

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

---

---

**Весела Валентинова Лозанова**

**Ефекти на антиоксидантите върху  
каспазно-киназните регулаторни  
пътища при моделни клетъчни линии**

Дисертационен труд за присъждане на научна и  
образователна степен „доктор“

4. Природни науки, математика и информатика  
Професионално направление 4.3. Биологически науки  
Докторска програма БИОХИМИЯ

**Научен ръководител:**  
**Акад. Проф. Д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

София, 2019 г.

# СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения .....	3
ВЪВЕДЕНИЕ .....	6
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР .....	7
<i>Молекулни механизми на клетъчната смърт .....</i>	7
<i>Механизми и функции на клетъчното стареене.....</i>	11
<i>Мембранны липиди и клетъчна сигнализация .....</i>	22
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	28
<i>Цел .....</i>	28
<i>Задачи .....</i>	28
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	29
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	45
<i>Ефекти от третирането с ROCK инхибитора Y-27632 върху пролиферативния капацитет и активността на сенесценс-асоциираната бета галактозидаза при нормални и имортализирани човешки кератиноцити.....</i>	45
<i>Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс .....</i>	51
<i>Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, третирани с инхибитора Y27632, в хода на настъпване на репликативен сенесценс .....</i>	58
<i>Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани човешки кератиноцити .....</i>	60
<i>Western блот анализи .....</i>	63
<i>Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки кератиноцити .....</i>	67
<i>Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху генерирането на свободни радикали (ROS) при нормални човешки кератиноцити .....</i>	74
ИЗВОДИ.....	79
НАУЧНИ ПРИНОСИ.....	81
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	82
БИБЛИОГРАФИЯ.....	84

## Използвани съкращения

<b>ДАГ</b>	Диацилглицерол
<b>ПКС</b>	Програмирана клетъчна смърт
<b>РКС</b>	Регулирана клетъчна смърт
<b>СКС</b>	Случайна клетъчна смърт
<b>4EBP1</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
<b>53BP1</b>	TP53-binding protein 1 (p53-свързващ белтък 1)
<b>ABCA1</b>	ATP-binding cassette sub-family A member 1
<b>ACPs</b>	Alternative cationic patches („алтернативни катионни кръпки“)
<b>ADCD</b>	Autophagy-dependent cell death (автофагия-зависима клетъчна смърт)
<b>ANRIL</b>	Antisense non-coding RNA in the INK4 locus
<b>aSMase</b>	Acid sphingomyelinase (кисела сфингомиелиназа)
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated
<b>ATR</b>	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>Bcl-W</b>	Bcl-2-like protein 2
<b>Bcl-xL</b>	B-cell lymphoma-extra large
<b>BMI1</b>	Polycomb complex protein BMI-1
<b>BODIPY</b>	Boron dipyrromethene (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)
<b>BODIPY-SM</b>	BODIPY-Sphingomyelin (сфингомиелин, конюгиран с флуоресцентното багрило BODIPY)
<b>BRD4</b>	Bromodomain-containing protein 4
<b>c/EBP-β</b>	CCAAT-enhancer-binding protein β
<b>CBX7</b>	Chromobox protein homolog 7
<b>CCFs</b>	Cytoplasmic chromatin fragments (цитоплазмени хроматинови фрагменти)
<b>CCN1</b>	CCN family member 1
<b>CDC42</b>	Cell division control protein 42 homolog
<b>CDK2</b>	Cyclin-dependent kinase 2 (циклин –зависима киназа 2)
<b>CDK4</b>	Cyclin-dependent kinase 4 (циклин –зависима киназа 4)
<b>CDK6</b>	Cyclin-dependent kinase 6 (циклин –зависима киназа 6)
<b>cGAS</b>	Cyclic GMP-AMP synthase
<b>CHK</b>	Checkpoint kinase
<b>CXCR2</b>	C-X-C chemokine receptor type 2
<b>DAMPs</b>	Damage-associated molecular patterns
<b>DCF</b>	2',7'-dichlorofluorescein
<b>DCFDA</b>	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
<b>DDR</b>	DNA damage response
<b>DF-BSA</b>	Defatted bovine serum albumin (обезмаслен телешки серумен албумин)
<b>DHQ</b>	Dihydroquercetin (дихидрокверцитин)

<b>dNTPs</b>	Deoxyribonucleotides (дезоксирибонуклеотиди)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor (епидермален растежен фактор)
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor (Рецептор на епидермалния растежен фактор)
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases (кинази, регулирани от извънклетъчни сигнали)
<b>EZH2</b>	Histone-lysine-N-methyltransferase EZH2
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum (фетален телешки серум)
<b>GAPs</b>	GTPase-activating proteins (ГТФаза-активиращи белтъци)
<b>GATA4</b>	Transcription factor GATA4
<b>GEFs</b>	Guanine nucleotide exchange factors (фактори, обменящи гуаниновите нуклеотиди)
<b>GPCRs</b>	G-protein-coupled receptors (рецептори, свързани с G-белтъци)
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol (Гликофосфатидинозитол)
<b>HCC</b>	Hepatocellular carcinoma (хепатоцелуларен карцином)
<b>HP1</b>	Heterochromatin protein 1(хетерохроматинов белтък 1)
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase (пероксидаза от хрян)
<b>HSCs</b>	Hepatic stellate cells (чернодробни стелатни клетки)
<b>hTERT</b>	Telomerase reverse transcriptase (обратна транскриптаза на теломеразата)
<b>ICD</b>	Immunogenic cell death (имуногенна клетъчна смърт)
<b>IGFBP7</b>	Insulin-like growth factor-binding protein 7 (инсулин-подобен растежен фактор свързващ белтък 7)
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleukin-1 $\alpha$ (интерлевкин 1 $\alpha$ )
<b>IL-6</b>	Interleukin-6 (интерлевкин 6)
<b>IL-6R</b>	Interleukin-6 receptor (рецептор за интерлевкин-6)
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-3,4,5-triphosphate (Инозитол-3,4,5-трифосфат)
<b>JAG1</b>	Jagged-1
<b>JMJD3</b>	Jumonji domain-containing protein 3
<b>LAD</b>	Lamina-associated domain (ламина-свързан домен)
<b>LCDC</b>	Lysosome-dependent cell death (лизозомално-зависима клетъчна смърт)
<b>LMNB1</b>	Lamin-B1 (ламин B1)
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides (липополизахариди)
<b>LXR</b>	Liver X receptor (чернодробен X рецептор)
<b>MAPK/ERK</b>	Mitogen-activated protein kinases (митоген-активирани протеин кинази)
<b>MAPKAPK2</b>	MAP kinase-activated protein kinase 2
<b>MLL1</b>	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 1
<b>MPT</b>	Mitochondrial permeability transition
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response protein MyD88
<b>М<math>\beta</math>CD</b>	Methyl-beta-cyclodextrin (метил-бета-циклодекстрин)
<b>NAK</b>	Normal adult keratinocytes (нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид)
<b>NCCD</b>	Nomenclature Committee on Cell Death

<b>NF-κB</b>	Nuclear factor kappa B
<b>NOTCH</b>	Neurogenic locus notch homolog protein
<b>nSMase 1</b>	Neutral sphingomyelinase 1 (неутрална сфингомиелиназа 1)
<b>p14<sup>ARF</sup></b>	Tumor suppressor ARF (туморен супресор ARF)
<b>p15<sup>INK4b</sup></b>	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (инхибитор на циклин-зависимата киназа 4 B)
<b>p16<sup>INK4a</sup></b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (инхибитор на циклин-зависимите кинази 2A)
<b>p21<sup>CIP1</sup></b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (инхибитор на циклин зависимите кинази 1)
<b>PDGF-AA</b>	Platelet-derived growth factor AA (тромбоцитен растежен фактор AA)
<b>PET</b>	Positron emission tomography (позитронна емисионна томография)
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат)
<b>PRC1</b>	Polycomb repressive complex 1
<b>PRC2</b>	Polycomb repressive complex 2
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated fatty acids (полиненаситени мастни киселини)
<b>Q</b>	Quercetin (кверцитин)
<b>Rac1</b>	Ras-related C3-botulinum toxin substrate 1
<b>Rb</b>	Retinoblastoma-associated protein (ретинобластомен протеин)
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinases (Rho-свързани протеин кинази)
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species (реактивни форми на кислорода)
<b>RPLP0</b>	60S acidic ribosomal protein P0
<b>RT-qPCR</b>	Reverse transcription quantitative PCR
<b>SAHF</b>	Senescence-associated heterochromatic foci
<b>SASP</b>	Senescence-associated secretory phenotype (сенесценс-асоцииран секреторен фенотип)
<b>SAβGal</b>	Senescence-associated β-galactosidase (сенесценс-асоциирана β-галактозидаза)
<b>SH2 domain</b>	Src2 homology domain
<b>SMS</b>	Senescence-messaging secretome
<b>SMS2</b>	Sphingomyelin synthase 2 (сфингомиелин синтаза 2)
<b>SNARE</b>	SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptors
<b>STING</b>	Stimulator of interferon genes
<b>TASCC</b>	TOR-autophagy spatial coupling compartment
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor β (трансформиращ растежен фактор β)
<b>TLR</b>	Toll-like receptor (Toll-подобен рецептор)
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis factor α (туморен некрозисен фактор α)
<b>TRAF6</b>	TNF receptor-associated factor 6 (TNF рецептор-свързан фактор 6)
<b>TWIST1</b>	Twist-related protein 1
<b>ZFP36L1</b>	mRNA decay activator protein ZFP36L1 (Zinc finger protein 36, C3H1 type-like 1)
<b>ZRF1</b>	Zuotin-related factor 1

## ВЪВЕДЕНИЕ

Каспазно-киназните регулаторни пътища представляват едни от най-основните регулаторни пътища в клетките на бозайниците и човека и имат отношение към редица физиологични и патофизиологични процеси. От изключително значение е участието на каспазни и киназни ензими както в регулацията, така и в осъществяването на разнообразните програми, отговорни за индукцията и прогресията на програмираната клетъчна смърт, а също така и за процесите на клетъчно стареене и крайна диференциация.

Клетъчното стареене или сенесценс представлява стабилен арест в клетъчния цикъл, наблюдаван за пръв път при клетки, намиращи се в условията на клетъчна култура, който впоследствие е установен и *in vivo*. Въпреки че молекулните механизми, контролиращи избора на клетката между регулирана клетъчна смърт и сенесценс не са напълно изяснени, е добре известно, че по време на ембрионалното развитие процесите на клетъчно стареене и на апоптоза могат, при определени условия, да бъдат взаимнозаменяеми и да компенсират недостатъци или дефекти в някоя от двете клетъчни програми. Старееенето по време на следембрионалното развитие доскоро не е било обект на задълбочени изследвания, поради което наличната информация в научната литература е ограничена. Сенесценсът на нормални човешки кератиноцити, поставени в условията на монокултура също не е бил обект на задълбочени изследвания и наличната информация в научната литература е крайно недостатъчна.

В последните години изследванията на липидния състав и структура на биологичните мембрани привлякоха вниманието на научната общност, главно заради установяването на връзка между динамичния състав и структура на липидните домени в плазмената мембрана и процесите на клетъчна сигнализация, както при нормални физиологични условия, така и при патологични състояния. Един от основните проблеми и следователно важно предизвикателство при разгадаването на структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални кератиноцити е нейната сложна архитектура и технологичните ограничения на наличните методологии за визуализация на липидните рафтове.

В последните няколко години интереса на научната общност е насочен към разкриването на молекулните механизми на клетъчното стареене в контекста на нормалната физиология на организма с цел модулирането на тези механизми и/или на тяхната регулация да бъдат използвани за разработването на терапии за свързани с възрастта заболявания, включително и голям брой от невродегенеративните заболявания, а също така и за забавяне на физиологичното стареене на организма.

Природните продукти, включително и антиоксидантните съединения, представляват интерес при разработването на разнообразни терапевтични стратегии, както за повлияване на патофизиологични процеси, а също така и като модулатори на различни физиологични процеси, включително и на процесите на клетъчна смърт и стареене. Едни от най-широко разпространените в природата представители на групата на флавоноидите са кверцитина и дихидрокверцитина, чиито ефекти върху нормални човешки кератиноцити не са били обект на задълбочени научни изследвания.

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### *Молекулни механизми на клетъчната смърт*

Дълго време клетъчната смърт е отхвърляна от биолозите като неизбежно и следователно лъжливо следствие от клетъчния живот. Голямото количество експериментални доказателства, натрупани през последните десетилетия, обаче разкри и охарактеризира още по-детайлно набор от генетично уобсловени механизми за насочено елиминиране на излишни, необратимо увредени и/или потенциално вредни клетки [1, 2]. Любопитно е, че регулираната клетъчна смърт (РКС) не е уникална за многоклетъчните форми на живот, при които има очевидно предимство при хомеостазата на организма, както при физиологични, така и при патологични условия [3, 4], но също така е установена (в по-прости варианти) сред едноклетъчни еукариоти, които живеят (поне през някаква част от жизнения си цикъл) под формата на колонии (каквито са някои видове дрожди и *Dictyostelium discoideum*) [5] и при някои прокариоти (напр. *E. coli*) [6]. За разлика от случайната клетъчна смърт (СКС), която представлява внезапно и катастрофално изчезване на клетки, изложени на действието на силни атаки с физична (напр. високо налягане, температура или осмотични сили), химическа (напр. силно изменение на рН) или механична (напр. сили на опън) природа, РКС се основава на специална молекулна машинария, което означава че може да бъде модулирана (т.е. забавяна или ускорявана) чрез фармакологични или генетични манипулации [3, 7].

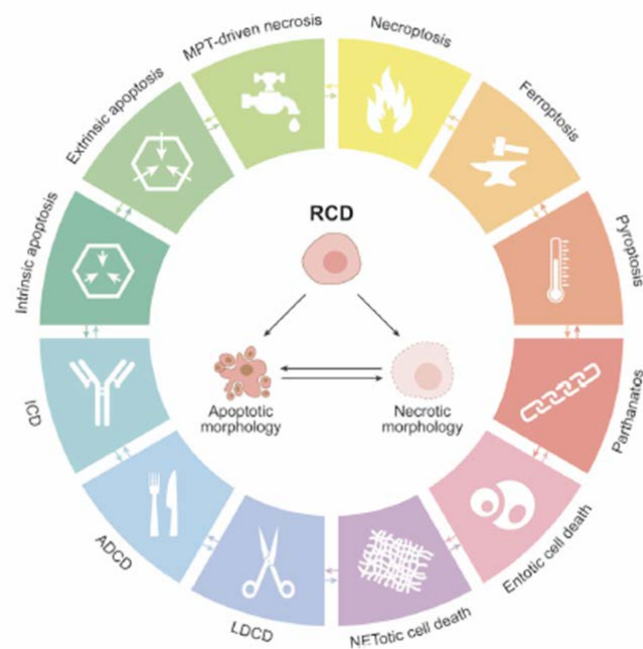
Въпреки че основните механизми проявяват значително припокриване, РКС е въввлечена в два диаметрално противоположни сценария. От една страна, РКС може да настъпи при отсъствието на каквото и да е екзогенно нарушение в заобикалящата среда, следователно действайки като вграден ефектор при физиологични програми, свързани с развитието или обмяната на тъканите [4, 8]. Тези изцяло физиологични форми на РКС обикновено се означават като програмирана клетъчна смърт (ПКС). От друга страна, РКС може да възниква в резултат на нарушения във вътреклетъчната или извънклетъчната среда, когато тези нарушения са прекалено интензивни или продължителни за адаптивен отговор, който да се справи със стреса и да възстанови клетъчната хомеостаза [3]. Стрес-предизвикваната РКС също представлява стратегия за запазването на биологичното равновесие, следователно наподобява адаптивния стресов отговор. Обаче, докато адаптивните стресови отговори действат на клетъчно ниво (което в по-широк смисъл промотира поддържането и хомеостазата на равнището на организма или колонията), РКС действа директно на нивото на организма или колонията независимо от клетъчната хомеостаза [3]. Подобна хомеостатична функция не само отразява елиминирането на иначе потенциално опасни клетки, но също така демонстрира способността на умиращите клетки да се излагат или отделят молекули, които предупреждават организма или колонията за потенциалната опасност. Подобни сигнали за опасност обикновено се означават като свързани с увреждане молекулни модели (damage-associated molecular patterns, DAMPs) или алармини [9, 10].

Клетъчната смърт се проявява чрез макроскопични морфологични изменения. Заедно с механизмите, чрез които мъртвите клетки и техните фрагменти се

унищожават, подобни морфотипове исторически са били използвани и за подразделянето на клетъчната смърт на три различни форми: (1) тип I клетъчна смърт или апоптоза, която се проявява със свиване на цитоплазмата, кондензация на хроматина (пикнозис), фрагментация на ядрото (кариорексис) и пъпкуване на плазмената мембрана, които завършват с образуването на очевидно интактни малки везикули (общоизвестни като апоптотични телца), ефикасно поемани и разграждани в лизозомите на съседни клетки с фагоцитна активност; (2) тип II клетъчна смърт или автофагия, която се проявява с интензивна вакуолизация на цитоплазмата и подобно завършва с фагоцитоза и последващо лизозомално разграждане; (3) тип III клетъчна смърт или некроза, която не проявява характерните черти на тип I и тип II клетъчната смърт и завършва с изхвърлянето на клетъчните тела при отсъствието на фагоцитно и лизозомално участие [11]. Трябва да се отбележи, че тази морфологична класификация все още се използва интензивно, независимо от множеството ограничения и условности. От 2005 Номенклатурния комитет за клетъчната смърт (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) се събира регулярно, (1) за да говори за проблемите, свързани с използването на номенклатурата за клетъчна смърт, базирана на морфологични признаци; (2) за да дефинира точно основните начини за клетъчна смърт на генетично, биохимично, фармакологично и функционално (а не морфологично) ниво; (3) за да различи съществените (причинни) от спомагателните (корелативни) черти на процеса на клетъчна смърт; и (4) за да идентифицира консенсусните критерии за идентифицирането на мъртви клетки с необратима пермеабилзация на плазмената мембрана или цялостна фрагментация на клетката [7, 12, 13].

Тъй като областта продължава да се развива и нови сигнални пътища, чрез които се осъществява РКС продължават да се характеризират, предложената актуализирана класификация на начините за клетъчна смърт, фокусирана върху молекулните и съществените аспекти на процеса включва 12 различни механизми на осъществяване на клетъчната смърт. Главният фокус при тази класификация е върху сигнално-трансдукционните модули, участващи при инициацията, изпълнението и разпространението на клетъчната смърт, а също така и върху патофизиологичното значение на всеки от основните типове РКС.





**Фигура 1. Основни програми, отговорни за клетъчната смърт [14].**

Идентифицираните към момента молекулни механизми на клетъчната смърт (*фигура 1*) включват вътрешна и външна апоптоза, MPT (mitochondrial permeability transition)-зависима некроза, некроптоза, фероптоза, пироптоза, партанатос, ентотична клетъчна смърт, NET (neutrophil extracellular traps)-отична клетъчна смърт, лизозомално-зависима клетъчна смърт (LDCD), автофагия-зависима клетъчна смърт (ADCD) и имуногенна клетъчна смърт (ICD), като при първоначалното класифициране на процесите на клетъчна смърт са включвани и нелетални процеси като клетъчно стареене (сенесценс), митотична катастрофа и крайна диференциация на клетките [14].

Регулираната клетъчна смърт играе главна роля при развитието, тъканната хомеостаза, възпалението, имунитета и много патофизиологични състояния. От една страна, регулираната клетъчна смърт представлява основна етиологична детерминанта при заболявания, свързани с необратима загуба на пост-митотични тъкани (напр. миокарден инфаркт, невродегенерация) [15-18]. От друга страна дефекти в сигналните каскади, които предизвикват регулирана клетъчна смърт са свързани и с патологии, характеризиращи се с неконтролирана експанзия или натрупване на клетки (напр. някои автоимунни заболявания, ракови заболявания) [19-22]. Поради това, регулираната клетъчна смърт изпъква като основна терапевтична мишена за манипулиране при множество заболявания при човека [1, 23, 24].

През последните две десетилетия огромни усилия са били положени за разработването на цитопротективни стратегии, които имат за цел нарушаване на сигнализацията, свързана с регулираната клетъчна смърт, след иницирането на процеса (клинично-значим сценарий при повечето исхемични заболявания) [25, 26], с относително заблуждаващи резултати (независимо от множеството клинични изпитвания, нито едно лекарство основано на тази концепция не е било одобрено от съответните регулаторни агенции за хуманна употреба) [27]. От друга страна, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) инхибитора венетоклакс (Venetoclax) в момента се използва при

терапията на пациенти с хронична лимфоцитна левкимия, при които конвенционалната терапия не е била от полза [28], а няколко други молекули с подобен механизъм на действие в момента са в процес на клинично разработване. Това поставя въпроса защо специфичното активиране на регулирана клетъчна смърт (без да се повлияват нормалните клетъчни функции) изглежда като много по-проста клинична цел, отколкото инхибирането на РКС.

