoussenko G., Buccione R., McNiven M. A. (2009) Caveolae mediate growth factor-induced disassembly of adherens junctions to support tumor cell dissociation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4140–4152
- Ostermeyer A. G., Paci J. M., Zeng Y., Lublin D. M., Munro S., Brown D. A. (2001) Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J. Cell Biol.* 152, 1071–1078
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G et al. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377-384.
- Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *JHistochemCytochem* 1953; 1(4):188-211
- Parat, M. O. and Fox, P. L. (2001). Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible. *J. Biol. Chem.* 276, 15776-15782
- Park H, Go YM, Darji R et al. Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(4):H1285-H1293
- Park, J. S., Kim, H. Y., Kim, H. W., Chae, G. N., Oh, H. T., Park, J. Y., et al. (2005). Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(5), 551–559
- Park, W. Y., Park, J. S., Cho, K. A., Kim, D. I., Ko, Y. G., Seo, J. S., et al. (2000). Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20847–20852.
- Parton, R. G., & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 185–194
- Parton, R. G. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185-194
- Patel H. H., Murray F., Insel P. A. (2008) Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 359–391

Patel, A., Burton, D. G., Halvorsen, K., Balkan, W., Reiner, T., Perez-Stable, C., et al. (2015). MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways. *Oncogene*, 34(20), 2586–2596. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.195>

Pedersen J. I., Gustafsson J. (1980) Conversion of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 betacholestanic acid into cholic acid by rat liver peroxisomes. *FEBS Lett.* 121, 345–348

Pelkmans L. Secrets of caveolae-and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian virus. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746:295-304

Petriello, M. C., Han, S. G., Newsome, B. J., & Hennig, B. (2014). PCB 126 toxicity is modulated by cross-talk between caveolae and Nrf2 signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 277(2), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.03.018>

Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2015;30(1):11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.

Pol A, Luetterforst R, Lindsay M et al. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Bio* 2001; 152(5):1057-1070

Pol A, Martin S, Fernandez MA et al. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Cell Biol* 2005; 16:2091-2105

Pol A., Calvo M., Enrich C. (1998) Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett.* 441, 34–38

Pol A., Luetterforst R., Lindsay M., Heino S., Ikonen E., Parton R. G. (2001) A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* 152, 1057–1070

Pol A., Martin S., Fernandez M. A., Ferguson C., Carozzi A., Luetterforst R., Enrich C., Parton R. G. (2004) Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell* 15, 99–110

Pol A., Martin S., Fernandez M. A., Ingelmo-Torres M., Ferguson C., Enrich C., Parton R. G. (2005) Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell* 16, 2091–2105

Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ingelmo

Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C. and Parton, R.G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell* 16, 2091-2105

Powter, E. E., Coleman, P. R., Tran, M. H., Lay, A. J., Bertolino, P., Parton, R. G., et al. (2015). Caveolae control the antiinflammatory phenotype of senescent endothelial cells. *Aging Cell*, 14(1), 102–111. <https://doi.org/10.1111/ace1.12270>

Poyton, R. O., Ball, K. A., & Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.001>

- Pyenta PS, Holowka D, Baird B. Cross-correlation analysis of inner-leaflet-anchored green fluorescent protein coredistributed with IgE receptors and outer leaflet lipid raft components. *Biophys J* 2001 ; 80(5):2120-2132
- Radel C, Carlile-Klusacek M, Rizzo V. Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358(2):626-631
- Radel C, Rizzo V. Integrin transduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(2):H936-H945
- Rahal A., Kumar A., Singh V., et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*. 2014;2014:19. doi: 10.1155/2014/761264.761264
- Rai, P. (2012). Human Mut T Homolog 1 (MTH1): a roadblock for the tumor-suppressive effects of oncogenic RAS-induced ROS. *Small GTPases*, 3(2), 120–125. <https://doi.org/10.4161/sgtp.19556>
- Rai, P., Onder, T. T., Young, J. J., McFaline, J. L., Pang, B., Dedon, P. C., et al. (2009). Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), 169–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809834106>
- Rai, P., Young, J. J., Burton, D. G., Giribaldi, M. G., Onder, T. T., & Weinberg, R. A. (2011). Enhanced elimination of oxidized guanine nucleotides inhibits oncogenic RAS-induced DNA damage and premature senescence. *Oncogene*, 30(12), 1489–1496. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.520>
- Rakowicz-Szulczynska E. M., Rodeck U., Herlyn M., Koprowski H. (1986) Chromatin binding of epidermal growth factor, nerve growth factor, and platelet-derived growth factor in cells bearing the appropriate surface receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3728–3732
- Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, et al. Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization. *Acta Med Iran* 2018;28–33
- Razani B., Combs T. P., Wang X. B., Frank P. G., Park D. S., Russell R. G., Li M., Tang B., Jelicks L. A., Scherer P. E., Lisanti M. P. (2002) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277, 8635–8647
- Razani B., Lisanti M. P. (2001) Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest.* 108, 1553–1561
- Razani B., Zhang X. L., Bitzer M., von Gersdorff G., Bottinger E. P., Lisanti M. P. (2001) Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGFbeta type I receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 6727–6738
- Rezaeian L, Hosseini SE, Dianatpour M, Edalatmanesh MA, Tanideh N, Mogheiseh A, et al. Intrauterine xenotransplantation of human Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells into the liver of rabbit fetuses: a preliminary study for in vivo expression of the human liver genes. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21:89–96.
- Riley, P. A. (1994). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27–33.