Въпреки потенциалните проблеми, свързани с фармакокинетиката и фармакодинамиката на тестваните до момента съединения, това противоречие вероятно отразява контрола на регулираната клетъчна смърт при бозайниците (който започна да изпъква в последно време) [29-31]. Поради това, докато променянето на баланса в посока към регулирана клетъчна смърт изглежда, че е относително лесна задача, нейното блокиране след като е премината слабо дефинирана крайна точка, може да изисква едновременното инхибиране на няколко сигнално-трансдукционни модула и следователно може да бъде трудно за постигане. Освен това, научната общност дълго време се е фокусирала върху специфични ензими, за които се смята че имат ключова причинна роля в изпълнението на регулираната клетъчна смърт, но в основната част от сценариите изглежда, че само ускоряват (а не предизвикват) смъртта на клетката (напр. каспазите) [7, 29]. Несъмнено, клетъчната смърт във всичките ѝ форми (включително острата клетъчна смърт) в края на краищата е свързана с биоенергитична и редокс криза, която може да представлява нейната истинска причина [7, 29]. При този сценарий, истинска цитопротекция може да бъде постигната само чрез интервенции, които се противопоставят на подобни кризи или на причините (а не на вторичното явление) за това. Интересното е, че едно от най-бързите последствия от потенциално летално лишаване от АТФ при *D. discoideum* е рязката дизорганизация на ядърцето, съчетана с необратимо блокиране на синтеза на рибозомална РНК и на ДНК. Подобен процес също така е наблюдаван при бозайници и при растения, предразположени към множество форми на регулирана клетъчна смърт, което вероятно предполага, че ядърцевия стрес играе ключова роля в изпълнението на регулирана клетъчна смърт при различните видове [32]. Тази възможност, обаче, остава да бъде официално изследвана.

Съвсем наскоро стана ясно, че модалността посредством която отделната клетка се поддава на стреса може да има основно влияние върху това как регулираната клетъчна смърт повлиява локалната и системната микросреда [33, 34]. Това разкрива изцяло нова терапевтична перспектива в областта, която включва два основни подхода: (1) разработването на подходи, насочени към превключването на типа регулирана клетъчна смърт, а не към повишаването или ограничаването на честота на възникване на регулирана клетъчна смърт (което може да бъде проблематично и в двете посоки) [35, 36] и (2) разработването на агенти, които пречат на DAMPs или регулират DAMP-зависимите сигнални пътища [9, 37, 38]. В този контекст, острата клетъчна смърт също може да представлява терапевтична мишена. Несъмнено, въпреки че острата клетъчна смърт настъпва в ограничен брой заболявания при човека (напр. травма, тежки изгаряния) и не може да бъде фармакологично инхибирана (по дефиниция), молекулите, отделяни от клетките, претърпяващи остра клетъчна смърт, може да бъдат блокирани (поне на теория) от специфични интервенции и това може да има положително влияние върху дългосрочния резултат от заболяването [10, 39, 40]. Тези

наблюдения показват сложността на насочването към първична регулирана или остра клетъчна смърт (смъртта на клетки, подаващи се на първични нарушения в средата), вторична регулирана клетъчна смърт (смъртта на клетки, подаващи се на установяващите се условия на средата, пряко или непряко, на съседни клетки, претърпяващи първична регулирана или остра клетъчна смърт) и задвижвана от регулираната или острата клетъчна смърт DAMP сигнализация за терапевтични цели [41].

Насочването към регулираната клетъчна смърт е многообещаващо при терапията на няколко заболявания при човека и значителни усилия се полагат за създаването на модулатори на регулираната клетъчна смърт за клинични цели, но допълнителни изследвания са необходими за създаването на най-ефективните стратегии в тази насока.

### ***Механизми и функции на клетъчното стареене***

Клетъчното стареене, наричано още и сенесценс, първоначално е било идентифицирано при култивирани фибробласти [42, 43] и дълго време се е смятало, че е характерно за клетки, отглеждани в условията на клетъчна култура. Впоследствие се е оказало, че сенесценс настъпва и в клетките на многоклетъчните организми, при които играе важна роля както по време на ембрионалното развитие, а също така по време на живота на възрастните индивиди [44]. В момента клетъчното стареене се смята за стресов отговор, индуциран от голям брой ендогенни и екзогенни увреждания, включително активиране на онкогени, оксидативен и генотоксичен стрес, митохондриална дисфункция, облъчване и третиране с химиотерапевтични агенти [45].

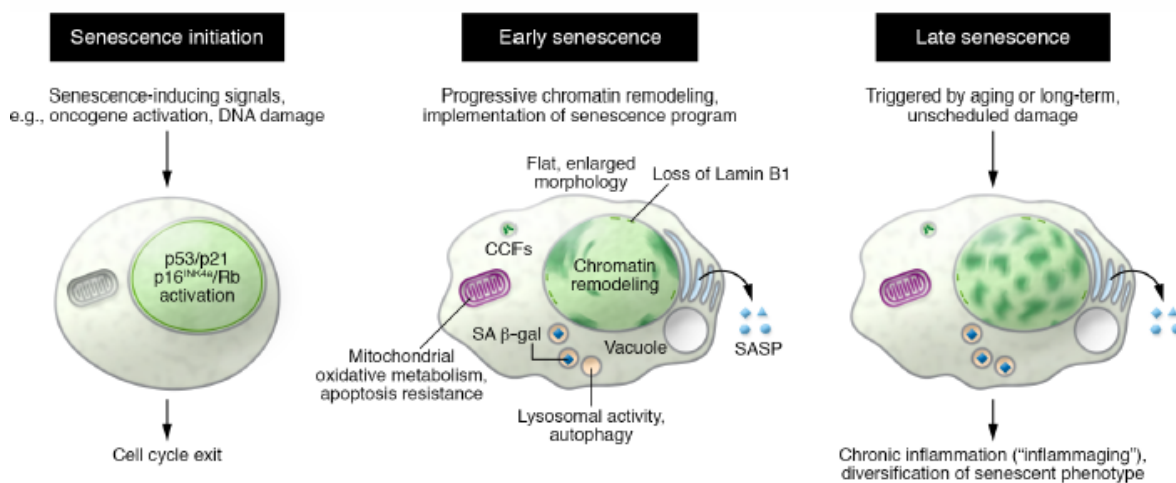
### ***Физиологични роли на клетъчното стареене***

Клетъчното стареене дълго време беше смятано за феномен, характерен за клетъчните и тъканни култури и поради това не беше обект на задълбочени научни изследвания. Впоследствие обаче се натрупаха данни, че сенесценса е важен за ембрионалното развитие на организма [46], за поддържането на тъканната хомеостаза при възрастните индивиди, за зарастването на рани [47], но също така представлява и мощен противораков механизъм, който е способен да предотврати развитието на злокачествени образувания като ограничава репликацията на пренеопластни клетки [48].

Връзката между сенесценса и свързаните със стареенето патологии също стана все по-ясна [49, 50] и е обект на задълбочени научни изследвания.

Клетъчното стареене традиционно е смятано за дефинирана, статична клетъчна съдба, но впоследствие е установено, че в основата му стои динамичен многостъпален процес [49]. Съгласно опростеният модел на клетъчното стареене (*фигура 2*) първоначалния сенесценс-индуциращ сигнал е достатъчен, за да се предизвика излизането на клетката от клетъчния цикъл, но това е само начална стъпка от сенесцентната програма. Сенесцентните клетки прогресивно ремоделират своя хроматин и започват да проявяват и други черти на сенесцентната програма, например отделяне на компоненти на сенесценс-асоциирания секреторен фенотип (SASP) преди да навлязат във втората стъпка от процеса, означавана и като „пълнен сенесценс“. Ако сенесцентните клетки не бъдат отстранени и продължат да съществуват за

продължителен период от време, те продължават да еволюират и навлизат в третата стъпка на процеса, означавана като „късен сенесценс“. Именно концепцията за сенесцентна прогресия би могла да обясни хетерогенността на сенесцентните клетки и свързаните с тях фенотипове, наблюдавана *in vivo*. Сенесцентните отговори, наблюдавани *in vivo*, допълнително могат да бъдат подразделени на два типа: остро и хронично клетъчно стареене. Острото клетъчно стареене представлява програмиран процес, иницииран в отговор на определени стресори и характеризира се с бърза кинетика, като нормално то допринася за поддържането на тъканната хомеостаза. За разлика от него, хроничното клетъчно стареене е резултат от продължително нерегулярно увреждане на клетките и по-често се асоциира с вредни процеси като стареенето. Само при хроничното клетъчно стареене могат да бъдат установени и клетки, навлезли в състояние на „късен сенесценс“ [51].



**Фигура 2. Фенотипни характеристики на сенесцентните клетки [51].**

### Характерни черти на сенесцентните клетки

Едно от характерните особености на сенесцентните клетки е стабилния арест в клетъчния цикъл, който се контролира от активирането на тумор-супресорните пътища p53/p21<sup>CIP1</sup> и p16<sup>INK4a</sup>/Rb. За разлика от клетките, намиращи се в латентно състояние, сенесцентните клетки са неспособни да реагират на стимулация от митогени или растежни фактори и следователно са неспособни да навлязат обратно в клетъчния цикъл, дори и при условия, които са благоприятни за клетъчното развитие. Сенесцентните клетки също така се различават и от крайно диференцираните клетки, които също са необратимо отстранени от клетъчния цикъл. Докато крайната диференциация на клетката възниква в резултат на специализирана програма за развитие, превръщаща недиференцирани прекурсорни клетки в специализирани ефекторни клетки, то клетъчното стареене възниква главно като клетъчен стресов отговор. Въпреки това е установено, че някои крайно диференцирани клетки като неврони, адипоцити и хепатоцити са способни да претърпят процес на клетъчно стареене или поне да проявят сенесценс-подобни черти по време на стареенето на организма или в отговор на онкогенна активация или увреждане на ДНК [52, 53]. Последните наблюдения именно демонстрират, че клетъчното стареене може да е

независимо от активен арест в клетъчния цикъл и може да се наблюдава и при крайно диференцирани клетки.

Сенесцентният арест в развитието често се предизвиква от продължително активиране на системата за отговор на увреждания в ДНК (DNA damage response или DDR), която се активира под действие на вътреклетъчни (окислително увреждане, скъсяване на теломерите, хиперпролиферация) или външни фактори (ултравиолетова и гама радиация, химиотерапевтични агенти) [54]. Независимо от механизма, който предизвиква увреждането на ДНК, DDR се характеризира с натрупване на фосфорилиран при Ser139 хистон H2AX ( $\gamma$ -H2Ax) и на p53-свързващия протеин 1 (53BP1) в хроматина, както и активиране на киназна каскада, включваща неспецифичните серин/треонин кинази ATM (Ataxia telangiectasia mutated) и ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) и впоследствие на checkpoint киназите CHK1 и CHK2, което евентуално води до активиране на сигналната ос p53/p21<sup>CIP1</sup> [54, 55]. Независимо от важната роля на DDR системата при инициацията на клетъчното стареене, голяма част от маркерите за DDR са с ограничено приложение при идентифицирането и охарактеризирането на сенесцентни клетки *in vivo*, което се дължи и на факта, че повечето клетки, експресиращи тези маркери *in vivo* всъщност се намират в състояние на временен арест в клетъчния цикъл и отговарят на временно, поправимо увреждане на ДНК.

Арестът в развитието, характерен за клетъчното стареене, се осъществява посредством активиране на тумор-супресорните каскади, включващи белтъците p53 и p16<sup>INK4a</sup>/Rb [56]. Вероятно най-важната функция на p53 при клетъчното стареене е индукцията на транскрипцията на инхибитора на циклин-зависимите кинази p21<sup>CIP1</sup>, който от своя страна блокира активност на циклин-зависимата киназа 2 (CDK2), водейки до хипофосфорилиране на ретинобластомния протеин (Rb) и излизане на клетката от клетъчния цикъл [54]. Поради това, често нарушения в сигнализацията през p53 по различен начин интерферират с настъпването на сенесцентно състояние [57].

Ако сенесценс-индуциращият стресор действа временно, индукцията на p53 може да доведе до възникването на латентно състояние и активиране на системите за поправка на ДНК, като след премахването на действието на стресора, клетките могат да възстановят клетъчния си цикъл [50]. Продължителното действие на стресора или възникването на допълнителни сигнали може да доведе до активиране на друг инхибитор на циклин зависимите кинази – p16<sup>INK4a</sup>, който въздейства специфично върху CDK4 и CDK6 и допринася за продължителния арест на клетката [58]. Предполага се, че ролята на p21<sup>CIP1</sup> е ограничена до иницирането на клетъчното стареене, докато p16<sup>INK4a</sup> е необходим за поддържането на устойчив арест в развитието, което предполага наличието на различно регулирани фази при процеса на клетъчно стареене. В подкрепа на тази хипотеза, е установено, че индукцията на p21<sup>CIP1</sup> е от значението за инициацията на сенесценс, а експресията на белтъка не е задължително да се запази при сенесцентните клетки [59]. Стимулирането на p21<sup>CIP1</sup> (но не и на p53 или p16<sup>INK4a</sup>) задвижва клетъчното стареене, свързано с развитието, което представлява „програмиран“ тип сенесценс, настъпващ по време на ембрионалното развитие на бозайниците [46, 60]. Въпреки, че p21<sup>CIP1</sup> може успешно да се използва като сенесцентен маркер при определени контексти, този белтък може да бъде индуциран и

в отговор на временен арест в клетъчния цикъл или в отговор на поправимо увреждане на ДНК, поради което е необходимо да се комбинира с други, по-надежни сенесцентни маркери.

Генният locus *INK4/ARF* кодира три туморни супресора:  $p14^{ARF}$  ( $p19^{ARF}$  при мишката) и  $p16^{INK4a}$ , които се кодират от гена *CDKN2A* и  $p15^{INK4b}$ , който се кодира от гена *CDKN2B* [61]. Както  $p16^{INK4a}$ , така и  $p19^{ARF}$  играят ключови роли при поддържането на сенесцентния арест в развитието.  $p16^{INK4a}$  селективно инхибира CDK4 и CDK6, докато  $p19^{ARF}$  възпрепятства разграждането на p53. Мутации, които водят до загуба на функциите на  $p16^{INK4a}$  са сред най-често откриваните при злокачествени образувания при човека [62], което предполага, че загубата на този туморен супресор позволява на клетката да избегне сенесценса и благоприятства туморната прогресия.

Функционалното значение на locus *INK4/ARF* е насочило значителни усилия към разбирането на неговата регулация. При нормални клетки locus *INK4/ARF* е заглушен от Polycomb репресивните комплекси PRC1 и PRC2. Поради това, нарушаването на компоненти на PRC1 или PRC2 като CBX7 (Chromobox protein homolog 7), BMI1 (Polycomb complex protein BMI-1) и EZH2 (Histone-lysine-N-methyltransferase EZH2) и последващата загуба на репресивния маркер триметилиран хистон H3K27 и/или на PRC1 от locus *INK4/ARF* са достатъчни за активирането на  $p16^{INK4a}$  и индукция на клетъчно стареене [63]. Епигенетичната регулация на locus *INK4/ARF* обаче се простира отвъд Polycomb белтъците. Други епигенетични регулатори като MLL1 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 1), JMJD3 (Jumonji domain-containing protein 3) и ZRF1 (Zuotin-related factor 1) също участват в регулацията на locus [64]. Как привличането и изместването на Polycomb комплексите и на други епигенетични компоненти към locus *INK4/ARF* се контролира все още не е напълно изяснено, но предложения модел е, че взаимодействие с транскрипционни фактори (например TWIST1 (Twist-related protein 1) или транскрипционни фактори от homeobox семейството) и дълги междугенни некодиращи РНК (например ANRIL) може би диктуват специфичността на събиране на комплексите [65]. От друга страна е възможно сенесценс-зависимата транскрипционна регулация на някои от тези хроматинови модификатори, като JMJD3 или EZH2, да задвижва активацията на locus.

$p16^{INK4a}$  се откроява като един от най-специфичните маркери на сенесценса *in vivo* [66], което допълнително подчертава функционалното му значение. Докато експресията на  $p16^{INK4a}$  почти не се детектира при здрави млади индивиди, то тя значително се повишава по време на туморигенезата и при стареене. Този факт е установен в резултат на комбинирането на експресионни анализи и миши модели, чрез които е изучавана функцията на  $p16^{INK4a}$  [67, 68]. Например, групата на Sharpless установява експоненциално повишаване на експресията на  $p16^{INK4a}$  по време на стареенето, но активността му не корелира със смъртността, а предвижда раковата инициация с по-голяма чувствителност отколкото поемането на глюкоза (определено чрез флуороредоксиглюкоза-РЕТ) [68].

Наскоро бяха създадени и миши модели, при които  $p16^{INK4a}$ -позитивните клетки могат да бъдат селективно елиминирани на база на експресията на индуцируеми самоубийствени гени, които се намират под контрола на  $p16^{INK4a}$  регулаторни елементи

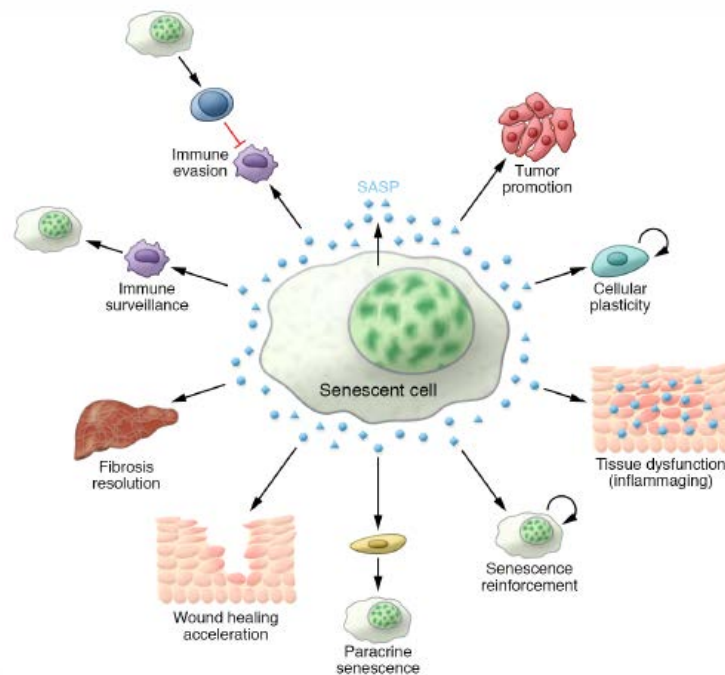
[69]. Тези модели послужиха за недвусмисленото установяване на причинните роли на сенесцентите клетки при стареенето, свързаните с възрастта заболявания, зарастването на рани и терапията на ракови заболявания.

Независимо от явните ползи от използването на активацията на p16<sup>INK4a</sup> като средство за изясняването на ролята на сенесценса в патофизиологията, неговото използване като *in vivo* маркер за клетъчното стареене има и своите ограничения. Първо, *in vitro* са установени форми на p16<sup>INK4a</sup>-независимо клетъчно стареене. Освен това, p16<sup>INK4a</sup> може да се експресира и от несенесцентни клетки (например ракови клетки, при които туморния супресор Rb е инактивиран) и не е изяснено доколко експресията на p16<sup>INK4a</sup> при макрофаги или лимфоцити предполага сенесцентен фенотип или друга клетъчна съдба (диференциация или клетъчно изтощаване) [59]. Освен това наличните антитела, насочени срещу p16<sup>INK4a</sup>, са не са особено подходящи за детекцията на белтъка при миши тъкани.

Въпреки че клетъчното стареене първоначално е смятано за клетъчно-автономна (вътреклетъчна) програма, се увеличават доказателствата в подкрепа на това, че сенесцентните клетки имат способността да сигнализират и повлияят заобикалящата ги среда. Сенесцентните клетки продуцират сложна смес от разтворими и неразтворими фактори, обобщено означавани като сенесценс-асоцииран секреторен фенотип (SASP) или сенесценс-съобщаващ секретом (senescence-messaging secretome, SMS) [70, 71]. SASP е общия термин, даден на комбинацията от цитокини, хемокини, протеази от извънклетъчния матрикс, растежни фактори и други сигнални молекули, които се секретират от стареещите клетки, като неговия специфичен състав варира в зависимост от клетъчния тип и от индуктора на сенесцентния отговор. Също така функциите на SASP или поне на част от неговите компоненти може да са разнообразни и зависят не само от природата на SASP, но също така и от заобикалящата среда и генетичния контекст на клетките, които са изложени на действието на сенесцентния секретом. SASP е най-добре изучения механизъм, посредством който сенесцентните клетки повлияват своите съседи, но не е единствения. Например, някои сенесцентни клетки могат да сигнализират и повлияват съседните си клетки чрез контакт-зависима NOTCH/JAG1 сигнализация [72], продукцията на свободни кислородни радикали [73] или посредством преноса на молекули, осъществяващ се чрез формиране на цитоплазмени мостове [74] или чрез отделяне на екзозоми [75].

Сенесценс-асоциираният секреторен фенотип (SASP) може да има както благоприятни, така и вредни ефекти (*фигура 3*) като при дадени условия ефектите му обикновено са плейотропни. Например *in vitro* SASP засилва сенесцентния арест в развитието като създава положителна автокринна обратна връзка. Несъмнено при нокдаун на рецептора за интерлевкин-6 (IL-6R), на инсулин-подобния растежен фактор свързващ белтък 7 (IGFBP7) или на C-X-C хемокиновия рецептор тип 2 (CXCR2), представляващ рецептор за IL-8 и свързаните с него хемокини, се предотвратява клетъчното стареене [76-78]. Тази автокринна бримка също така допринася за тумор-супресорната функция на клетъчното стареене. Интересно е, че SASP може да индуцира сенесценс при немалигнени пролифериращи клетки, намиращи се в съседство със сенесцентните клетки (т.нар. паракринен сенесценс) [73, 79]. Това предполага, че сенесцентните клетки също могат да усилят антитуморния отговор като ограничават

пролиферацията на близкоразположени клетки, които са били изложени на действието на подобни стресори.



**Фигура 3. Сенесценс-асоцииран секреторен фенотип (SASP) като важен медиатор на патофизиологичните функции на сенесцентните клетки [51].**

Сенесцентният секретом същевременно може и да промотира туморигенезата. Всъщност SASP има важна про-инфламаторна природа и възпалителните медиатори са мощни двигатели на туморната прогресия. Ранни изследвания показват, че SASP на сенесцентни фибробласти може да промотира пролиферацията и появата на метастатични черти при предмалигнени епителиални клетки или да повишава туморната васкуларизация при ксенографни транспланти [80]. Наскоро с помощта на модели, наподобяващи ракови образувания при човека, беше изследвана протуморигенната роля на SASP. Например SASP на сенесцентни чернодробни стелатни клетки промотира пролиферацията и злокачествената трансформация на заобикалящите ги хепатоцити при затлъстели мишки, третирани с химически канцерогени [81]. Интересното е, че сенесцентният секретом опосредства и вредните ефекти на сенесцентните клетки, натрупващи се *in vivo* в резултат на химиотерапия, като елиминирането на сенесцентните клетки в този контекст възпрепятства рецидивирването на туморите [82].

Взаимодействието между SASP и имунния отговор също е комплексно. От една страна се смята, че SASP може първоначално да се е развил като начин да се привлекат клетки на имунната система с цел елиминиране на сенесцентните клетки. Наистина по време на раковата инициация SASP-зависимото привличане на Th1 клетки, NK (natural killer) клетки и макрофаги е от съществено значение за елиминирането на зараждащи се преднеопластни клетки и предотвратява прогресията при хепатоцелуларен карцином (HCC) [83, 84]. От друга страна SASP може да има и имunosупресивни свойства [85]. Установено е, че когато предмалигнени сенесцентни хепатоцити съществуват



съвместно с чернодробни ракови клетки, SASP-зависимото привличане на незрели миелоидни клетки може да промотира раковата прогресия като нарушава функциите на NK клетките, което от своя страна предполага многостранно взаимодействие между SASP, имунните и раковите клетки.

SASP също така е свързан със стареенето и свързаните с възрастта заболявания. Ниските нива на хронично възпаление (наричано още „стерилно възпаление“ или “inflammaging”) стоят в основата на множество свързани с възрастта патологии [86], като SASP може да обясни, поне частично, това локално възпаление, наблюдавано в рамките на тъканите. Наистина елиминирването на сенесцентни клетки води до намаляване на нивата на проинфламаторни цитокини като IL-6, IL-1 $\alpha$  и TNF- $\alpha$  в мастната тъкан, бъбреците и скелетните мускули на възрастни мишки [87, 88], но доколко е приложимо това подтискане на възпалението за подобряването на свързаните с възрастта заболявания след сенолизис не е добре изяснено. Допълнителна индикация за уместността на SASP като медиатор на вредните ефекти на сенесцентните клетки при стареенето е наблюдението, че често само малък процент от клетките при възрастните тъкани са всъщност сенесцентни [89]. Имайки предвид положителните ефекти от елиминирването на сенесцентни клетки е изкушаващо да се спекулира, че подтискането на сенесцентния секретом стои в основата на благоприятните ефекти от сенолизиса.

Въпреки това, скорошни изследвания предполагат, че вредните ефекти на SASP може да надхвърлят полезните му качества. Независимо от това, SASP може да обясни някои важни физиологични ефекти, свързани със сенесцентните клетки. Например, при кожно нараняване се индуцира сенесценс във фибробластите, което води до ускорено зарастване на раната, частично благодарение на секретирани фактори като свързания с извънклетъчния матрикс белтък CCN family member 1 (CCN1, известен и като CYR61) и тромбоцитния растежен фактор AA (PDGF-AA), което е в подкрепа на идеята, че острия, непродължителен сенесценс може да бъде благоприятен за организма като цяло [47, 90]. Сенесценсът също така ограничава фибротичния отговор, като действа като спирачка при прогресията на чернодробната фиброза, индуцирана при остро чернодробно увреждане. Умиращите хепатоцити предизвикват пролиферация на чернодробните стелатни клетки (HSCs), секретирани фибриногенни съединения, които оформят фиброзен белег. Евентуално, тези стелатни клетки навлизат в състояние на сенесценс и техния SASP допринася за разграждането на фиброзния белег, последващото премахване на сенесцентите клетки и възстановяването на тъканната хомеостаза [91]. Освен това, в отговор на тъканно увреждане фактори, секретирани от сенесцентните клетки, могат също така да промотират стволовоклетъчния характер на клетките (т.нар. “stemness”) [92]. Процесите и механизмите, които определят баланса между сенесценс, регенерация и поправка в отговор на увреждане обаче предстои да бъдат установени.

Независимо от функционалното си значение, компонентите на SASP имат ограничена приложимост като сенесцентни биомаркери, тъй като не са специфични за клетъчното стареене. Единствено при използването на ко-маркиране или чрез профилиране на единични клетки ще е възможно да се определи точно кои компоненти

на SASP дирижират функциите на сенесцентния секретом при специфични условия *in vivo*.

Самият секреторен фенотип се контролира на множество нива, включително транскрипция, транслация, стабилност на иРНК и секреция. SASP също така зависи от редица автокринни и паракринни позитивни обратни връзки, които значително повишават амплифицирането на сигнала. Множество сигнални пътища, включително DDR [93], p38 MAP киназата [94] и cGAS/STING [95], са били свързани с регулацията на SASP, като повечето от тези каскади изглежда се обединяват при активирането на транскрипционните фактори NF- $\kappa$ B и CCAAT/енхансер-свързващия белтък- $\beta$  (C/EBP $\beta$ ).

NF- $\kappa$ B и C/EBP $\beta$  се активират и обогатяват в хроматинови фракции от сенесцентни клетки [78, 96] и регулират компоненти на секреторния фенотип като пряко контролират транскрипцията на ключови регулатори на възпалителния SASP като IL-8 или IL-6. От своя страна, IL-6 и IL-8 действат чрез автокринна права връзка, която засилва активността на NF- $\kappa$ B и C/EBP $\beta$  и амплифицират SASP сигнализацията [78]. IL-1 $\alpha$  също действа като важен регулатор на SASP [97], като сигнализацията през IL-1 $\alpha$  е достатъчна, за да се наподобява частично възпалителния SASP [79]. Освен това, инхибирането на NLPR3 инфлазомата, необходима за процесирането и активирането на IL-1 $\beta$ , може да доведе до заличаване на секреторния фенотип [79].

Секреторният фенотип също така може да се регулира и посредством епигенетични механизми. Например инхибирането на MLL1 заличава SASP в резултат на намаляването на модификацията  $\gamma$ -H2Ax в гени, свързани със SASP [98], а хистоновия вариант масcoH2A1 е ключов компонент на положителната обратна връзка, която поддържа експресията на компоненти на SASP [99]. Освен това, индукцията на секреторния фенотип изисква привличането на BRD4 (bromodomain-containing protein 4) към сенесценс-активирани суперенхансери, намиращи се в съседство със SASP гени [100].

Пътят mTOR (mammalian target of rapamycin) също е важен при регулацията на SASP, като е установено, че mTOR-опосредстваното фосфорилиране на транслационния репресорен белтък 4EBP (eIF4E-binding protein 1) регулира транслацията на IL-1 $\alpha$  [101] и на MAP киназа-активираната протеин киназа 2 (MAPKAPK2) [102] с цел контрол на SASP. MAPKAPK2 инхибира иРНК-свързващия белтък ZFP36L1 (mRNA decay activator protein ZFP36L1), който специфично насочва към разграждане проинфламаторни компоненти на SASP. По този начин mTOR може да контролира сенесцентния секретом като непряко регулира стабилността на иРНК на компоненти на SASP [102]. Клетки, претърпяващи онкоген-индуциран сенесценс също така стимулират продукцията на компоненти на SASP като координират белтъчната синтеза и автофагията в mTOR-автофагия свързващия компартмент, често съкращаван като TASC [103]. Но регулацията на SASP посредством автофагия представлява сложен процес, като транскрипционния фактор GATA4 контролира секреторния фенотип чрез инхибиране на автофагията [104].

Голяма част от гореспоменатите регулаторни механизми имат глобален ефект върху регулацията на SASP или предпочитано контролират проинфламаторните му компоненти. Всъщност, именно проинфламаторните му компоненти са силно консервативни и са запазени при голяма част от изучените форми на клетъчно старене,

включително репликативния, радиация-индуцирания и онкоген-индуцирания сенесценс. Хетерогенният и вариращ състав на секреторния фенотип обаче предполага съществуването на различни подкласове в рамките на SASP. Например, отделен сенесцентен секретом е описан при митохондриална дисфункция [105], а NOTCH сигнализацията позволява превключване между трансформиращия растежен фактор- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и инфламаторния секретом [106].

Най-широко използваният сенесцентен маркер е активността на сенесценс-асоциираната  $\beta$ -галактозидаза (SA $\beta$ Gal). Тази ензимна активност, установена и при множество нормални клетки при физиологични условия (pH 4.0–4.5), значително се повишава при сенесцентните клетки поради повишеното лизозомално съдържание [107, 108]. Поради това, хистохимичното детектиране на  $\beta$ -галактозидазната активност при pH 6.0 (неоптимално за нормалните клетки) позволява специфичната идентификация на сенесцентните клетки [109]. Тъй като активността на SA $\beta$ Gal се детектира при повечето случаи на сенесценс, както *in vitro*, така и *in vivo*, на практика тя се смята за специфична черта на сенесцентните клетки. Но клетки, при които има дефицит на *GLB1* (гена, кодиращ лизозомалната  $\beta$ -галактозидаза) не проявяват нарушения във функционалните аспекти на клетъчното стареене [108]. Друг лизозомален ензим,  $\alpha$ -фукозидаза, е предложен като алтернативен сенесцентен биомаркер [110]. Повишеното лизозомално съдържание на сенесцентните клетки, вероятно е свързано с повишена автофагийна активност [111], но същевременно е характеристика и на някои клетъчни типове като активни макрофаги, купферови клетки и остеокласти [112]. Това подчертава необходимостта от използването на допълнителни маркери, в комбинация с детекцията на SA $\beta$ Gal, за да бъдат правилно отдиференцирани на сенесцентните клетки. Наскоро липофусцин, който представлява агрегат от окислени белтъци, липиди и метали, натрупващ се в остарелите тъкани, е установено, че се колокализира с активността на SA $\beta$ Gal при сенесцентни клетки [113]. Въпреки, че специфичността на натрупването на липофусцин по време на клетъчното стареене не е изследвана детайлно, той изглежда обещаващ като биомаркер за сенесценса, тъй като за разлика от оцветяването за SA $\beta$ Gal, оцветяването за липофусцин може да бъде направено и при обработени с парафин биологични материали.

Клетъчното стареене е свързано с мащабна реорганизация на хроматина [114]. Освен DDR [54] и формирането на PML телца (тип матрикс-свързани ядрени домени) [115], най-забележителната промяна в хроматиновата структура, настъпваща при клетъчно стареене, е формирането на сенесценс-асоциирани хетерохроматинови огнища (senescence-associated heterochromatic foci, SAHFs), които се наблюдават и при човешки клетки, претърпяващи онкоген-индуциран сенесценс [116]. Тези структури могат да бъдат визуализирани посредством оцветяване с DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) и се характеризират с повишена концентрация на репресивни маркери като H3K9me3 и хетерохроматиновия белтък 1 (HP1), натрупване на високо-мобилната група HMGA белтъци и загуба на линкерния хистон H1 [117]. Хипотезирано е, че SAHF може да представляват сенесценс-специфичен хетерохроматинов компартмент, за който е установено, че е резултат от пространственото преместване на предварително съществуващи репресивни маркери, а не се получава вследствие глобални промени в метилирането на хистонови белтъци [118]. Интересно е, че в SAHF се съдържат и

геномни региони, откриващи се в ламина-свързаните домени (LAD) при пролифериращи клетки [119]. След индукция на сенесценс и загуба на ламин В1 (LMNB1), тези LAD се отделят от периферията на ядрото и клъстерират в рамките на ядрото. Hi-C анализът (високоэффективен вариант на улавянето на хромозомната конформация) предполага загуба на вътрешната структура на ядрото и вероятна декомпактизация на ДНК, с която е обогатено ядрото на SAHF [120], което от своя страна повдига въпроса за действие на SAHFs като заглушаващи компартменти. Друго следствие от автофагия-опосредстваното разграждане на LMNB1, наблюдавано по време на стареенето [121], е нарушаването на интегритета на ядрената обвивка, водещо до оформянето на цитоплазмени хроматинови фрагменти (CCFs) [122]. Тези хроматинови фрагменти, посредством активация на пътя cGAS/STING, са от ключово значение за иницирането на проинфламаторен отговор, както по време на клетъчното стареене, така и при развитието на ракови образувания.

Независимо, че различните глобални промени в хроматина, настъпващи по време на клетъчното стареене, имат ясни функционални последствия, те не винаги са видими на макроскопично ниво, не се запазват при различните клетъчни типове или при различни индуктори на сенесценс [123].

При сенесцентните клетки са установени и редица метаболитни промени, включително усилване на гликолизата, на митохондриалния метаболизъм и на автофагията. Установено е, че усилената продукция на компоненти на секреторния фенотип разчита на усилена продукция на АТФ, която от своя страна се постига от митохондриалния метаболизъм (т.е. цикъла на Кребс) и гликолизата [124]. Предполага се, че повишената продукция и секреция на SASP водят до протеотоксичен стрес, който е възможно да бъде преодолян като се активира автофагията. При предишни изследвания на ролята на автофагията за поддържането на SASP е установено, че набавянето на аминокиселини, необходими за високата белтъчна обмяна, свързана със SASP, става именно посредством спрягане на автофагията (автолизозомите) с белтъчната синтеза [103].

Ролята на митохондриалния метаболизъм и автофагията при клетъчното стареене обаче остава противоречива. При някои изследвания е установено, че инхибирането на автофагията улеснява клетъчното стареене [104, 125], а сенесцентните клетки също така проявяват понижени нива на митофагия (митохондриална автофагия), водещи до дефекти в митохондриалната мрежа, допринасящи за метаболитната дисфункция по време на стареенето [126]. Дефектната митофагия води до натрупването на дисфункционални митохондрии и ROS-индуциран сенесценс, като подобни резултати са наблюдавани и при клетъчен модел на паркин-опосредствана митофагия [127]. Интересно е, че загубата на митохондрии нарушава клетъчното стареене като по-скоро нарушава положителната обратна връзка, включваща продукция на свободни кислородни радикали и DDR, а не е вследствие от недостатъчни нива на енергия (АТФ). Наистина сенесцентни клетки, лишени от митохондрии, проявяват по-високи нива на АТФ поради засилване на гликолиза. Поради това е възможно при определени условия изпълнението на сенесцентната програма да е компрементирано от статуса на митохондриалния окислителен метаболизъм, а не от недостиг на енергия. Установено е, че сенесцентни клетки могат да репрограмират метаболизма си с цел обезпечаване на

енергийните си нужди, като повишеното митохондриално окислително дишане, резултат от активирането на пируват дехидрогеназата, е необходимо за осъществяването на окоген-индуцирания сенесценс [128].

В условията на клетъчна култура сенесцентните клетки се характеризират и със значителни морфологични промени. Сенесцентните клетки стават плоски, уголемени и вакуолизирани, а понякога се наблюдават множество или уголемени ядра. Промените във формата се обясняват със статуса на структурни белтъци като кавеолин 1 и Rho ГТФазите Rac1 и CDC42 [129], а вакуолизацията е свързана със стрес в ендоплазмения стрес, възникващ като отговор към натрупването на неправилно нагънати или ненагънати белтъци [130]. Сенесцентните клетки също така образуват цитоплазмени мостове, които позволяват предаването на сигнали към съседни клетки чрез пряк междуклетъчен пренос на белтъци [74]. Като се изключат тези примери, функционалното значение на останалите морфологични промени, свързани с клетъчното стареене, остава неясно. Сенесцентните клетки *in vivo* изглежда, че запазват морфологията си, което до голяма степен се обяснява с архитектурата на тъканите, но относително скоро беше наблюдавано увеличаване на размерите на сенесцентни (SA $\beta$ Gal позитивни) клетки при възрастни мишки [89].

Клетъчното стареене и апоптозата представляват алтернативни клетъчни програми, които могат да бъдат задвижвани от едни и същи стресори. Въпреки че не е установено кое кара клетката да избере едната или другата програма, трябва да съществуват механизми, които да контролират това й решение. Известно е, че сенесцентните клетки са устойчиви към вътрешна и външна апоптоза [131, 132], като се предполага, че това е в резултат от стимулирането на членове на Bcl-2 семейството като Bcl-W (Bcl-2-like protein 2) и Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) [133]. Това е от особено практическо значение, тъй като инхибирането на членове на Bcl-2 семейството е възможно да индуцира апоптоза при сенесцентни клетки [133-135].

Клетъчното стареене се очертава като терапевтична мишена, имаща отношение към голям брой патологии. Про-сенесцентните и анти-сенесцентните (сенолитични) терапии показват обещаващи резултати при предклинични изследвания, проведени с миши модели, а клинични изпитвания при хора вече са в ход. Едни от най-често използваните сенолитици представляват инхибитори на Bcl-2 семейството белтъци, които са насочени към устойчивостта на сенесцентните клетки към апоптоза [133-135]. От друга страна, съединения, индуциращи сенесценс (напр. palbociclib и други инхибитори на CDK4/6) са полезни като противоракови агенти [136]. Инхибирането на CDK4/6 при определени туморни клетъчни линии *in vitro* води до индукцията на клетъчно стареене, а при клинични изпитвания е установено, че комбинирането на palbociclib със съвременни терапии при рак на гърдата значително повишава средната преживяемост, без да се наблюдава прогресия на заболяването. С цел да се избегнат страничните ефекти, предизвиквани от получаващите се сенесцентни туморни клетки, про-сенесцентната терапия с инхибитори на CDK4/6 може да бъде комбинирана със сенолитици, особено когато имунната система на индивида е компрометирана и не може ефективно да премахва сенесцентните клетки.

Очевидно е, че е необходимо характеризиране на механизмите и функциите на сенесцентните клетки при всяка отделна ситуация, за да може да бъдат създадени специфични, оптимални и нетоксични сенесцентни терапии. За това трябва различните подтипове на сенесценса *in vivo* да бъдат детайлно охарактеризирани и да се установи кои сенесцентни черти може да се стимулират или подтискат, без да се повлияват отрицателно нормалните клетки. Въпреки че в момента акцента е върху по-практическите аспекти на клетъчното стареене и приложимостта на подобни терапии, е необходимо по-доброто разбиране и на молекулните механизми на клетъчното стареене. Правилното идентифициране на сенесцентните клетки *in vivo* също е от изключително важно значение. Всички известни сенесцентни маркери *in vivo*, включително активността на SA $\beta$ Gal и p16<sup>INK4a</sup>, може да бъдат недостоверни в зависимост от конкретната ситуация или поради някои технически ограничения на използваните методологии. Тъй като е малко вероятно да бъде установен нов универсален биомаркер за сенесценса, особено като се има предвид хетерогенността на сенесцентните фенотипове *in vivo*, профилирането на транскриптома и протеома на единични клетки в тъканите ще е от ключово значение за разбирането на природата на тези клетки, за изследването на специфичните им функции и за евентуалното прилагане на терапевтични подходи.

### **Мембранни липиди и клетъчна сигнализация**

Клетъчните мембрани представляват силно динамични структури, състоящи се от амфипатични белтъци и липиди. Тъй като тяхното организиране се основава главно на афинитета на свързване между отделните компоненти, мембраните се считат за течни, като това позволява ротационно (движение около собствените оси, перпендикулярни на мембраната), транслационно (движение през и паралелно на мембраната) и трансбислойно (прехвърляне между противоположните вътрешни равнини) движение на липидите [137].