- Rippon HJ, Bishop AE (2004) Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 37: 23-34
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A et al. (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3: 778-784
- Robbles. S. J., Buehler, P. W., Negrusz, A. and Adami, G. R. (1999) Permanent cell cycle arrest in asynchronously proliferating normal human fibroblasts treated with doxorubicin or etoposide but not camptothecin. *Biochem. Pharmacol.* 58: 675-685
- Roelen BA, Chuva De Sousa Lopes SM (2011) Origins of pluripotent stem cells. *Minerva Ginecol* 63: 351-363
- Roitenberg, N., Bejerano-Sagie, M., Boocholez, H., Moll, L., Marques, F. C., Golodetzki, L., et al. (2018). Modulation of caveolae by insulin/IGF-1 signaling regulates aging of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Reports*, 19(8). <https://doi.org/10.15252/embr.201745673>
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb 21;68(4):673-82
- Sadlik B, Jaroslowski G, Puzscharz M, Blasiak A, Oldak T, Gladysz D, et al. Cartilage repair in the knee using umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells embedded onto collagen scaffolding and implanted under dry arthroscopy. *Arthrosc Tech* 2018;7:e57-e63
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* 2014;28(2):99-114
- Sanguinetti AR, Co H, Corley Mastick C. Fyn is required for oxidative and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J* 2003; 376(Pt 1): 159-168
- Sanguinetti AR, Mastick CC. c-Abl is required for oxidative and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* 2003; 15(3):289-298
- Sanna E., Miotti S., Mazzi M., De Santis G., Canevari S., Tomassetti A. (2007) Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 313, 1307-1317
- Sano R., Annunziata I., Patterson A., Moshiah S., Gomero E., Opferman J., Forte M., d'Azzo A. (2009) GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.* 36, 500-511
- Sardar P, Guha P, Roy D, Bandyopadhyay D, Chatterjee SK (2011) "Multiple Sclerosis like Demyelination in Early HIV Infection-A Rare Presentation": Case Report and Literature Review. *J AIDS Clinic Res* 2: 124.
- Sart, S., Song, L., & Li, Y. (2015). Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 105135.
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M et al. Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(1):131-135
- Schlegel A, Arvan P, Lisanti MP. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Bio Chem* 2001; 276(6):4398-4408
- Schlegel A, Lisanti MP. A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275(28):21605-21617

- Schubert W., Frank P. G., Razani B., Park D. S., Chow C. W., Lisanti M. P. (2001) Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 48619– 48622
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW et al. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13726-13731
- Sharpless Ne, Depihno RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9)
- Sharpless Ne, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(7):397-408
- Sharpless Ne. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res.* 2005;576(1-2):22-38
- Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res.* 1991;196(1):33-39
- Shivshankar, P., Brampton, C., Miyasato, S., Kasper, M., Thannickal, V. J., & Le Saux, C. J. (2012). Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(1), 28–36. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0349OC>
- Shrihari TG (2011) Cancer Stem Cells - Therapeutic Boon! *J Cancer Sci Ther* 3: 197-200
- Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 146- 52.
- Sikora E, Mosieniak G, Sliwinska MA. Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells. *Curr Drug Targets.* 2016;17(4):377-387. doi:10.2174/1389450116666151019094724
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews* 2000; 1(1):31-39
- Simons K, Vaz. WL. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004; 33:269-295
- Singh V, Sinha RJ, Sankhwar SN, Mehrotra B, Ahmed N, et al. (2010) Squamous Cell Carcinoma of the Kidney – Rarity Redefined: Case Series with Review of Literature. *J Cancer Sci Ther* 2: 082-085.
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., & Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402–413
- Smart E. J., Ying Y. S., Conrad P. A., Anderson R. G. (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* 127, 1185–1197
- Sollazzo V, Palmieri A, Girardi A, Farinella F, Carinci F (2011) Trabecular Titanium Induces Osteoblastic Bone Marrow Stem Cells Differentiation. *J Biotechnol Biomaterial* 1: 102
- Sowa G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front Physiol.* 2012 Jan 6;2:120
- Stahlhut, M. and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11, 325-337