Липидният състав придава важни свойства на плазмената мембрана. Асиметрията, например, до голяма степен се дължи на обогатяването с разнообразни липиди в специфични области в рамките на отделните слоеве на мембраната. При клетки на бозайници, цитоплазмения монослой на плазмената мембрана обикновено съдържа по-голямо количество фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин, за разлика от външният монослой, който е богат на сфинголипиди [138]. Освен това, липидите могат да проявяват различна геометрична форма, дължаща се на присъщите им свойства като размер на главата, дължина и/или наситеност на ацилните опашки [139, 140]. Поддържането на мембрания флуидитет, независимо от присъствието на наситени липиди, се постига чрез интегралните стероли в мембраната, които интерферира с пакетирането на ацилните вериги [137, 141]. От друга страна, тъй като стеролите сами по себе си са силно неогъваеми, те могат да повишават мембранната ригидност, ако се асоциират с подвижния ненаситен липиден бислой [141]. Трябва да се отбележи, че и натрупването на холестерол в плазмената мембрана може да бъде асиметрично и да се различава при отделните органели [142, 143]. Както степента на насищане на мембранните липиди, така и присъствието на холестерол в мембраната, са

достатъчни, за да се предотврати смесването на липидите и това да доведе до формирането на специфични липидни домени, получаващи се в резултат на асоциирането на подредени и неподредени течни липидни фази [137, 141]. Тези физични свойства могат да действат като основен шаблон за определянето на степента на огъване, дебелината и напрежението в мембраната, които играят важни роли при клетъчната сигнализация.

Известно е, че мембранните липиди могат да действат и като вторични посредници при клетъчната сигнализация. Множество G-протеин свързани рецептори активират фосфатидилинозитолния сигнален път, при който фосфолипаза C хидролизира фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат (PIP<sub>2</sub>) до два вторични посредника: инозитол-3,4,5-трифосфат (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерол (ДАГ) [144]. От своя страна диацилглицерола активира протеин киназа C, а IP<sub>3</sub> повишава вътреклетъчните нива на калций, което предизвиква множество клетъчни отговори, включително активиране или подтискане на транскрипцията, клетъчен растеж и имунни отговори. Интересно е, че и сфингозина в мембраната също може да модулира активността на протеин киназа C [145].

Наскоро беше установено, че мембранните липиди са способни да повлияват сигнализацията през интегрални мембранни рецептори чрез директни или индиректни стехиометрични взаимодействия. Изследвания през последните пет години са установили важни роли на липидите при регулацията на мембранните белтъчни рецептори по време на процесите на клетъчна сигнализация. Тези функции са установени благодарение на подобряването на резолюцията на кристалната структура и идентификацията на липид-свързващи места в контекста на триизмерни структури. Този технически напредък проправи пътя за по-доброто разбиране на това как състава на плазмената мембрана предлага едновременно огромно разнообразие и пластичност при клетъчната сигнализация.

#### *Липиден състав на мембраните и клетъчна сигнализация*

Прието е, че състава на различните фосфолипиди при еукариотни мембрани играе незаменима роля за поддържането на клетъчната хомеостаза. Освен това, хетерогенността на макродомени, дължаща се на липидните фази, може да позволи разделяне или съгъстяване, които от своя страна могат да ограничават латералната дифузия и да повлияват клетъчната сигнализация, улеснявайки или възпрепятствайки белтък-белтъчните взаимодействия [137]. Локалната избирателност на фосфолипидите също повлиява сигнализацията като регулира излагането на специфични белтъчни домени към цитозола на клетката.

Липидният състав влияе на това как сигналните белтъци се асоциират към плазмената мембрана. Установено е например, че функцията на ГТФазата K-Ras може значително да се повлиява от фосфолипидния състав на мембраната, като различните фосфолипиди имат различен афинитет към този белтък [146]. Малката ГТФаза Ras, която регулира множество сигнални пътища в клетката и е свързана с различни типове рак, е напълно функционално активна само когато е асоциирана към плазмената мембрана на клетката. Важно е да се отбележи, че ориентацията на каталитичния домен на K-Ras може да повлиява взаимодействието ѝ с други регулаторни и ефекторни

белтъци в клетката. Затова асоциирането на белтъка към плазмената мембрана е от изключително значение за сигнализацията, опосредствана от K-Ras. С помощта на симулационни модели, при които са отчетени молекулните динамики на всички атоми, е установено, че свързването на K-Ras с определени фосфолипиди модулира ориентацията на белтъка в мембраната и следователно повлиява неговите функции. Открити са пет вероятни цитозолни топологии на Ras в зависимост от типа на анионните липиди в мембраната, различаващи се по излагането на каталитичния домен на белтъка към цитозола и съответно по способността на K-Ras да участва в сигналната трансдукция [146]. Афинитетът на K-Ras към мембранните липиди също така е нуклеотид-зависим [147]. При изследвания с ядрено-магнитен резонанс е установено, че при ГДФ-свързания Ras, за разлика от ГТФ-свързания белтък, превключващия (switch) регион е ориентиран към цитозола, като така се улеснява неговото взаимодействие с фактор-обменящите белтъци (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) [147]. Това взаимодействие позволява възстановяването на активната форма на Ras и предполагаемо благоприятства по-продължителното запазване на активността на Ras тъй като ГТФаза-активиращите белтъци (GTPase-activating proteins, GAPs) не могат да взаимодействат с Ras и да предизвикат хидролизата на ГТФ, водеща до инактивация на белтъка. Този тип специфичност на свързване към мембраната, наблюдаван при K-Ras, се очаква да обхваща и други белтъци, за които е известно, че се асоциират с плазмената мембрана.

Липидните подвидове в мембраната също така могат да осигуряват платформи за закотвяне, в рамките на които се модулират белтък-белтъчните взаимодействия и последващата сигнална трансдукция в клетката. Едни от най-добре изучените модули за белтък-белтъчни взаимодействия при клетъчната сигнализация са Src хомоложните (SH) домени. По-специално SH2 домените представляват същински модули за свързване, които са от съществено значение за последващата сигнализация при множество регулаторни пътища, включващи участието на фосфотирозинови рецептори [148]. Отдавна е установено, че SH2 домените се свързват към липидни молекули по начин, който инхибира [149] или подпомага [144] тяхната активност. Но тези открития остават противоречиви поради липсата на детайлни механистични изследвания. При по-скорошно изследване беше анализирана ролята на липидите при регулацията на белтък-белтъчните взаимодействия, опосредствани от SH2 домени и последващите ефекти по отношение на клетъчната сигнализация [150]. При него бяха получени убедителни доказателства, че повечето SH2 домени се свързват с висок афинитет към липиди от плазмената мембрана чрез своите „алтернативни катионни кръпки“ (“alternative cationic patches”, ACPs), които представляват домени, съседни на хидрофобни и/или ароматни остатъци, наподобяващи липид-свързващите места при мембранно-асоциирани белтъци. Изследването демонстрира, че всъщност SH2 модулите имат двойна специфичност благодарение на липид- и белтък-свързващите си домени и по този начин относителното разположение на ACP и фосфотирозиновите рецептори диктува ориентацията на белтъците, съдържащи SH2 домени, и позволява гъвкавост на липид-медираните регулаторни механизми, опосредствани от фосфотирозиновите рецептори, заради различния афинитет на свързване към липидните молекули. Установено е, че морфологията на липид-свързващите ACP



позволява на SH2-съдържащите белтъци да взаимодействат по различен начин с плазмената мембрана, като се предполага, че именно различното свързване влияе на подвижността на SH2-съдържащите белтъци и техните взаимодействия с различни ефекторни молекули при осъществяването на сигналната трансдукция.

Установена е и пряка липид-зависима рецепторна сигнализация. Обогащаването с ганглиозида G<sub>M2</sub> на плазмената мембрана при ракови клетки е било асоциирано с туморната прогресия и епителиално-мезенхимната трансформация на клетките [151], а наскоро беше установена и роля на този ганглиозид при промотирането на миграцията на туморни клетки *in vitro* [152]. G<sub>M2</sub> пряко взаимодейства с и промотира активацията на бета1 интегрини, като тази активация е свързана с последващото фосфорилиране на компоненти на MAPK/ERK сигналния път, реорганизация на цитоскелета и повишена миграция на клетките. Тези открития осигуряват първото доказателство, че липидни подвидове могат да активират интегрини по клетъчно-автономен начин и осигуряват потенциална нова терапевтична стратегия.

#### *Влияние на холестерола в мембраната върху клетъчната сигнализация*

Структурни изследвания са установили, че холестерола действа като положителен регулатор на сигнализацията през G-белтък свързани рецептори (GPCRs). Наскоро изследваният Smoothed (Smo) извънклетъчен холестерол-свързващ богат на цистеин домен е необходим за правилното предаване на сигнала през белтъка hedgehog (Hh) [153], като този домен може да бъде оприличен на алостеричен агонистичен регион. Мутации или антагонисти, които конформационно закриват това място, възпрепятстват Hh сигнализацията [153], а индуцируеми от стероли конформационни изменения са достатъчни за активирането на Smo [154]. Функциите на това извънклетъчно свързващо място и специфичния източник на тези стероли изискват допълнителни изследвания, въпреки че е установено, че натрупването на холестерол в клетката е било свързано с повишена активация на белтъка [155].

Липидният състав на мембраната е динамичен и силно вариабилен. Активирането на чернодробния X рецептор (LXR) при повишени концентрации на оксистероли индуцира експресията на АТФ-свързващия транспортер ABCA1 и изнасяне на холестерол от клетката [156]. Ако изнасянето на холестерола от клетката се възпрепятства, концентрирането му в клетката може да бъде цитотоксично и е свързано с активирането на Toll-подобния рецептор (TLR) [157]. Интересно е, че активността на рецептора LXR може да антагонизира предизвикваната от активация на TLR експресия на възпалителни гени, въпреки че остава спорно доколко тези пътища са пряко свързани. При скорошно изследване на макрофаги е установено, че индуцираното от LXR/ABCA1 намаляване на концентрацията на холестерол в липидните рафтове нарушава привличането на TLR4 към адапторния белтък MyD88 и към E3 убиквитин лигазата TRAF6, като това предотвратява последващата експресия на про-инфламаторни гени [158].

Мембранният състав оказва значително влияние върху клетъчната хомеостаза и при възникването на някои патологии. Поради това е разбираемо защо насочените към мембранните липиди терапевтични стратегии формират бързоразвиваща се научна област. Но предвид факта, че белтък-липидните взаимодействия са изключително

сложни и силно динамични, по-доброто изясняване на това как липидите взаимодействат с рецептори от клетъчната повърхност е от ключово значение за разработването на насочени терапевтични подходи.

#### *Влияние на степента на наситеност на фосфолипидите*

Сигналните събития в клетката също така могат да бъдат повлиявани от степента на наситеност на фосфолипидните вериги. Промяната на наситеността на мастните киселини е ключово свойство, което контролира твърдостта и еластичността на плазмената мембрана и е добре известен механизъм за адаптация към различни температури. По-рано е установено, че полиненаситените мастни киселини (PUFA) могат да нарушат медираното от липополизахариди (LPS) активиране на TLR4, което евентуално промотира активирането на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B. Въпреки това механизмите, свързани с този процес, доскоро не бяха изяснени, но при изследване на Schoeniger и сътрудници е демонстрирано, че за разлика от предполагаемия механизъм, включващ повлияване на генната експресия, обогатяването с полиненаситени мастни киселини директно повлиява TLR4 в мембраната [159]. В действителност, откритията им осигуряват доказателство, че PUFA могат да нарушат микродомени в плазмената мембрана и значително да повлияят стимулацията през рецептора TLR4 [160]. Присъствието на липидни рафтове несъмнено е от съществено значение за активирането на TLR4. Те служат като динамични платформи за събиране на специфични белтъци, които позволяват организацията на белтък-лигандните взаимодействия [160]. Посредством това изследване, Schoeniger и сътрудници показват, че незначителни промени в липидния състав на мембраната, резултат от дребни модуляции на физико-химичните свойства на мембранните микродомени (рафтове), са достатъчни за да се промени сигналната трансдукция в клетката със значителни последствия за процесите на възпаление.

#### *Белтъци в плазмената мембрана, допринасящи за формирането на липидните микродомени*

Олигомеризираните интегрални белтъци и тези, които са закотвени към цитоскелетни елементи могат също да ограничават латералната дифузия на липиди в плазмената мембрана, като задържат определени липиди във вътрешния слой на мембраната. Например, кортикалните актинови структури (asters), за които е известно че свързват и съответно имобилизират фосфатидилсерина във вътрешния слой, се предполага, че индуцират клъстериране на гликофосфатидилинозитол (GPI)-закотвени белтъци във външния слой, което от своя страна е свързано и с важни последствия за клетъчната сигнализация [161]. Белтъците, свързани от липиди като GPI, палмитоил, миристоил или холестерол, са преференциално сегрегирани в по-високо организирани липидни рафтови домени [162]. Опосредстваните от холестерола взаимодействия, свързването към астерите и имобилизирането на фосфатидилсерина във вътрешния слой и закотвянето на белтъци чрез липидни котви във външния слой на мембраната, също се предполага, че насочват формирането на липидни рафтове [143]. Подобно на липидните рафтови домени, инвагинациите на мембраната, известни като кавеоли, се формират от скеле от белтъка кавеолин, свързан към мембранныя

холестерол. Като медираат клетъчната сигнализация и ендоцитозата, кавеолите също така действат индиректно при транспорта и хомеостазата на холестерол.

*Взаимодействия между липидите и белтъците при формирането на везикули, преноса и сигнализацията*

Клетъчната сигнализация е силно зависима от доставянето и отстраняването на рецептори към клетъчната повърхност и е ясно, че динамиката на екзо- и ендоцитозата се основава на специфични белтък-липидни взаимодействия. Скорошно изследване е подчертало регулаторната роля на липидите и белтъците при везикуларния трафик и вътреклетъчния везикулярен транспорт, които допринасят за клетъчната сигнализация. Например за глицерофосфолипидите е установено, че регулират везикуларния транспорт. Сортирането на GPI липидните котви в ендоплазмения ретикулум и сфинголипидите може да променя способността на разтворимите SNARE рецептори да промотират сливането на мембрани [163, 164].

Процесът на формиране на везикулите е друг важен път, чрез който липид-белтъчните взаимодействия могат да повлияват клетъчната сигнализация. Накратко, огъването на мембраната, необходимо за образуването на везикулите, се улеснява от хидрофобното несъответствие, резултат от натрупването на белтъци, а също така и от скелетни механизми с помощта на белтъци от обвивката [165]. Хидрофобното несъответствие кара белтъци, които имат големи извънмембранни компоненти дифундиращи в мембраната, да предизвикват молекулно натрупване с цел да намалят достъпната мембранна площ и да намалят липидите [166].

Освен множеството роли при придаването на уникални и критични физични и химически свойства на плазмените мембрани, липидите наскоро изпъкнаха като важни регулатори на клетъчната сигнализация. Техните нови функции се опосредстват от свързаните им към рецептори, ролята им на вторични преносители или на лиганди за определени рецептори, а също така и от ролята им при събирането и организацията на сложни сигнални мрежи. Установяването на тези функции на мембранните липиди стана възможно благодарение на подобряването на технологиите за изучаване на мембранната структура и на възможностите за идентифициране на специфични липидни групи в рамките на определени субдомени в плазмената мембрана. Тази област на научни изследвания става все по-популярна благодарение именно на този технологичен напредък и в бъдеще е възможно да доведе до разработването на нови терапевтични стратегии, базирани на повлияване не само на белтък-белтъчни, но и на белтък-липидни взаимодействия.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### *Цел*

Да се изучат ефектите от третиране с инхибитори на Rho-свързаните протеин кинази (ROCK кинази) върху пролиферацията, морфологията и вътреклетъчната сигнализация при нормални човешки кератиноцити с фокус върху процесите на клетъчно стареене и клетъчна смърт. Да се проучат ефектите на други биологично активни молекули върху процесите на клетъчна смърт и клетъчно стареене.

### *Задачи*

1. Определяне на ефектите от третиране с ROCK инхибитора Y27632 върху пролиферативния капацитет и активността на сенесценс-асоциираната бета галактозидаза (SA $\beta$ Gal) при нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.
2. Изследване на промените в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.
3. Изследване на промените в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, третирани с инхибитора на ROCK киназите Y27632 в хода на настъпване на репликативен сенесценс.
4. Изследване на промените в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.
5. Изследване на ефектите на кверцитин и дихидрокверцитин върху преживяемостта и морфологията на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид.
6. Изследване на ефектите на кверцитин и дихидрокверцитин върху генерирането на свободни кислородни радикали (ROS) при нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### *Използвани разтвори и буфери*

#### **Разтвор А**

Състои се от 10 mM глюкоза, 3 mM KCl, 130 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0033 mM Phenol Red и 30 mM HEPES, разтворени в дейонизирана вода. След приготвянето на разтвора, рН се коригира до рН 7.4, разтвора се стерилизира чрез филтрация (0.2 µm филтър) и се съхранява при 4°C.

Разтвор А се използва като алтернатива на физиологичния серум при обработката на кожни експланти с цел изолиране на първична култура от нормални човешки кератиноцити.

#### **Разтвор T17**

Представява 0.17% трипсин (Trypsin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich, USA), добавен към разтвор А. Полученият разтвор се стерилизира чрез филтрация (0.2 µm филтър) и се съхранява при -20°C.

Този разтвор на трипсин се използва за разграждането на тъканта, по-специално за отделянето на епидермиса от дермата, при изолирането на първични култури от нормални човешки кератиноцити.

#### **Разтвор T25**

Представява 0.025% трипсин и 0.01% EDTA, добавени към разтвор А, след което полученият разтвор се стерилизира чрез филтрация (0.2 µm филтър) и се съхранява при -20°C.

Този трипсинов разтвор се използва при пасажирането на клетъчните култури от нормални и hTERT-имортализирани кератиноцити.

#### **Диализиран фетален телешки серум (dFBS)**

Калциевите йони от търговски фетален телешки серум (FBS; non-USA origin, Sigma-Aldrich) се премахват чрез диализа с фосфатен буфер PBS, не съдържащ калций. Диализата се провежда в диализно черво (MWCO 12-14 000 Da, Visking Medicell International Ltd.) при разбъркване на разтвора в продължение на 24-36 часа, като фосфатния буфер се сменя неколкостранно (минимум 3 пъти, на всеки 12 часа) по време на диализата. Полученият диализиран серум се стерилизира чрез филтрация (0.2 µm филтър) и се съхранява при -20°C.

Диализираният телешки серум се използва, за да се избегне диференциация на нормалните и на имортализираните човешки кератиноцити поради наличието на калциевы йони в културалната среда.

#### **Пеницилин/стрептомицин (P/S), 1000x**

Представява разтвор на 50 000 U/mL пеницилин G и 50 000 µg/mL стрептомицин, добавени към разтвор А. Този антибиотичен разтвор се стерилизира чрез филтрация (0.2 µm филтър) и се съхранява при -20°C. При добавянето на аликвота от разтвора на пеницилин/стрептомицин към културалната среда се получава крайна концентрация от 50 U/mL пеницилин G и 50 µg/mL стрептомицин.

#### **Гентамицин/амфотерицин (G/A), 1000x**

Представява разтвор на 50 000 µg/mL гентамицин, 250 µg/mL фунгизон и 250 µg/mL ампицилин, добавени към разтвор А. Полученият антибиотичен разтвор се

стерилизира чрез филтрация (0.2  $\mu\text{m}$  филтър) и се съхранява при  $-20^{\circ}\text{C}$ . При добавянето на аликвота от разтвора към културалната среда се получава крайна концентрация от 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  гентамицин, 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  фунгизон и 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ампицилин.

#### **Разтвор на аминокиселини**

Разтвор, съдържащ незаменими аминокиселини, необходими за автокринното култивиране на нормални човешки кератиноцити. Състои се от 1.677g L-хистидин, 3.280g L-изолевцин, 0.448g L-метионин, 0.306g L-триптофан и 0.453g L-тирозин, разтворени при нагриване в 1 000 mL дейонизирана вода. Полученият разтвор се стерилизира чрез филтрация (0.2  $\mu\text{m}$  филтър) и се съхранява при  $-20^{\circ}\text{C}$ . При добавянето на аликвота от разтвора на аминокиселини към културалната среда, аминокиселинния разтвор се разрежда 33x, при което се получават крайни концентрации от 0.05 g/L хистидин, 0.1 g/L изолевцин, 0.014 g/L метионин, 0.009 g/L триптофан и 0.014 g/L тирозин.

#### **Хидрокортизон**

Хидрокортизон (5 mg/mL; Sigma-Aldrich Chemie, Germany) се разтваря в етанол, след което разтвора се филтрира и се съхранява при  $4^{\circ}\text{C}$ . Този стоков разтвор на хидрокортизон се разрежда 25 пъти в разтвор А до получаването на разтвор с концентрация 0.2 mg/mL, като същевременно се минимизира и количеството разтворител (етанол) добавено към културалната среда. При добавянето на аликвота от разредения разтвор на хидрокортизон (0.2 mg/mL) към културалната среда се получава крайна концентрация 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  хидрокортизон.

#### **TBS буфер**

Буферът се приготвя като 10x стоков разтвор, съдържащ съответно 30.285 g/L Trizma base, 3.23 g/L KCl и 81.81 g/L NaCl. След пълното разтваряне на солите в дейонизирана вода, рН на разтвора се коригира със солна киселина (HCl) до рН 7.6. Стоковият разтвор на TBS буфера се съхранява при  $4^{\circ}\text{C}$  и е годен за употреба в рамките на минимум 3 месеца. От стоковия разтвор се приготвя работен буфер с концентрация 1x (т.е. 3.0285 g/L Trizma base, 0.323 g/L KCl и 8.181 g/L NaCl).

#### **Фосфатен буфер PBS**

Буферът се приготвя чрез разтварянето на 0.2g KCl, 0.2g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 8.0g NaCl и 1.45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  в 1 000 mL дейонизирана вода. След пълното разтваряне на солите, рН на разтвора се коригира до рН 7.4. Полученият PBS буфер се съхранява при  $4^{\circ}\text{C}$  и е годен за употреба в рамките на минимум 3 месеца.

#### *Използани клетъчни линии и среди за култивиране*

Нормални човешки кератиноцити бяха изолирани съгласно методиката на Minnag и сътрудници [167] от кожни експлантати получени от Клиниката по пластично-възстановителна и естетична хирургия (КПВХ) към УМБАЛ „Александровска“, гр. София. Кожните експлантати бяха отстранени в хода на рутинни хирургични интервенции (абдоминопластика) на здрави възрастни пациенти като се спазваха всички правови и етични норми за работа с тъканни експлантати. За експериментите, осъществени в Университета на Намюр, Белгия, бяха използвани кожни експлантати от възрастни пациенти на Clinique St. Luc, Namur-Bouge след съответното одобрение на етичния комитет на болницата и след информирано съгласие от страна на пациента или негов

законен представител. Имортилизираните hTERT кератиноцити бяха любезно предоставени от Prof. James Rheinwald (Boston, USA). Кератиноцитите, експресиращи hTERT (каталитичната субединица на теломеразата), придобиват и дефект при задвижването на експресията на p16<sup>INK4a</sup>, което ги прави безсмъртни, но същевременно клетките запазват нормални характеристики на растежа и диференциационния си потенциал [168]. При настоящите експерименти hTERT кератиноцитната линия беше използвана като контрола при изследванията, свързани с клетъчното стареене.

При изолирането на първичните кератиноцитни култури беше използвана базална среда KBM-2<sup>®</sup> (Clonetics<sup>™</sup>; Lonza, USA), към която бяха добавени съответните добавки Single Quots<sup>®</sup> KGM-2 (Clonetics<sup>™</sup>; Lonza, USA), за да се получи пълноценна среда. При прибавянето на добавките към базалната среда се побучаваха крайна концентрация от 50 µg/mL телешки екстракт от хипофиза (bovine pituitary extract, BPE), 10 ng/mL епидермален растежен фактор (EGF), 5 µg/mL инсулин, 5 x 10<sup>-7</sup> M хидрокортизон и 5 µg/mL трансферин. Към пълноценната среда бяха добавени съответно гентамицин/фунгизон/ампицилин (крайна концентрация 50 µg/mL/0.25 µg/mL/0.25 µg/mL) при установяването на културата, и пеницилин G/стрептомицин (50 U/mL/50 µg/mL) при вторичните култури (култивиране на клетките след замразяване).

За растежа на първичните кератиноцитни култури беше използвана и среда Epilife<sup>®</sup> (Cascade Biologics<sup>™</sup>; Thermo Fisher Scientific, USA), към която беше добавена растежна добавка за човешки кератиноцити (Human Keratinocyte Growth Supplement, HKGS; Cascade Biologics<sup>™</sup>; Thermo Fisher Scientific, USA). При прибавянето на добавката към средата се получаваха крайни концентрации от 0.2% BPE, 0.2 ng/mL човешки рекомбинантен епидермален растежен фактор, 0.18 µg/mL хидрокортизон, 5 µg/mL инсулин и 5 µg/mL трансферин. Към получената пълноценна среда се добавяха пеницилин G/стрептомицин (50 U/mL/50 µg/mL).

Средата, използвана за автокринен растеж, се състоеше от базална среда Epilife<sup>®</sup> или KBM-2<sup>®</sup>, към която бяха добавени аминокиселини (L-хистидин, L-изолевцин, L-метионин, L-триптофан, L-тирозин), хидрокортизон (0.2 µg/mL) и пеницилин G/стрептомицин (50 U/mL/50 µg/mL).

При криосъхранението на първични кератиноцитни култури беше използвана среда за замразяване, състояща се от 60% базална среда (KBM-2<sup>®</sup> или Epilife<sup>®</sup>), 20% диметилсулфоксид (DMSO) и 20% фетален телешки серум.

**Таблица 1. Използвани среди за култивирането на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид и hTERT-имортализирани кератиноцити**

Компоненти	Среда за установяване на културата	Среда за растеж на културата	Среда за автокринен растеж на културата
Базална среда	KBM-2 <sup>®</sup> (Lonza)	Epilife <sup>®</sup> (Gibco)	KBM-2 <sup>®</sup> (Lonza) или Epilife <sup>®</sup> (Gibco)
Телешки екстракт от хипофиза (BPE)	50 µg/mL	2 µg/mL	—
Епидермален растежен фактор (EGF)	10 ng/mL	0.2 ng/mL	—
Инсулин	5 µg/mL	5 µg/mL	—
Хидрокортизон	0.18 µg/mL	0.18 µg/mL	0.2 µg/mL
Трансферин	5 µg/mL	5 µg/mL	—
Антибиотици	G/A или P/S	G/A или P/S	P/S
Аминокиселини	—	—	His, Ile, Met, Trp, Tyr

\*G/A = гентамицин (50 µg/mL) + ампицилин (0.25 µg/mL) + фунгизон (0.25 µg/mL)

\*\*P/S = пеницилин G (50 U/mL) + стрептомицин (50 µg/mL)

*Изолране, поддържане и криосъхранение на първични кератиноцитни култури от кожа на възрастни индивиди*

Експлантите, получени в хода на рутинни хирургически интервенции, бяха съхранявани в стерилен физиологичен разтвор при 4°C и изолирането на първични кератиноцитни култури започваше в рамките на до 48 часа след отстраняването на експланта. По време на цялата процедура за изолиране на първични кератиноцити, кожните експланти бяха държани върху лед, за да се минимизира увреждането на тъканта. Тъканните експланти бяха промити със стерилен разтвор А, рН 7.4 (10 mM глюкоза, 3 mM KCl, 130 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0033 mM Phenol Red, 30 mM HEPES), към който бяха добавени ампицилин (0.25 µg/mL), гентамицин (0.05 mg/mL) и амфотерицин В (0.25 µg/mL). С помощта на скалпел тъканта беше нарязана на парченца с площ под 1 cm<sup>2</sup>, които бяха промиват в разтвор А и бяха поставени в петри, съдържащо стерилен разтвор Т17 (0.17% трипсин в разтвор А, рН 7.4), като при поставянето на парченцата се внимаваше за правилната им ориентация (дермалната страна се поставяше към течността, а епидермиса оставаше отгоре). Парченцата кожа бяха инкубирани в разтвора Т17 при 4°C за една нощ. На следващият ден с помощта на два тънки форцепса епидермалния слой беше отделен от дермалния и се поставяше в петри със студена пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup>. Отделените парченца допълнително се накъсваха чрез форцепс и посредством пипетиране, след което получената клетъчна суспензия се пресяваше през клетъчно сито с цел премахването на остатъците от тъканта. Клетките бяха събрани в 50 mL конусовидна епруветка и клетъчната



суспензия се центрофугираше за 10 мин при 1200 rpm и 4°C. След центрофугирането супернатантата се аспирираше внимателно и получената клетъчна пелета се ресуспендираше до получаването на хомогенна клетъчна суспензия в до 5 mL пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup> (обема зависеше от относителното количество клетки, които бяха изолирани). След ресуспендирането беше определен общия брой на клетките и клетъчната суспензия се разреждаше до концентрация от  $8 \times 10^6$  клетки/mL. Клетките бяха посяти в културални съдове при гъстота на културата 46 000 клетки/cm<sup>2</sup> ( $\sim 8 \times 10^6$  клетки за културален съд с площ 175 cm<sup>2</sup>) в пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup>, към която се добавяше 0.001% фетален телешки серум. Посятите клетки бяха поставени в CO<sub>2</sub> инкубатор при 37°C и бяха оставени да се адаптират за 3 дни. При правилно изолиране на клетките, на третия ден беше наблюдавана появата на първите „клонове“, като на този етап от изолирането на първични кератиноцитни култури беше възможно да се откриват и колонии от други, съпътстващи клетъчни типове (т.е. корнеоцити, фибробласти или меланоцити). На петият ден от началото на изолирането, културалната среда се сменяше за първи път, като в зависимост от целите на последващите експерименти, първичните кератиноцитни култури бяха отглеждани или в пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup> или в пълноценна среда Epilife<sup>®</sup>. Културалната среда се подменяше на всеки два дни до достигането на конфлуентност на културата от 50-60%, при която се пристъпваше към пасажирене.

По време на пасажиренето на първични кератиноцити е препоръчително клетките да се държат на лед с цел намаляване на увреждането и на настъпването на необратими промени в клетъчната популация. Културалната среда се аспирира и се добавя разтвор T25 (0.025% трипсин, 0.01% ЕДТА в разтвор А, рН 7.4), като след 5 мин разтвора се аспирира и се добавя ново количество разтвор T25. Целта на тази стъпка беше да се премахват съпътстващите клетъчни типове (корнеоцити, фибробласти и меланоцити), евентуално присъстващи в изолираната клетъчна култура. След общо 30-минутно инкубиране в разтвор T25, към културалния съд се добавяше блокиращ разтвор (2% dFBS в разтвор А, 4°C) и дъното на съда се обливаше двукратно с цел да се съберат всички клетки. Блокиращият разтвор, съдържащ изолираните първични кератиноцити, се събираше в 50 mL конусовидна епруветка, държана на лед, и кератиноцитната суспензия се центрофугираше за 5 мин при 1200 rpm и 4°C. Супернатантата се аспирираше внимателно и клетъчната пелета се ресуспендираше в до 10 mL пълноценна културална среда (обема зависеше от количеството клетки). Определяше се общият брой кератиноцити и клетките се засяваха в съответните културални съдове при гъстота на културата 10 000 клетки/cm<sup>2</sup>.

При осъществяването на първия пасаж (или на последващ такъв) е възможно да се извърши и криопрезервация на първичната кератиноцитна култура с цел дългосрочното ѝ съхранение и използване при бъдещи експерименти. За целта, клетките бяха трипсинизирани с разтвор T25 като след 5-минутно инкубиране по-голямата част от разтвора се аспирираше и се оставяха 1-2 mL във флашка. Тази стъпка целеше елиминирането на евентуални съпътстващи клетъчни типове (корнеоцити, фибробласти, меланоцити). Кератиноцитите се инкубираха за общо 15 мин с трипсиновия разтвор, след което действието на трипсина се прекратяваше чрез добавянето на блокиращ разтвор (2% dFBS в разтвор А, 4°C). Повърхността на флашка

се обливаше двукратно с блокиращия разтвор, подобно на пасажирането, и клетките бяха събирани в 50-mL епруветка. Центрофугирани са за 5 мин при 1200 rpm и 4°C, след което бяха ресуспендирани в минимален обем среда и се преброяваха. Разреждаха се до получаването на клетъчна суспензия с концентрация  $2 \times 10^6$  или  $4 \times 10^6$  клетки/mL. Впоследствие тази кератиноцитна суспензия се разреждаше двукратно със среда за замразяване, състояща се от 60% пълноценна културална среда, 20% FBS и 20% DMSO, при което се получаваше крайната клетъчна концентрация от 1 или 2 млн. клетки за криоепруветка (с общ обем 1 mL). Криоепруветките първоначално бяха замразявани плавно при -80°C, като след минимум 24 часа криоепруветките се прехвърляха в съд с течен азот с цел дългосрочно съхранение.

При размразяването на кератиноцитите след изваждането на криоепруветките от съда с течен азот те бързо бяха размразявани и посявани в съответните културални съдове със студена пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup>. На следващия ден средата се сменяше (отново с KBM-2<sup>®</sup> или с Epilife<sup>®</sup>) с премахване на остатъчното количество DMSO. Културалната среда се сменяше на всеки два дни, а при достигането на приблизително 70-80% конfluентност клетките бяха пасажирани. При пасажа клетките бяха отделяни от повърхността на съда с помощта на разтвор T25, използван със стайна температура. Трипсинизирането се осъществяваше за 5-10 мин като отлепянето на клетките се проследяваше с помощта на светлинна микроскопия. Действието на трипсина се спираше чрез добавянето на студен блокиращ разтвор (2% dFBS в разтвор A, 4°C), с който бяха обливани и стените на съда с цел събирането на максимален брой клетки. Получената суспензия се центрофугираше за 5 мин при 1 000 rpm и 4°C, след което получената пелета от клетки се ресуспендираше със студена културална среда и се определяше клетъчният брой. Клетките се посяваха в съответните съдове за култивиране с необходимата гъстота (обикновено 10 000 клетки/cm<sup>2</sup>).

В зависимост от целите на експеримента бяха използвани две различни селективни кератиноцитни среди – KBM-2<sup>®</sup> (Lonza) и Epilife<sup>®</sup> (Gibco). KBM-2<sup>®</sup> средата благоприятства адхезията на кератиноцитите към повърхността на съдовете за култивиране и е подходяща за краткосрочни експерименти, докато средата Epilife<sup>®</sup> е подходяща за продължителното култивиране на кератиноцитите тъй като благоприятства тяхната пролиферация и удължава живота им в условията на клетъчна култура.

#### *Индукция на сенесценс при кератиноцитни култури*

Сенесценс беше индуциран при кератиноцитите (нормални кератиноцити от възрастен индивид или hTERT-имортализиран кератиноцити) като клетките се поддържаха в пролиферативно състояние, в условията на клетъчна култура, за множество пасажи (над 10), както е описано в литературата [169]. При достигане на конfluентност на културата от 80%, клетките се трипсинизираха и пасажираха в съотношение 1:4 и кумулативното удвояване на клетъчната популация (CPD) беше изчислявано за всеки пасаж, като се определяха броя на деленията по следната формула:

$$\text{Удвояване на популацията (CPD)} = \frac{\log(\text{преброени клетки} / \text{посяти клетки})}{\log 2}$$

За сенесцентни се считаха кератиноцитните култури, които започваха да проявяват забавена пролиферация в рамките на две седмици и/или експресираща сенесценс-асоциирана бета-галактозидазна активност (SA $\beta$ Gal) (над 80% положителни клетки при оцветяване).

#### *Третираня на клетките*

Нормални и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити бяха култивирани в присъствието на ROCK киназния инхибитор Y27632 (Y-27632.dihydrochloride; Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen, Switzerland), добавен към пълноценна или автокринна среда Epilife<sup>®</sup> при крайна концентрация 10  $\mu$ M в културалната среда. Стоковият разтвор на инхибитора Y27632 се приготвяше в дейонизирана стерилна вода, което елиминира риска от проявата на ефекти на разтворителя.

С цел извличане на холестерола от клетъчната мембрана на кератиноцитите се използваше третиране с метил-бета-циклодекстрин (M $\beta$ CD) [170]. За целта културални съдове с желаната конfluентност се промиваха еднократно с фосфатен буфер PBS, след което се инкубираха в продължение на 1 час при 37°C с автокринна културална среда Epilife<sup>®</sup>, съдържаща 7.5 mM M $\beta$ CD (Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium). След края на инкубационния период следваше възстановяване на културата в автокринна среда за 1 час при 37°C. След възстановяването на клетките, културалната среда се аспирираше, клетките се промиваха еднократно с фосфатен буфер PBS и се съхраняваха при -20°C преди провеждането на последващите анализи.

С цел активиране на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR), конfluентни кератиноцитни култури бяха третирани с 10 ng/mL епидермален растежен фактор (EGF), добавен към автокринна среда Epilife<sup>®</sup>, с която клетките бяха инкубирани в продължение на 20 мин при 37°C. След края на инкубационния период, клетките се промиваха еднократно с фосфатен буфер PBS и се съхраняваха при -20°C преди да се пристъпи към последващите анализи.

Третиранията с биологично активни вещества (кверцитин, дихидрокверцитин) на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид бяха осъществени при ранни пасажи на културата, която след пасажирание се адаптираше в продължение на 24 часа при стандартни условия (в пълноценна културална среда), а след това за 24 часа при автокринни условия, за да се елиминират евентуални синергични и/или антагонистични ефекти на тестваните вещества и компоненти на културалната среда. Стоковите разтвори на тестваните антиоксиданти бяха приготвени в дейонизирана стерилна вода, което елиминираше потенциални ефекти на разтворителя. Използваните крайни концентрации се получаваха при добавяне на съответно количество от стоките разтвори към автокринна среда KBM-2<sup>®</sup>. Третиранията се осъществяваха в продължение на 24-72 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и овлажнена атмосфера.

#### *Определяне на клетъчната преживяемост посредством оцветяване с МТТ*

За анализът на клетъчната преживяемост посредством оцветяване с МТТ (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide, AppliChem, Darmstadt, Germany), първични кератиноцити от пасажи 2-5 се засяваха в 24-ямкови културални плаки при гъстота на културата 20 000 клетки/ямка. Клетките се адаптираха в

пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup> за едно денонощие след пасажирането, след което в продължение на 24 часа се култивираха в автокринна среда KBM-2<sup>®</sup>. След адаптирането на клетките към автокринни условия на растеж, се пристъпваше към третирането на първичните кератиноцитни култури с нарастваща концентрация на кверцитин (0 – 100  $\mu\text{M}$ ) или дихидрокверцитин (0 – 100  $\mu\text{M}$ ), като продължителността на третирането беше между 24 и 72 часа. След края на съответния период на третиране, културалната среда се заменяше от автокринна среда KBM-2<sup>®</sup>, съдържаща 0.5 mg/mL MTT. Клетките се инкубираха в продължение на 1 час при 37°C, след което средата се аспирираше и заменяше от същия обем изопропанол (или DMSO) и културалните плаки се инкубираха в продължение на 5 мин при стайна температура. Целта на инкубирането с изопропанол беше натрупаните в живите клетки формазанови кристали да бъдат разтворени и екстрахирани от клетката. Аликвоти от изопропанола (DMSO) се прехвърляха в 96-ямкова прозрачна плака и се измерваше абсорбцията при дължина на вълната 540 nm с помощта на четец на многоямкови плаки (Varioscan 3001 Multimode Microplate reader, Thermo Electron Corporation, Finland). Представените резултати представляват усреднени стойности от трикратни повторения на два независими експеримента, при които са използвани нормални човешки кератиноцити от различни донори.

#### *Определяне на клетъчната преживяемост посредством оцветяване с Crystal Violet*

За определянето на клетъчната преживяемост посредством оцветяване с Crystal Violet беше използван протокол, разработен от Feoktistova и сътрудници [171] с леки модификации. Първични кератиноцитни култури от пасажи 2-5 се посяваха в пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup> в 96-ямкови плаки при гъстота на културата 10 000 клетки/ямка, като същевременно се залагаше и контрола за неспецифично свързване на багрилото (ямки само с пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup>). Клетките се адаптираха в продължение на 24 часа след пасажирането, след което кератиноцитите се култивираха в продължение на 24 часа при автокринни условия (автокринна среда KBM-2<sup>®</sup>). След адаптирането на клетките към автокринни условия на растеж, се пристъпваше към третирането на първичните кератиноцитни култури с нарастваща концентрация на кверцитин (0 – 100  $\mu\text{M}$ ) или дихидрокверцитин (0 – 100  $\mu\text{M}$ ), като продължителността на третирането беше от 24 до 72 часа. След края на съответния период на третиране, културалната среда се аспирираше и клетките се промиваха трикратно с вода с цел отстраняване на неприкрепените клетки и клетъчни фрагменти. След промиването кератиноцитите се оцветяваха с разтвор на 0.5% Crystal Violet в 20% метанол в продължение на 20 мин на клатачка, промиваха се трикратно с вода и плаките се изсушаваха на тъмно при стайна температура в продължение на 18-24 часа (до пълно изсушаване). За разтварянето на образуваните в живите клетки кристали от багрилото се използваше метанол, като клетките се инкубираха в продължение на 20 мин при стайна температура, при разклащане и на тъмно. Измерваше се абсорбцията при 540 nm с помощта на четец на многоямкови плаки (Varioscan 3001 Multimode Microplate reader, Thermo Electron Corporation, Finland). Получените резултати са нормализирани на база на абсорбцията на контролите за неспецифично свързване на багрилото (т.е. ямките без клетки), а процента жизнеспособни клетки се изчисляваше на база на резултатите,

получени за контролните клетки (отглеждани в автокринна среда KBM-2<sup>®</sup>). Представените резултати представляват средна стойност от по три повторения на два независими експеримента.