Stem Cell Transplantation. 2015. The Leukemia & Lymphoma Society. Available from: <https://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/stem-cell-transplantation>

Sun, C., Wang, N., Huang, J., Xin, J., Peng, F., Ren, Y., et al. (2009). Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C prevents bone marrow stromal cell senescence in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(2), 519–528

Sun, S., Cai, B., Li, Y., Su, W., Zhao, X., Gong, B., et al. (2019). HMGB1 and Caveolin-1 related to RPE cell senescence in age-related macular degeneration. *Aging (Albany NY)*, 11(13), 4323–4337. <https://doi.org/10.18632/aging.102039>

Suzuki, K., Mori, I., Nakayama, Y., Miyakoda, M., Kodama, S., and Watanabe, M. (201) Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat. Res.* 155: 248-253

Tagawa A, Mazzacasa A, Hayer A et al. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 2005; 170:769-779

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–76

Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26;271(4):2255- 61

Toshiharu Matsumura, Zenaida Zerrudo, Leonard Hayflick, Senescent Human Diploid Cells in Culture: Survival, DNA Synthesis and Morphology, *Journal of Gerontology* doi.org/10.1093/geronj/34.3.328

Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J., F., Pascal, T., Fripiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002) From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1415-1429

Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J., F., Pascal, T., Fripiat, C., Royer, V., Magalhaes, J. P., Zdanov, S. and Chainiaux, F. (2002) Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of in vivo occurrence. *Biogerontology* 3: 13-17

Uittenbogaard A, Smart EJ. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25595-25599

Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* 1998; 273(11):6525-6532

Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 2014;509(501):439-446

Vaziri H, Benchimol S. 1998. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8: 279–282.

Venema VJ, Zou R, Ju H et al. Caveolin-1 detergent solubility and association with endothelial nitric oxide synthase is modulated by tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(1):155-161

Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev* 2011;21:273–83

Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., et al. (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(11–12), 662– 671

Volonte, D., & Galbiati, F. (2009). Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Reports*, 10(12), 1334–1340

Volonte, D., & Galbiati, F. (2011). Polymerase I and transcript release factor (PTRF)/cavin-1 is a novel regulator of stress-induced premature senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 28657–28661

Volonte, D., Kahkonen, B., Shapiro, S., Di, Y., & Galbiati, F. (2009). Caveolin-1 expression is required for the development of pulmonary emphysema through activation of the ATM-p53-p21 pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5462– 5466

Volonte, D., Liu, Z., Musille, P. M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., Di, Y. P., et al. (2013). Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Molecular Biology of the Cell*, 24(12), 1852– 1862. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0666>

Volonte, D., Vyas, A. R., Chen, C., Dacic, S., Stabile, L. P., Kurland, B. F., et al. (2018). Caveolin-1 promotes the tumor suppressor properties of oncogene-induced cellular senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1794–1809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.815902>

Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P., & Galbiati, F. (2002). Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7), 2502–2517

Volonte, D., Zou, H., Bartholomew, J. N., Liu, Z., Morel, P. A., & Galbiati, F. (2015). Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6). *The Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 4202–4214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598268>

Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Jun;39(2):397-414. doi: 10.1007/s10555-020-09875-w. PMID: 32279119.