#### *Определяне на генерирането на ROS чрез оцветяване с DCFDA*

Нивата на свободно радикалови форми на кислорода (ROS), генерирани в резултат на третирането на първичните култури от нормални човешки кератиноцити, бяха определено посредством флуориметричен метод с използването на 2',7'-дихлорофлуоресцин диацетат (DCFDA). DCFDA представлява неполярно съединение, което преминава свободно през клетъчната мембрана и под действието на свободни радикали в цитозола на клетката се окислява до флуоресцентния продукт 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF). Именно флуоресценцията на DCF бе използвана за определяне на относителните нива на свободни радикали в клетката.

Нормални човешки кератиноцити от пасажи 2-5 се посяваха с гъстота на културата 1 000 клетки/ямка в 96-ямкови плаки и се адаптираха в пълноценна среда KBM-2<sup>®</sup> в продължение на 24 часа, а след това – 24 часа в автокринна среда KBM-2<sup>®</sup>. Третирането с кверцитин (0 - 100  $\mu$ M) или дихидрокверцитин (0 - 100  $\mu$ M) се осъществяваше в автокринна среда KBM-2<sup>®</sup> като продължителността на третирането беше 24 или 48 часа. След края на съответния период на третиране, културалната среда се аспирираше и клетките се промиваха еднократно с фосфатен буфер PBS. Непосредствено преди работа се приготвяше работен разтвор на DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate; Calbiochem<sup>®</sup>, EMD Millipore Corp., USA) с концентрация 2  $\mu$ g/mL във фосфатен буфер PBS, с който клетките се инкубираха в продължение на 45 мин при 37°C и на тъмно. Плаката се промиваше еднократно с фосфатен буфер PBS и с цел индукция на оксидативен стрес част от клетките се третираха с 5% разтвор на водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) във фосфатен буфер PBS в продължение на 5 – 15 мин при 37°C. Флуоресценцията се измерваше при дължина на вълната на възбуждане 485 nm и дължина на вълната на емисия 535 nm с помощта на четец на многоямкови плаки (Varioscan 3001 Multimode Microplate reader, Thermo Electron Corporation, Finland). Представените резултати представляват усреднена стойност от по три повторения на два независими експерименти.

#### *Оцветяване на клетките за активност на сенесценс-асоциираната бета-галактозидаза (SA $\beta$ Gal)*

За определяне на активността на сенесценс-асоциираната бета-галактозидаза (SA $\beta$ Gal) беше използван протокол, разработен от Debacq-Chainiaux и сътрудници [109, 172]. При пасажирането на нормалните и на имортализираните кератиноцити 6-ямкови стерилни плаки се засяваха с кератиноцити при клетъчна концентрация 20 000 клетки/ямка, в пълноценна културална среда Epilife<sup>®</sup> и се култивираха при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, в продължение на едно денонощие. На следващият ден, културалната среда се аспирираше и клетките се промиваха двукратно със студен фосфатен буфер (0.9% NaCl, добавен към 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4), след което се фиксираха със студен разтвор за фиксиране (2% формалдехид/0.2% глутаралдехид) в продължение на 5 мин при стайна температура. Непосредствено преди използването се приготвяше разтвор на

x-gal (20 mg/mL в N,N-диметилформаид; Eurogentec, Belgium) и оцветяващ разтвор. Оцветяващият разтвор (краен обем 15 mL) се състои от 3 mL фосфатен буфер, pH 6 (0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6), 0.75 mL 0.1 M калиев фероцианат ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), 0.75 mL 0.1 M калиев ферицианат ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), 1.8 mL 2.5 M NaCl, 0.03 mL 1 M  $\text{MgCl}_2$  и 0.75 mL от разтвора на x-gal. Важно е оцветяващият разтвор да се предпазва от слънчева светлина, поради което както съда, в който се приготвяше, така и културалните плаки, които се оцветяваха, се предпазваха от слънчевите лъчи.

След фиксирането, клетките се промиваха двукратно със студен фосфатен буфер PBS, след което във всяка ямка се добавяха по 2 mL от оцветяващия разтвор и плаката се инкубираше при 37°C, на тъмно, в продължение на 16 часа („overnight“). На следващият ден, плаката се промиваше двукратно със студен фосфатен буфер PBS, след което се промиваше еднократно с метанол. Течността от ямките се аспирираше и плаката се изсушаваше напълно при стайна температура и на тъмно. Преброяването на положителните клетки се осъществяваше непосредствено след оцветяването като за доброто отдиференциране на оцветените клетки към ямките се добавяше фосфатен буфер PBS. Оцветените с x-gal плаки можеше да бъдат съхранявани краткосрочно (в рамките на няколко седмици) като за целта към ямките се добавяше фосфатен буфер PBS и плаките се съхраняваха на тъмно при 4°C.

Преброяването на SAβGal позитивните клетки беше направено с помощта на конфокален светлинен микроскоп при 10x увеличение на микроскопа. Процентното съдържание на позитивните клетки е изчислено по следната формула:

$$\% \text{ позитивни клетки} = \frac{\text{брой оцветени клетки}}{\text{общ брой клетки}} * 100$$

Представените стойности представляват средна стойност от по три повторения на експеримента.

#### *Маркиране на живи кератиноцити с флуоресцентни проби и анализ на изображенията*

Нормални човешки кератиноцити бяха засяти при гъстота на културата 20 000 клетки/cm<sup>2</sup> в Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) и бяха култивирани в пълноценна среда Epilife<sup>®</sup> в продължение на 48 часа. Непосредствено преди всеки експеримент използваните флуоресцентни проби (BODIPY-SM, lysenin\*, theta) бяха смесвани със среда, към която беше добавено еквимоларно количество обезмаслен серумен албумин (DF-BSA, Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium), и бяха центрофугирани за 5 мин при 14 000 x g с цел премахване на евентуални агрегати. С цел маркиране на клетъчната повърхност, клетките бяха промити двукратно със среда при 4°C, след което се инкубираха при 4°C със съответната проба в продължение на 15 мин. След маркирането на липиди от клетъчната повърхност, клетките се промиваха четирикратно със студена културална среда (4°C), след което се поставяха в среда със стайна температура (20°C) и се анализираха с помощта на конфокален микроскоп (Leica) непосредствено след маркирането на субмикрометричните липидни домени. За всяка една от изследваните проби, изображенията бяха получени при сила на лазера 16% с помощта на конфокален микроскоп Leica при увеличение 100 x. При двойното маркиране, изображенията бяха получени посредством последователното използване на

зеления (488 nm) и на червения (568 nm) канал за отчитане на флуоресценцията. При количественият анализ на колокализацията на пробите с помощта на софтуера Leica LAS-AF-Lite бяха изчислени корелационните коефициенти (Pearson's) между различните маркирания на клетките, като за целта бяха използвани по минимум 10 изображения от три независими експеримента.

#### Анализ на изображенията

Количественото определяне на липидните субмикрометрични домени беше направено с помощта на софтуера Visilog (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). За целта беше създадена специална програма въз основа на алгоритъм, включващ следните три стъпки: премахване на шума (denoising), сегментация и измервания. За премахването на шума беше приложен билатерален филтър за заглаждане на образа, като същевременно се запазваха неговите краища. Клетъчните мембрани се премахваха като се използваша морфологични отвори с линейни структурни елементи, ориентирани в няколко посоки. След това с помощта на превключващ филтър („toggle filter“) беше премахнат остатъчният импулсен шум и беше повишен контраста на изображенията. В последния етап, изображенията бяха бинаризирани като се използваше глобална гранична стойност и малките компоненти се премахваха. На база на обработените изображения бяха изчислени следните три параметъра:

- Средният брой на липидните субмикрометрични домени за клетка. За целта броят на обектите в изображението беше разделен на броя на клетките. Броят на клетките в дадено изображение беше определен ръчно.
- Средната площ на липидните субмикрометрични домени. За целта общата площ на липидните субмикрометрични домени в изображението беше разделен на броя на обектите.
- Средният интензитет на липидните субмикрометрични домени. За целта интензита на изображението беше разделен на площта му.

#### *Екстракция и количествено определяне на сфингомиелин и холестерол*

Конфлуентни клетки, култивирани в 60 mm петриеви панички, бяха използвани за екстракцията на сфингомиелин и на холестерол. Клетките се отделяха от дъното на културалните съдове с помощта на скрейпър в по 1 mL дейонизирана вода, преди да бъдат соникирани в продължение на 1 мин в ултразвукова вана. За разделянето на липидната от белтъчната фракции, беше използвана екстракция с хлороформ/метанол (2:1), последвана от центрофугиране за 15 мин при 3 000 rpm и стайна температура. Към органичната фаза беше добавен 0.05 M NaCl, след което се промиваше двукратно с 0.36 M CaCl<sub>2</sub>/метанол (1:1). След разбъркване и центрофугиране (15 мин, 3 000 rpm, стайна температура), към органичната фаза беше прибавен Triton X-100 (1% разтвор в ацетон), след тя се изпаряваше под въздушен поток чрез SpeedVac™ SC100 система (Thermo Electron Corporation, Zellik, Belgium). Получените проби бяха разтворени в дейонизирана вода и бяха използвани за количественото определяне на сфингомиелин и на холестерол.

За количествено определяне на съдържанието на сфингомиелин беше използван търговски кит Fluorometric Sphingomyelin Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) като бяха спазени инструкциите на производителя. На кратко, непосредствено преди началото на

експеримента се приготвяше работен разтвор на сфингомиелиназа, към който бяха прибавени стандартни разтвори на сфингомиелин (с концентрации от 0 до 30  $\mu\text{M}$ ) или реални проби. Пробите бяха инкубирани в продължение на 1-2 часа при 37°C на тъмно, след което към тях се прибавяше смес за анализ на сфингомиелин, състояща се от ензимна смес и флуоресцентния индикатор AbRed. Пробите се инкубираха в продължение на до 2 часа при 37°C на тъмно, като същевременно през определени времеви интервали (30 мин) беше отчитана флуоресценцията при дължина на вълната на възбуждане 540 nm и отчитане на флуоресценцията при дължина на вълната 590 nm. На база на получените резултати за стандартните разтвори на сфингомиелин беше построена стандартна крива, уравнението на която беше използвано за изчисляването на съдържанието на сфингомиелин в изследваните реални проби.

За количественото определяне на съдържанието на холестерол беше използван търговски кит Amplex<sup>®</sup> Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) като бяха спазени инструкциите на производителя. Непосредствено преди началото на експеримента се приготвиха работните разтвори на всички компоненти на кита. От стандартният разтвор на холестерол от кита се приготвиха серийни разреждания (с концентрации от 0 до 0.8  $\mu\text{g/mL}$ ), които бяха използвани за получаването на стандартна крива. В съответните ямки на 96-ямкова плака бяха поставени стандартни разтвори на холестерол или реални проби в по две повторения. Непосредствено преди употреба се приготвяше и работен разтвор на Amplex<sup>®</sup> Red, състоящ се от 300  $\mu\text{M}$  Amplex<sup>®</sup>, 2 U/mL пероксидаза от хрян (HRP), 2 U/mL холестерол оксидаза и 0.2 U/mL холестерол естераза. Реакцията се стартираше при добавянето на работния разтвор на Amplex<sup>®</sup> Red към анализиранияте проби и плаката се инкубираше в продължение на минимум 30 мин при 37°C на тъмно. Флуоресценцията на стандартните разтвори на холестерол и реалните проби беше отчетена при дължина на вълната на възбуждане  $560 \pm 10$  nm и дължина на вълната на детекция  $590 \pm 10$  nm. На база на получените резултати за стандартните разтвори на холестерол беше построена стандартна крива, уравнението на която беше използвано за изчисляването на съдържанието на холестерол в изследваните реални проби.

Получените резултати за количественото съдържание на сфингомиелин и холестерол бяха нормализирани на база на белтъчното съдържание на пробите и резултатите са представени съответно като относително съдържание на сфингомиелин и на холестерол.

#### *Изолиране на белтъци и Western блот анализи*

Екстракцията на белтъците беше направена с лизисен буфер, състоящ се от 0.125 M Tris-HCl, 20% (v/v) глицерол, 4% (w/v) натриев додецилсулфат (SDS), 0.2 M дитиотреитол (DTT), 1% (w/v) бромфенол блу, при редуциращи условия. Лизисният буфер беше темпериран при стайна температура, преди да бъде прибавен към културалните съдове, които бяха държани на лед. С помощта на скрейпър клетките бяха отделени от дъното и клетъчния лизат се прехвърляше в епендорфки, държани на лед. С цел денатурация на белтъците, клетъчните лизати бяха инкубирани в продължение на 5 мин в кипяща водна баня (100°C), след което бяха центрофугирани



за 15 мин при 13 200 rpm и 4°C. Получената супернатанта се отделяше и изолираните белтъчни проби се съхраняваха при -20°C преди да бъдат анализирани.

Количеството белтък в пробите беше определено с Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) като се използваше и Ionic Detergent Compatibility Reagent (IDCR) (Thermo Fisher Scientific) за подобряване съвместимостта на кита с детергенти (в случая SDS). Разтвори на телешки серумен албумин (0.25 – 4 µg/mL) бяха използвани за получаването на стандартна крива на база, на чието уравнение се изчисляваше количеството белтък в пробите.

Белтъците бяха разделени посредством едномерна полиакриламидна електрофореза при денатуриращи условия (SDS-PAGE) като бяха използвани разделящи гелове с концентрация на акриламид/бисакриламид от 7.5% до 15%. Разтворът за разделящите гелове се състоеше от 7.5% до 15% акриламид/бисакриламид, 0.375 M Tris/HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% амониев персулфат (APS) и 0.1% TEMED, а този за концентриращия гел се състоеше от 4% акриламид/бисакриламид, 0.125 M Tris/HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS и 0.1% TEMED. Електродният буфер се състоеше от 25 mM Tris, 192 mM глицин и 0.1% SDS (система на Laemmli; [173]). Електрофоретичните условия бяха напрежение от 120 V, сила на тока 500 mA и продължителност на електрофоретичното разделяне от 1.5 часа. Алтернативно, електрофоретично разделяне беше проведено и при напрежение от 200 V и продължителност от 1 час, при същата сила на тока.

В зависимост от относителното съдържание на белтъците, които бяха детектирани чрез Western блот анализ, на гела бяха нанасяни между 20 и 35 µg общо количество белтък. Желаната концентрация на пробите се получаваше при разреждане на пробата с Laemmli буфер (1x), при краен обем на пробата от 25 µL, нанасяна в съответния старт на електрофоретичния гел.

След провеждането на едномерната полиакриламидна електрофореза, се пристъпваше към пренос на белтъците върху поливинилиден флуоридна (PVDF) мембрана посредством т.нар. „мокър пренос“ чрез система на Bio-Rad (Mini-PROTEAN® електрофорезна система с Mini Trans-Blot модул; Bio-Rad). Използваният трансферен буфер, състоящ се от 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM глицин и 20% метанол, предварително се охлаждаше и се използваше студен. Трансферната касета се сглобяваше съгласно инструкциите на производителя и трансфера се осъществяваше в продължение на 15-16 часа при напрежение на тока 60 V, сила на тока 300 mA и температура 4°C при непрекъснато разбъркване на трансферния буфер.

Преди пристъпването към същинския Western блот анализ беше направена визуализация на преноса чрез оцветяване с Rouge Ponceau. След визуализацията на преноса се пристъпваше към блокиране на мембраната с 5% обезмаслено сухо мляко в буфер TBST (0.1% Tween-20 добавен към буфер TBS, pH 7.6 (25 mM Trizma base, 4.33 mM KCl, 140 mM NaCl)) в продължение на 1-2 часа при стайна температура. След блокирането се осъществяваше оцветяването с първото анти тяло (титър 1:1000), разрежено в блокиращ буфер, за през нощта при 4°C. В зависимост от използваното анти тяло и препоръките на неговия производител, анти тялото се разреждаше до желания титър в 5% обезмаслено сухо мляко или в 5% телешки серумен албумин (BSA), добавени към буфер TBST. На следващият ден мембраната се промиваше

трикратно за по 10 мин с TBST и се инкубираше със съответното второ антитяло (конюгирано с пероксидаза от хрян (HRP); титър 1:5000), разтворено в блокиращ буфер, в продължение на 1-1.5 часа при стайна температура. След инкубацията мембраната отново се промиваше трикратно за по 10 мин с TBST и се инкубираше със субстратен разтвор BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche) директно по време на сканирането. Детекцията беше осъществена чрез система Image Quant LAS 4000 mini system (GE Healthcare) като бяха направени два типа сканиране: Chemiluminescence (за визуализация на антителата) и Digitalization (за визуализация на белтъчния маркер).

**Таблица 2. Използвани антитела при провеждането на Western блот анализите.**

Антитяло	Каталожен номер и производител	Блокиране	Титър
<b><u>Първи антитела</u></b>			
Phospho-EGFR (Tyr1173), rabbit polyclonal	#44794; Invitrogen	Сухо мляко	1:1000
EGFR, rabbit monoclonal	#4267; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), rabbit polyclonal	#9211; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
p38 MAPK, rabbit polyclonal	#9212; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
Phospho-Akt (Ser473), rabbit polyclonal	#9271; Cell Signaling	BSA	1:1000
Akt, rabbit polyclonal	#9272; Cell Signaling	BSA	1:1000
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), mouse monoclonal	#9106; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
ERK 1/2, rabbit polyclonal	#9102; Cell Signaling	BSA	1:1000
p16 <sup>INK4a</sup> , rabbit monoclonal	#LS-B8693; LifeSpan BioScience	BSA	1:1000
RPL-13a, rabbit polyclonal	#2765; Cell Signaling	Сухо мляко	1:1000
<b><u>Втори антитела</u></b>			
Anti-rabbit HRP	#7074; Cell Signaling	Сухо мляко	1:5000
Anti-mouse HRP	#7076; Cell Signaling	Сухо мляко	1:5000

#### *Екстракция на РНК и количествен RT-qPCR*

Тотална РНК беше изолирана чрез търговски кит за изолиране на РНК High Pure RNA isolation kit (Roche, Basel, Switzerland) като бяха спазени инструкциите на производителя. Непосредствено преди изолирането се приготвяше разтвор на DNase I, който се използваше за лизирането на ДНК в пробите. Петритата с кератиноцити се поставяха върху лед и се прибавяше лизисен буфер (4.5 М гуанидин-НСl, 50 mM Tris-НСl, 30% Triton X-100 (w/v), рН 6.6; компонент от кита) и с помощта на скрейпър клетките се отделяха от дъното на петрито. Полученият клетъчен лизат се прехвърляше в епендорфка, вортексираше се и се центрофугираше за няколко секунди. Лизатът се нанасяше върху колонка за изолиране на РНК (съдържаща се в кита), която беше

центрифугирана за 1 мин при 16 000 gcf. Колонката се прехвърляше в нова епендорфка и към нея се добавяше предварително приготвения разтвор на DNase I. Следваше инкубация при стайна температура в продължение на 15 мин, след което колонката за изолиране на РНК се промиваше с първия буфер за промиване (5 М гуанидин-НСl, 20mM Tris-НСl, рН 6.6; компонент на кита) като за целта беше центрофугирана за 30 сек при 16 000 gcf. Следваше двукратно промиване с втория буфер за промиване (20 mM NaCl, 2 mM Tris-НСl, рН 7.5; компонент на кита), първо за 30 сек, а след това за 1 мин, като колонката беше центрофугирана при 16 000 gcf. След промиването, колонката, към която бе свързана изолираната тотална РНК, се поставяше в чиста епендорфка и РНК беше елуира с буфера за елуиране (изключително чиста (PCR grade) вода; компонент на кита) чрез центрофугиране за 1 мин при 16 000 gcf. Епендорфката, съдържаща елуираната тотална РНК, се поставяше върху лед преди да бъде определена концентрацията на изолираната РНК чрез NanoDrop™ спектофотометър (Thermo Fisher Scientific). Преди провеждането на последващите анализи, изолираната тотална РНК се съхраняваше при -80°C.

За обратната транскрипция на 1 µg тотална РНК беше използван търговски кит SuperScript II kit (Life Technologies, California, USA) като бяха спазени инструкциите на производителя. Накратко, за всяка една проба се приготвяше смес 1, състояща се от 1 µL дезоксинуклеотиди (dNTPs), 1 µL oligo-dT и 1 µL вода (RNase free), която се прибавяше към изолираната тотална РНК (1 µg). Получената смес се нагряваше за 5 мин при 65°C, след което се охлаждаше чрез поставяне върху лед и се центрофугираше за кратко. Същевременно се приготвяше смес 2, състояща се от 4 µL First Strand Buffer (5x), 2 µL 0.1 М DTT и 1 µL обратна транскриптаза, която се прибавяше към пробата. Получените реакционни смеси се инкубираха за 50 мин при 42°C, след което за 15 мин при 70° С и реакцията се спираше посредством охлаждане на пробата до 4°C. Получените кДНК бяха съхранявани при -20°C преди да бъдат анализирани.