Wan W, Cao L, Kalionis B, Xia S, Tai X. Applications of induced pluripotent stem cells in studying the neurodegenerative diseases. *Stem Cells Int* 2015;2015:382530

Wang Q, Yang Q, Wang Z, Tong H, Ma L, Zhang Y, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:85–96

Wang, J., Bai, Y., Zhao, X., Ru, J., Kang, N., Tian, T., et al. (2018). oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae. *Bioscience Reports*, 38(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20180283>

Want, X., Wong, S. C., Pan, J., Tsao, S. W., Fung, K. H., Kwong, D. L., Sham, J. S. and Nicholls, J. M. (1998) Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer. Res.* 58: 5019-5022

Waterman RS, Betancourt AM (2011) Treating Chronic Pain with Mesenchymal Stem Cells: A Therapeutic Approach Worthy of Continued Investigation. *J Stem Cell Res Ther* S2: 001

- Minguell JJ, Pereira A, Bartholomew P and Lasala GP (2011) The Intrathecal Infusion of Mesenchymal Stem Cells into Healthy Rabbits is Safe and Devoid of Neurological or Clinical Complications. *J Stem Cell Res Ther* 1: 104
- Watson JD. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239: 197–201.
- Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 1995 Nov 27;376(1-2):108-12
- Wei, W, Ji, S. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol.* 2018; 233: 9121– 9135. doi.org/10.1002/jcp.26956
- Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008;26:2865–74
- Weissman IL (2004) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100: 157-168
- Wheaton, K., Sampsel, K., Boisvert, F. M., Davy, A., Robbins, S., & Riabowol, K. (2001). Loss of functional caveolae during senescence of human fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 187(2), 226–235.
- Woudenberg J., Rembacz K. P., van den Heuvel F. A., Woudenberg-Vrenken T. E., Buist-Homan M., Geuken M., Hoekstra M., Deelman L. E., Enrich C., Henning R. H., Moshage H., Faber K. N. (2010) Caveolin-1 is enriched in the peroxisomal membrane of rat hepatocytes. *Hepatology* 51, 1744–1753
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18: 173–179.
- Wu, C. C., Lin, J. C., Yang, S. C., Lin, C. W., Chen, J. J., Shih, J. Y., et al. (2008). Modulation of the expression of the invasion suppressor CRMP-1 by cyclooxygenase-2 inhibition via reciprocal regulation of Sp1 and C/EBPalpha. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(6), 1365–137
- Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1(5):445-458
- Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C et al. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(41):26962-26968
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., & Ishikawa, Y. (1998). Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26962–26968.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920
- Yu, D. M., Jung, S. H., An, H. T., Lee, S., Hong, J., Park, J. S., et al. (2017). Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*, 16(4), 773–784. <https://doi.org/10.1111/acer.12606>
- Zawia N. H., Lahiri D. K., Cardozo-Pelaez F. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;46(9):1241–1249. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.006.
- Zhang R, Chen W, Adams PD. 2007. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27: 2343–2358.

Zhang, J., Lazarenko, O. P., Blackburn, M. L., Badger, T. M., Ronis, M. J., & Chen, J. R. (2014). Soy protein isolate downregulates caveolin-1 expression to suppress osteoblastic cell senescence pathways. *The FASEB Journal*, 28(7), 3134–3145. <https://doi.org/10.1096/fj.13-243659>

Zhao Y, Haney MJ, Mahajan V, Reiner BC, Dunaevsky A, et al. (2011) Active Targeted Macrophage-mediated Delivery of Catalase to Affected Brain Regions in Models of Parkinson's Disease. *J Nanomedic Nanotechnol* S4: 003.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279:349–352

Εικόνες από το διαδίκτυο:

<http://137.82.50.68/dashboard.php?a=346&b=482&c=1>

<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/54/3/431/tab-figures-data>

<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/54/3/431/tab-figures-data>

<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/54/3/431/tab-figures-data>

<http://robinthomas.biz/so-what-causes-oxidative-stress-anyway/>

<http://www.hammiverse.com/lectures/16/4.html>

<https://dezian3.wixsite.com/regenerativemedicine>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452318619300364?via%3Dihub>

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-020-09875-w>

<https://rupress.org/jcb/article/217/1/65/39207/Senescence-and-aging-Causes-consequences-and>

<https://wildgenesgroup.files.wordpress.com/2015/01/telomere-final.jpg>

<https://www.eurekaselect.com/135864/article>

https://www.researchgate.net/figure/Fig-3-Typical-fibroblast-like-morphology-of-WJ-MSCs-expanded-in-vitro_fig3_275762336

<https://www.revistanefrologia.com/en-the-use-cell-cycle-arrest-articulo-S2013251418300877>