За анализът посредством количествен RT-qPCR, получената кДНК се разреждаше 25 пъти и реакцията на амплификация се осъществяваше чрез SYBR Green Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Относителното съдържание на иРНК беше количествено определено на база на разликите в Ct [174] като беше използван 7300 real-time PCR апарат (Life Technologies) и нивата на експресия бяха нормализирани на база на гена *RPLP0*, кодиращ 60S рибозомалния белтък L10E. Секвенциите на използваните праймери за амплификацията на p16INK4a, кисела сфингомиелиназа (aSMase), неутрална сфингомиелиназа 1 (nSMase 1), сфингомиелин синтаза 2 (SMS2) и RPLP0 са представени в таблица 3.

**Таблица 3. Секвенции на използваните праймери при qRT-PCR.**

иРНК	Forward primer	Reverse primer
p16 <sup>INK4a</sup>	5`-GCCCAACGCGAATAGT-3`	5`-CGCTGCCCATCATCATGAC-3`
aSMase	5`-GCCCAATCTGCAAAGGTCTATT-3`	5`-CCCACGCGAGCCACAT-3`
nSMase1	5`-CAGGACTTCCAGTACCTGAGAGAGA-3`	5`-GGCCACTGCCAATGATTCC-3`
SMS2	5`-CCTGTGCCTGGAATGCATTT-3`	5`-ATCAATCGTAGAATCCGTTGAACTT-3`
RPLP0	5`-ATCAACGGGTACAAACGAGTC-3`	5`-CAGATGGATCAGCCAAGAAGG-3`

### *Статистически анализ на данните*

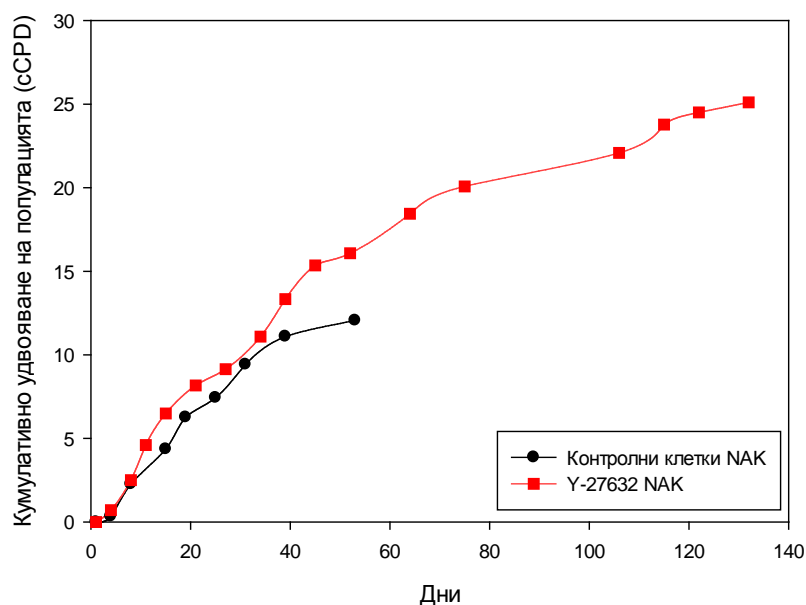
Всички експерименти във връзка с дисертационния труд са проведени в поне по три повторения, като при изследванията на нормални човешки кератиноцити, изолирани от кожни експланти, бяха използвани първични култури, изолирани от поне два различни донора.

Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение (mean  $\pm$  SD), освен ако не е споменато друго. За сравняване на групите беше използван дисперсионен анализ (ANOVA) с Bonferroni post-hoc анализ. Статистическата значимост, представена на графиките, е както следва: NS (няма статистическа значимост), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### *Ефекти от третирането с ROCK инхибитора Y-27632 върху пролиферативния капацитет и активността на сенесценс-асоциираната бета галактозидаза при нормални и имортализирани човешки кератиноцити*

Y27632 (наименование по IUPAC: 4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-pyridin-4-ylcyclohexane-1-carboxamide) представлява селективен инхибитор на Rho-свързаните кинази (ROCK), за който е известно от научната литература, че повлиява пролиферацията и диференциацията на кератиноцити [175, 176], а също така може да доведе и до имортализация на нормални човешки кератиноцити, отглеждани в присъствието на подложка от имортализирани фибробласти [177]. Поради това, си поставихме за задача да установим дали ROCK киназния инхибитор Y27632 е способен да предизвика имортализация на нормални човешки кератиноцити, култивирани при автокринни условия и в отсъствието на подложка от имортализирани фибробласти. За целта, изолираните нормални човешки кератиноцити от възрастен донор (NAK) бяха отглеждани в присъствието или отсъствието на 10  $\mu$ M Y27632 за продължителен период от време в условията на монослойна клетъчна култура.

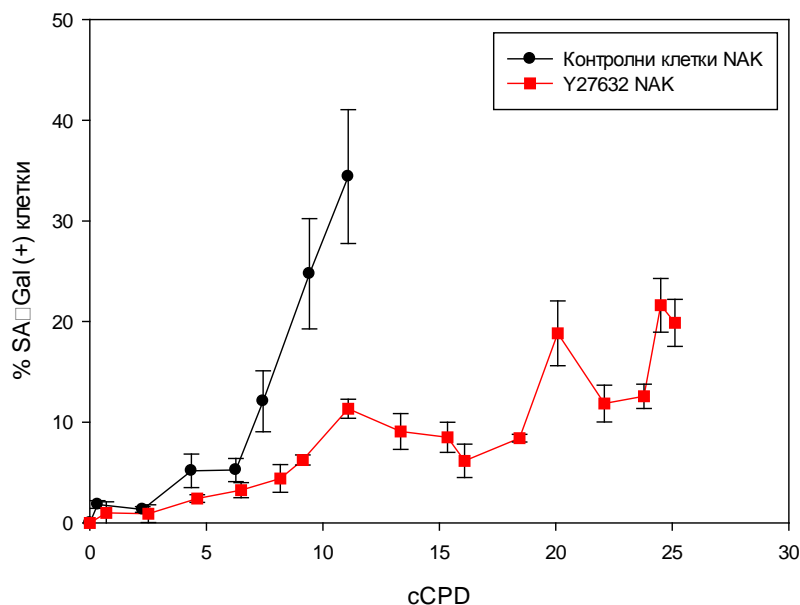


**Фигура 4. Удвояване на клетъчната популация при нормални човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632.**

Нормалните човешки кератиноцити, отглеждани при стандартни условия, в отсъствието на ROCK инхибитора Y27632 достигаха до състояние на репликативен сенесценс около 50тия ден от началото на култивиране, като за това се съдеше по удължения интервал между две последователни пасажирания на културата (3-5 дни при ранните пасажи и над 10 дни при късните пасажи) (фигура 4). След провеждането на 10тия пасаж на нормалните кератиноцити, отглеждани в отсъствието на инхибитора Y27632, в продължение на един месец културата не достигна до необходимата конfluентност от 60-70%, за да бъде пасажирана, което доведе до извода, че

кератиноцитите са навлезли в състояние на постоянен, необратим арест в клетъчния си цикъл и са спрели да пролиферират.

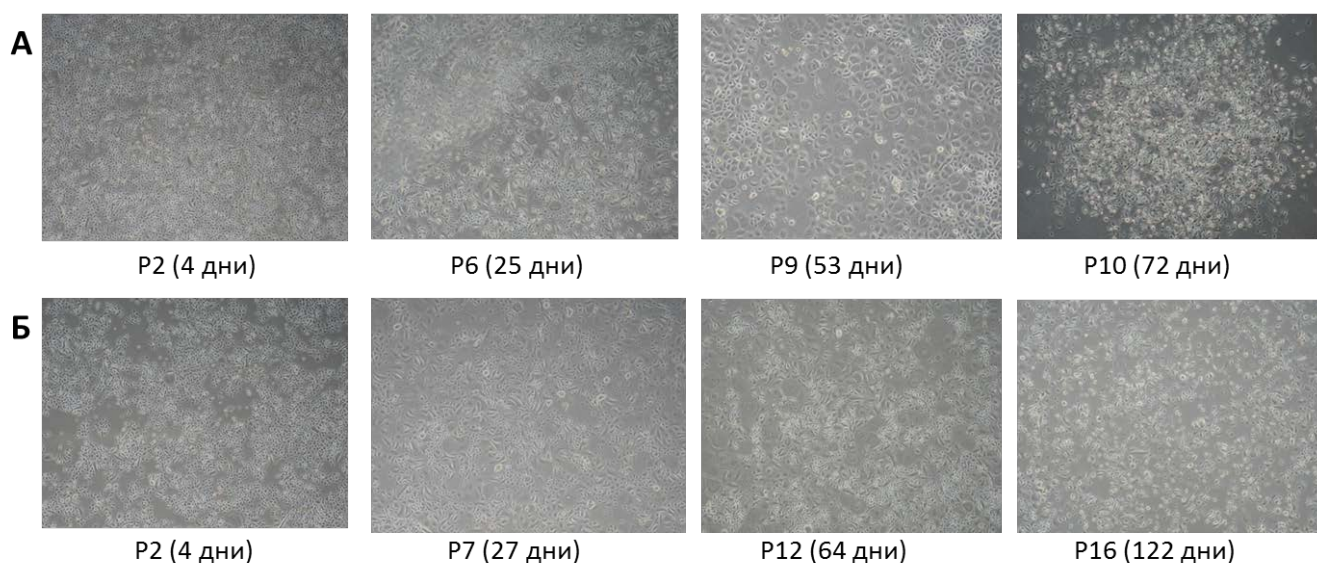
За разлика от контролните клетки, нормални кератиноцити, култивирани в присъствието на 10  $\mu\text{M}$  Y27632 продължаваха да се делят и запазваха пролиферативния си потенциал в продължение на над 120 дни като монослойна клетъчна култура (фигура 4). Същевременно интервалът между две последователни пасажира на културата се запазваше в рамките на до 10 дни дори и при късните пасажи на културата. На база на тези наблюдения можем да заключим, че в присъствието на ROCK инхибитора Y27632 нормални човешки кератиноцити са способни в значителна степен да запазят пролиферативния си капацитет, като това става независимо от използвания начин на култивиране (като ко-култура с подложка от инактивирани фибробласти или като монокултура, както е при настоящото изследване).



**Фигура 5. Процентно съдържание на SAβGal позитивните клетки при нормални човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632.**

Една от най-характерните биохимични особености на сенесцентните клетки е експресията на специфична сенесценс-асоциирана бета галактозидаза (SAβGal), която има максимална активност при стойности на рН над 6.0, което позволява и отдиференцирането на сенесцентните клетки от други клетки с повишено лизозомално съдържание. При нормалните кератиноцити прогресивно се наблюдаваше повишаване на броя на положителните за този биомаркер клетки, което показва увеличаване на броя на клетките, които са навлезли в състояние на репликативен сенесценс и са загубили пролиферативния си капацитет (фигура 5). От друга страна, при нормалните кератиноцити, отглеждани в присъствието на 10  $\mu\text{M}$  Y27632 беше установен по-малък процент положителни за SAβGal клетки, като дори при късни пасажи на културата сенесцентните клетки представляваха под 20% от общия брой клетки в културата. Наблюдаваните при третираните с ROCK инхибитора Y27632 временни флукутации на активността на SAβGal (т.е. повишаване на броя положителни клетки) е вероятно да се

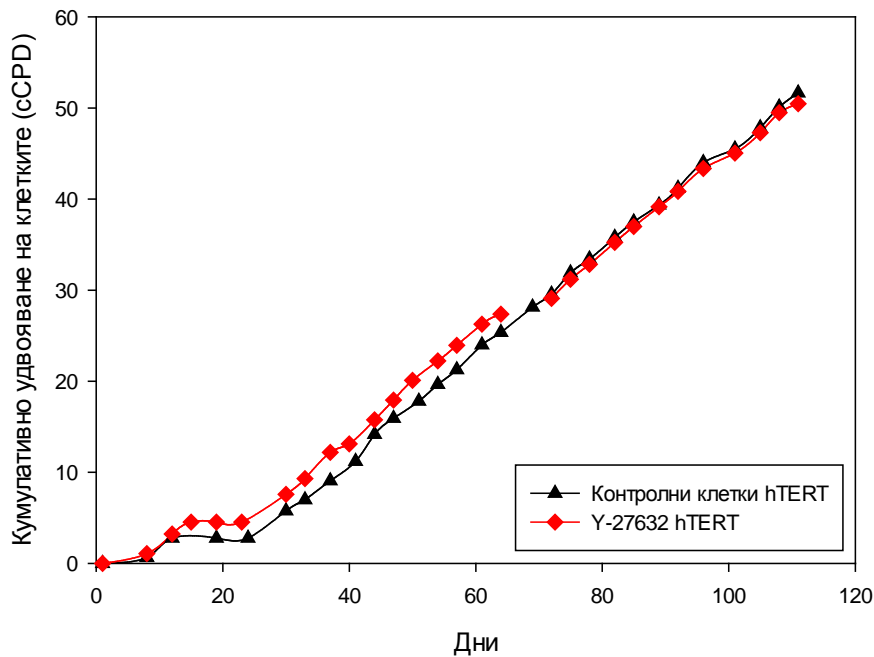
дължат на кратковременно повишаване на броя на положителните за SaβGal клетки, които при последващото пасажиране на културата се загубват и/или намаляват като процентно съдържание поради запазването на пролиферативен капацитет на останалите клетки в културата. Независимо от причината за тези временни флукуации, по-голямата част от кератиноцитите в културата (над 80%) бяха негативни по отношение активността на SaβGal и следователно бяха със запазен пролиферативен капацитет. Това показва, че ROCK киназния инхибитор Y27632 е способен да подпомага преживяемостта на нормални човешки кератиноцити, отглеждани като монокултура без подложка от инактивирани фибробласти, и че клетките, третирани с него, навлизат по-късно в състояние на репликативен сенесценс.



**Фигура 6. Морфологични промени при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс. (А) Контролни клетки. (Б) Клетки, третирани с 10 μM Y27632.**

При наблюдаване на морфологията на нормални и третирани с инхибитора Y27632 човешки кератиноцити с помощта на конфокална светлинна микроскопия беше установено, че при ранните пасажи морфологията на клетките и в двете култури е идентична, като клетките бяха с характерната за кератиноцити призматична форма, малки по размери и с относително хомогенна цитоплазма. При продължителното култивиране на нормалните, контролни кератиноцити (*фигура 6А.*) постепенно се наблюдаваше повишаване на броя на клетките, които проявяваха характерна за сенесцентни клетки морфология, включваща увеличаване на клетъчните размери, сферична форма, уголемяване и фрагментация на ядрото, като при последните пасажи на нормалните, нетретирани кератиноцити се оформяха единични колонии с относително голям брой клетки, които обаче не бяха способни да колонизират цялата повърхност на културалните съдове, а по-скоро запазваха размерите си постоянни за продължителен период от време (над 30 дни). Именно удължаването на интервала между две последователни пасажира и невъзможността за достигане на желаната конfluентност на монослоя бяха причина за прекратяването на култивирането на нормалните, нетретирани клетки при достигането на пасаж 10 (на 95тия ден от

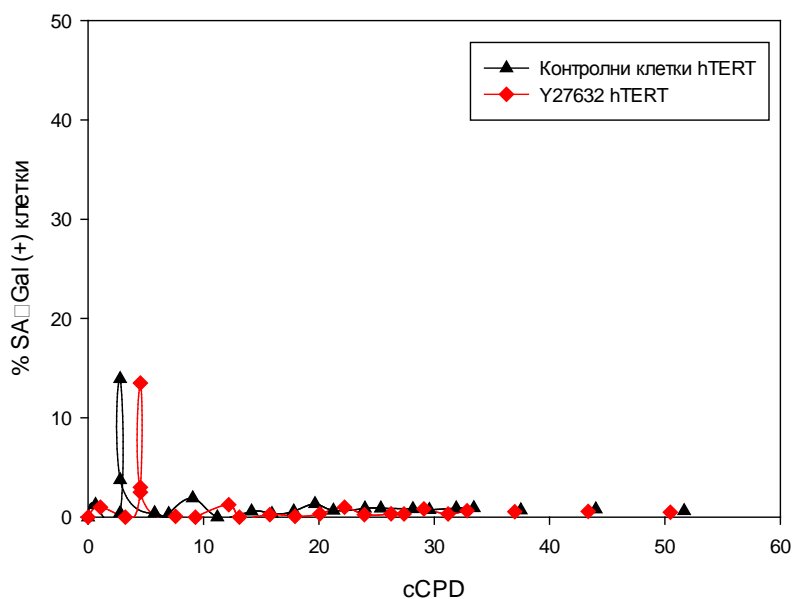
началото на култивиране). За разлика от контролните клетки, кератиноцитите, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632 запазваха пролиферативния си капацитет и продължаваха да се делят в продължение на над 120 дни в условията на клетъчна култура. И при третираните с инхибитора Y27632 кератиноцити беше установено навлизане на част от клетките в състояние на репликативен сенесценс, но броя на клетките, проявяващи морфологични черти, характерни за сенесцентните клетки, беше относително малък и тяхното присъствие в културата не повлияваше пролиферативния ѝ капацитет като цяло (фигура 6B).



**Фигура 7. Удвояване на клетъчната популация при имортализирани човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632**

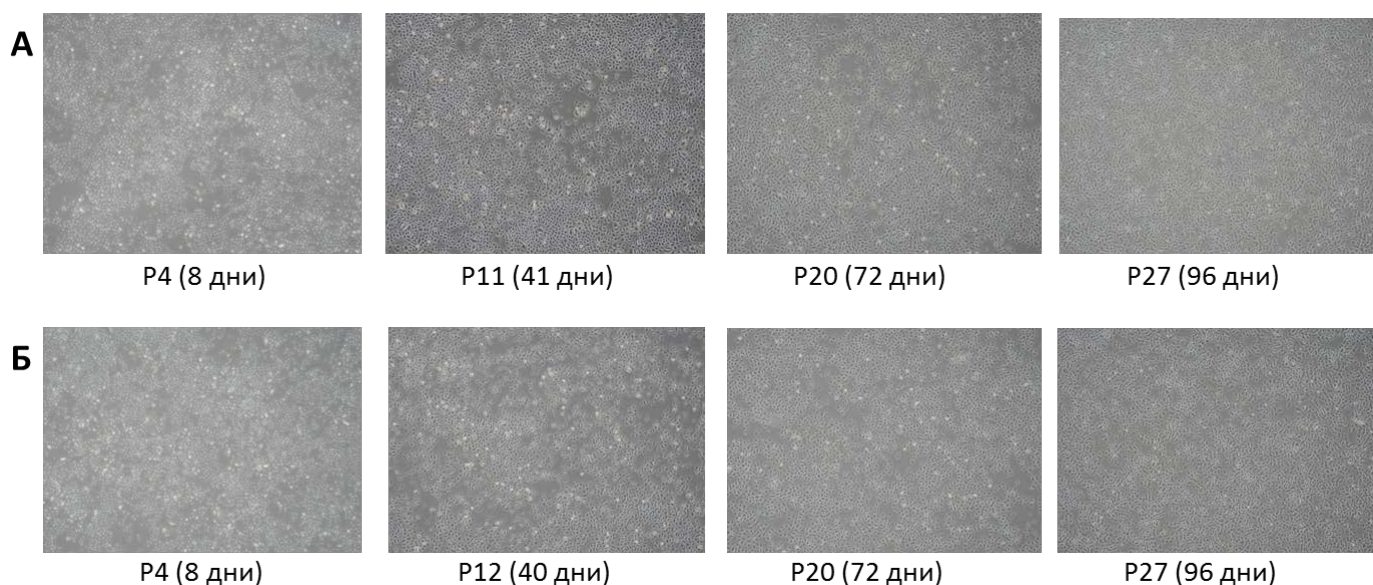
Когато аналогичен експеримент беше проведен с hTERT-имортализирани човешки кератиноцити, които са неспособни при стандартни условия на култивиране да навлязат в състояние на репликативен сенесценс, беше установено че третирането с ROCK киназния инхибитор Y27632 не води до промени в пролиферативния капацитет на клетките (фигура 7). И при двете условия на култивиране, в отсъствие или присъствие на инхибитора Y27632, интервала от време между две последователни пасажирания на културата се запазваше в рамките на 3-5 дни през целия период на култивиране на клетките. Имортализираните кератиноцити, запазващи пролиферативния си капацитет, бяха успешно поддържани в условията на клетъчна култура в продължение на над 100 дни без да бъдат забелязани промени в клетъчния цикъл и скоростта на пролиферация.





**Фигура 8. Процентно съдържание на SAβGal позитивните клетки при имортализирани човешки кератиноцити, отглеждани в отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632.**

Беше осъществено и оцветяване за биомаркера SAβGal, като независимо от отсъствието или присъствието на инхибитора Y27632 процентното съдържание на положителните клетки беше под 1% почти през целия период на поддържане на hTERT-имортализираните кератиноцити в условията на клетъчна култура (*фигура 8*). Известно повишаване на процентното съдържание на SAβGal положителните клетки се наблюдаваше при ранните пасажии на културите (около 20тия ден в култура), което вероятно се дължеше на временно натрупване на по-голям брой сенесцентни клетки, които впоследствие изчезваха (или намаляваха значително) поради запазения пролиферативен капацитет на по-голямата част от кератиноцитите в културата.



**Фигура 9. Морфологични промени при hTERT-имортализирани кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс. (А) Контролни клетки. (Б) Клетки, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632.**

По отношение на морфологията на hTERT-имортализираните човешки кератиноцити не бяха установени макроскопични промени в структурата на клетките, като и при късните пасажии на културата кератиноцитите запазваха характерната си морфология и в културалните съдове при детайлно разглеждане можеше да бъдат забелязани само единични клетки с леко изменена морфология, наподобяваща наблюдаваната при ранните стадии на репликативния сенесценс при нормалните човешки кератиноцити (фигура 9).

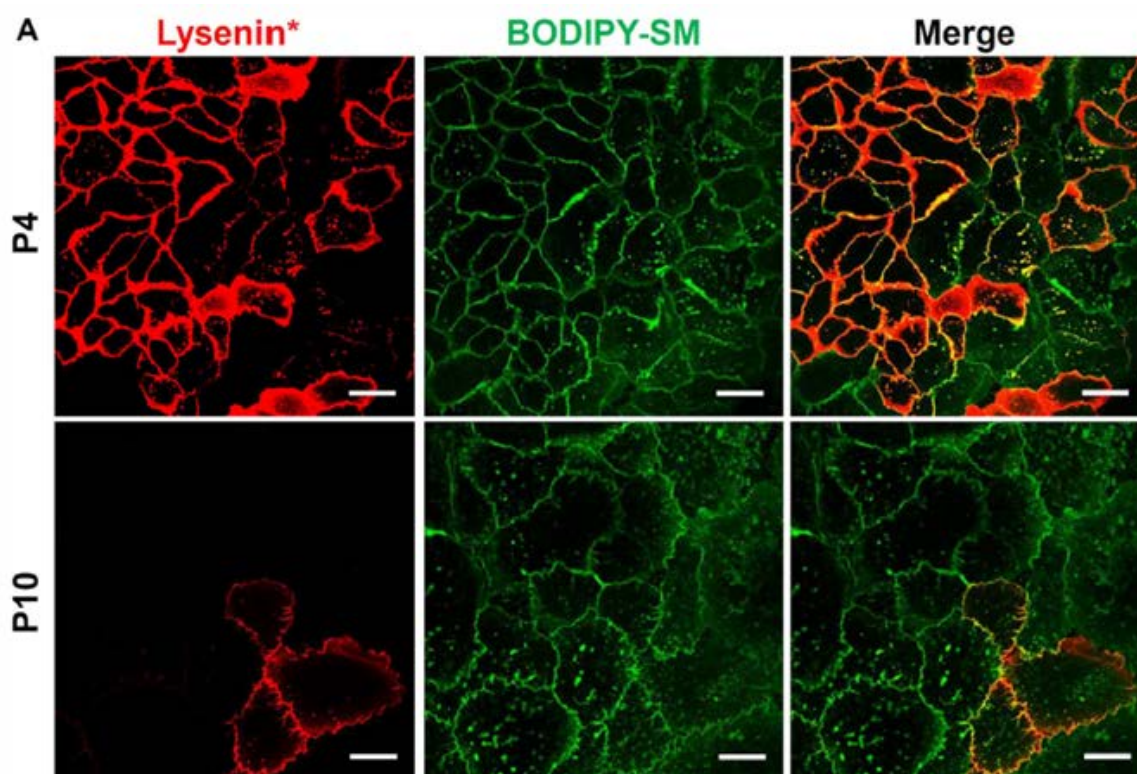
На база на проведените изследвания на влиянието на ROCK киназния инхибитор Y27632 върху пролиферативния капацитет на нормални и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити може да се заключи, че използването на този инхибитор води до избягване на навлизането на нормалните клетки в състояние на репликативен сенесценс, докато при имортализирани кератиноцити инхибирането на ROCK киназите чрез Y27632 не води до промени в пролиферативния капацитет на клетките. По отношение на сенесцентния маркер SA $\beta$ Gal, при нормалните кератиноцити, третирани с 10  $\mu\text{M}$  Y27632, процентното съдържание на положителните за този маркер клетки се запазваше под 20% за целия период на експеримента, докато при контролни, нетретирани кератиноцити, беше наблюдавано много по-бързо натрупване на SA $\beta$ Gal-позитивни клетки, което корелираше с намаления пролиферативен капацитет на клетките.

***Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс***

Изпълняването на бариерната функция на кожата изисква правилно поддържане на епидермалната хомеостаза, което включва пролиферация, миграция и диференциация на кератиноцитите, като подмяната на епидермалните клетки се забавя значително при възрастните индивиди [178, 179]. Възприемането на информация от заобикалящата среда и последващия адаптивен отговор на клетката се осъществява посредством плазмената мембрана на кератиноцитите, чрез активирането на сигнални рецептори или чрез адхезивни трансмембранни белтъци. Интересно е, че рецепторите и адхезивните белтъци се смята, че се локализируют в специализирани области на мембраната, където някои от тях се обединяват в платформи, контролиращи пролиферацията, диференциацията и миграцията на клетките. Предполага се, че именно тези платформи в клетъчната мембрана са отговорни за проявата на аномални фенотипи при човешки кератиноцити и промяната на функциите на епидермалната бариера [180, 181]. Поради това, ние си поставихме за задача да установим дали в хода на настъпване на репликативен сенесценс не настъпват промени в липидните домени в плазмената мембрана на кератиноцитите и как това се отразява на функционалността на тези структури.

Подходите, използващи флуоресцентни проби като lysenin\*, theta\*, BODIPY-SM, за първи път са приложени успешно за визуализацията на субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на еритроцити. Експерименталните процедури се основават или на включване в мембраната на екзогенни липидни аналози като BODIPY-SM [182, 183] или на анализ на ендогенния сфингомиелин или холестерол с помощта на нетоксични фрагменти на lysenin [184] или theta токсин [185], които са придобили флуоресценция при фузия с mCherry и се означават съответно като lysenin\* и theta\*. Първоначално разработените методологии за визуализация на липидните домени чрез флуоресцентни маркери са създадени с помощта на еритроцитни мембрани, които за разлика от мембраната на кератиноцити, са гладки и лишени от нагъвания, и поради това са удобен модел за изучаването на мембранни домени. Впоследствие тези методики бяха адаптирани за кератиноцитни мембрани, при които фокусирането задължително трябва да бъде осъществено върху клетъчната мембрана, която е прикрепена към дъното на културалните съдове, тъй като в резултат на адхезията на клетката към дъното на съда се губят част от неравностите в мембраната.

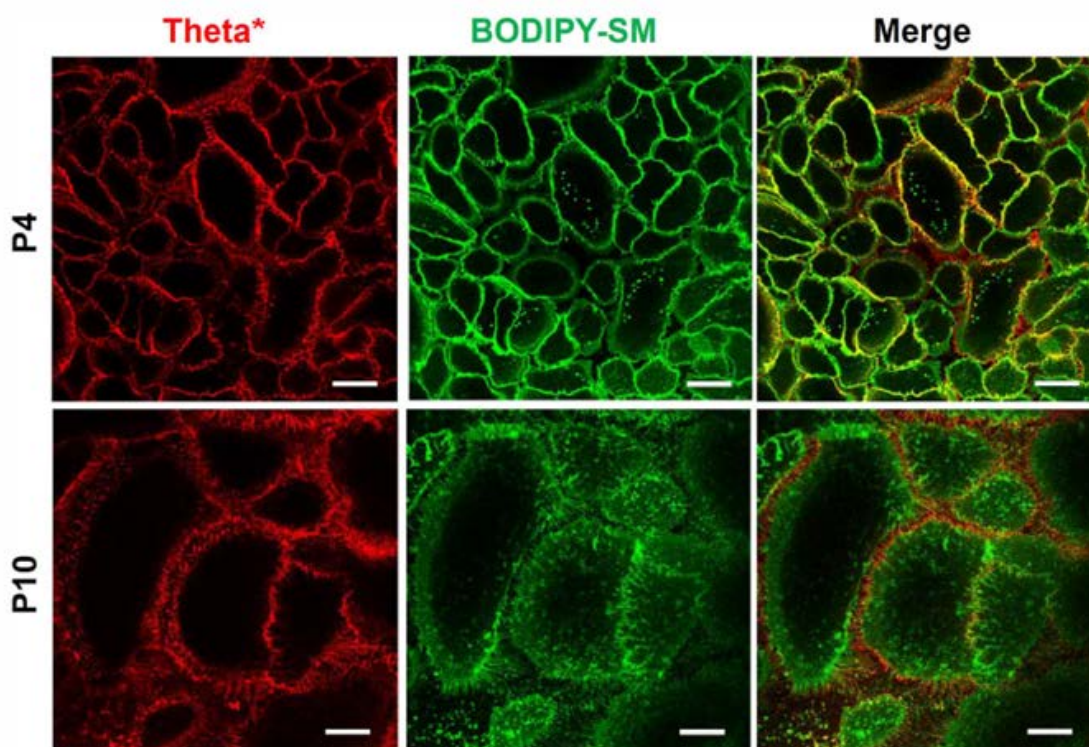
С цел определяне на функционалното значение на липидните субмикрометрични домени за процесите на клетъчно стареене, домоите бяха визуализирани при нормални кератиноцити при нарастващо удвояване на клетъчната популация. Репликативен сенесценс беше предизвикван в кератиноцитната култура посредством поддържането ѝ като пролиферираща култура, като от изключелно значение беше пасажирването да се осъществи преди достигането на конfluентност на културата, за да се избегне необратимия арест и крайна диференциация на кератиноцитите, настъпващи при достигането на конfluентност [167].



**Фигура 10.** Визуализация на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в клетъчната мембрана на нормални човешки кератиноцити.

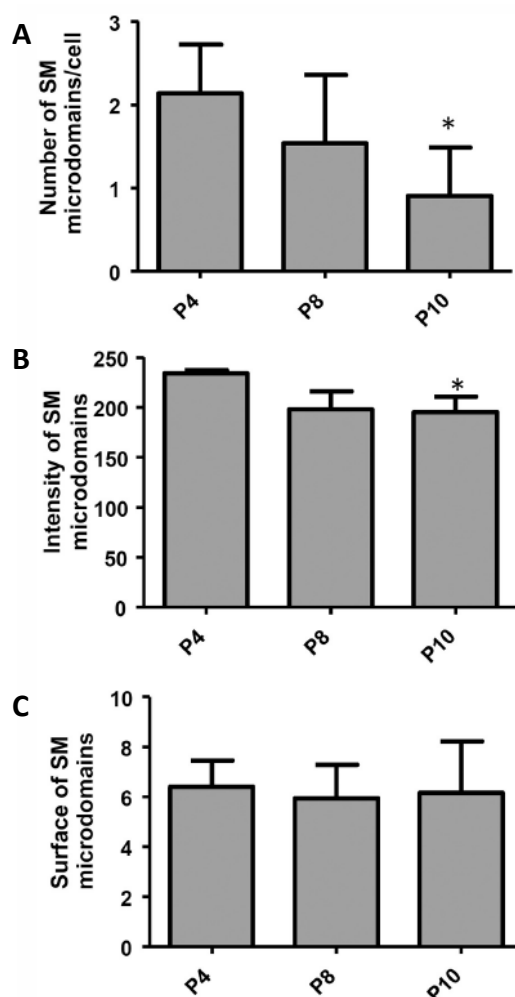
За визуализацията на богатите на сфингомиелин домени в плазмената мембрана беше използване маркиране на ендогенния сфингомиелин с lysenin\* и включване на екзогенен BODIPY-SM в мембраната (фигура 10). При ранни пасажи на културата (P4) беше установен значителен брой на домените, в които чрез lysenin\* се визуализираше ендогенния сфингомиелин, а също така и значителен брой области в мембраната, към които се привличаше екзогенния аналог на сфингомиелина BODIPY-SM. Но при маркирането на сенесцентни нормални кератиноцити (P10) броят на домените, визуализирани с lysenin\*, беше значително по-малък от наблюденията при ранни пасажи на културата. Интересното в случая е, че плазмената мембрана и по-точно специфични области в нея, запазваха способността си да привличат екзогенния сфингомиелин тъй като запазваха способността си да привличат BODIPY-SM. В допълнителни експерименти беше установено, че привличането на екзогенен сфингомиелин към тези липидни домени е чувствително към отстраняването на холестерола от мембраната, като беше установено, че отстраняването на холестерола посредством третиране с метил- $\beta$ -циклодекстрин (M $\beta$ CD) води до значителна загуба на домени, привличащи BODIPY-SM.

Друго интересно наблюдение беше, че при късните пасажи на културата, клетките запазващи маркирането на ендогенен сфингомиелин с lysenin\*, са онези с относително добре запазена морфология, т.е. пролифериращите кератиноцити останали в културата, докато клетките, показващи характерните за сенесценса морфологични черти, губеха богатите си на сфингомиелин домени, но запазваха способността си да привличат екзогенен BODIPY-SM.



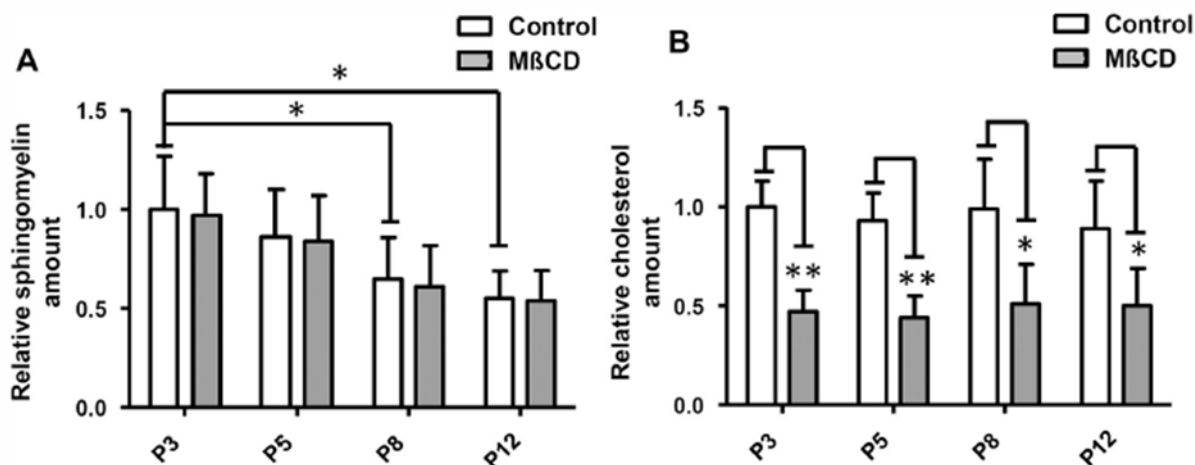
**Фигура 11. Визуализация на богатите на холестерол субмикрометрични липидни домени в клетъчната мембрана на нормални човешки кератиноцити.**

При визуализацията на богатите на холестерол субмикрометрични домени за маркиране на ендогенния холестерол беше използван  $\theta^*$ , като същевременно беше осъществено и маркиране с BODIPY-SM, за да се установи до каква степен се припокриват тези два типа липидни домени в мембраната на нормални човешки кератиноцити (фигура 11). За разлика от ендогенния сфингомиелин, ендогенния холестерол в мембраната се запазваше, като клетките, както от ранните (P4), така и от късните (P10) пасажи на културата запазваха в значителна степен богатите на холестерол субмикрометрични домени. Дори и при клетки с характерната за сенесцентни клетки морфология се запазваха богатите на холестерол домени, като значителна част от тях също така се ко-локализираха с домовете, привличащи екзогенния BODIPY-SM. Последното наблюдение допълнително потвърждава хипотезата ни, че привличането на екзогенен сфингомиелин (в случая аналога BODIPY-SM) към специфични области в плазмената мембрана се обуславя от присъствието и количеството на холестерола в мембраната. Запазването на богатите на холестерол субмикрометрични домени при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс също така предполага, че тези домени не са свързани с настъпващите морфологични и биохимични изменения в клетката, за разлика от богатите на сфингомиелин домени, които значително намаляват при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.



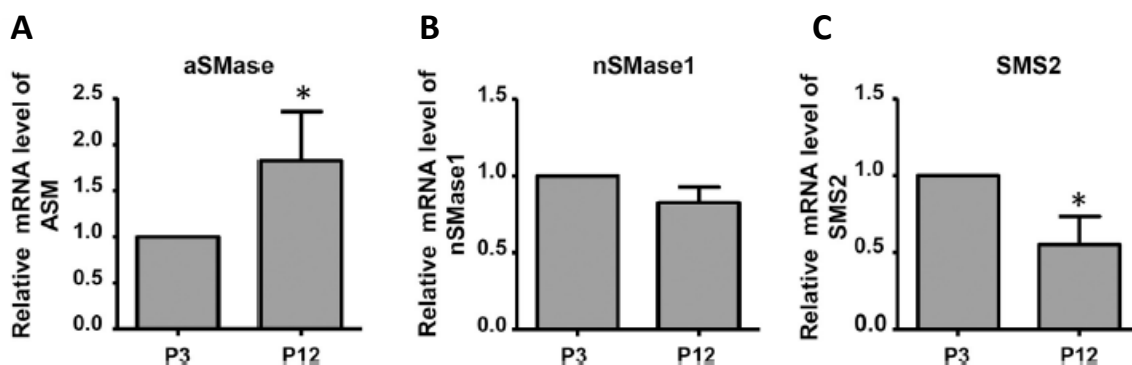
**Фигура 12. Брой и интензитет на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити.**

Посредством специална обработка на получените изображения за визуализация на богатите на сфингомиелин домени, чрез маркиране на ендогенния сфингомиелин с Iysenin\*, беше получена информация за относителния брой, интензитета и площта на тези липидни домени (фигура 12). По отношение на броя на домоените (фигура 12A), в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални кератиноцити беше установена загуба на домени, като същевременно намаляваше и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени (фигура 12B). Интересно е, че относителната площ на тези домени не се променяше в хода на настъпване на репликативен сенесценс (фигура 12C). Необходими са допълнителни експерименти, които да установят причините за запазването на площта на богатите на сфингомиелин домени, независимо от установената загуба на подобен тип липидни рафтове (на база на намаления им брой и интензитет).



**Фигура 13.** Относителни нива на сфингомиелин (А) и холестерол (В) при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.

С цел да се определи количественото съдържание на тоталния сфингомиелин и холестерол в мембраната беше осъществена екстракция на тоталното количество липиди, последвано от анализ на съдържанието на сфингомиелин и на холестерол чрез валидирани търговски китове. По отношение съдържанието на сфингомиелин се установи намаляване на съдържанието на сфингомиелин с напредването на културата, като премахването на холестерола от мембраната посредством третиране с МβCD не водеше до значителни изменения в количеството сфингомиелин (*фигура 13А*). Когато беше анализирано количественото съдържание на холестерол при нормални кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс не бяха установени значителни разлики между ранните (P3) и късните (P12) пасажи на културата, като относителното съдържание на холестерол се запазваше (*фигура 13В*). Дори при извличането на холестерола от мембраната, посредством третиране с МβCD, не бяха наблюдавани разлики в относителното му съдържание при клетките от различни пасажи.



**Фигура 14.** Нива на експресия (иРНК) на кисела сфингомиелиназа (aSMase) (А), неутрална сфингомиелиназа 1 (nSMase1) (В) и сфингомиелин синтаза 2 (SMS2) (С) при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.

Установеното намаляване на съдържанието на сфингомиелин в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити ни наведе на мисълта, че тази промяна може да се дължи или на намален синтез, или на повишено разграждане на този сфинголипид, или да е резултат и от двата процеса. Поради това беше осъществен количествен анализ на нивата на експресия на три ключови белтъка, свързани със синтеза и разграждането на сфингомиелин.

Първият изследван белтък беше киселата сфингомиелиназа (EC:3.1.4.12) (aSMase), катализираща хидролизата на сфингомиелина до церамид и фосфохолин. Този ензим представлява гликопротеин, който в клетката се локализира основно в лизозомите, но може и да се релокализира на повърхността на клетката при излагане на клетката на действието на различни стресори [186], като механизма на това изнасяне на aSMase остава неизяснен. Освен че действа при вътреклетъчното разграждане на сфингомиелин в лизозомите, aSMase изпълнява определени функции на клетъчната повърхност, включително и в реорганизацията на мембранните микродомени [187]. При нормалните човешки кератиноцити, при настъпването на репликативен сенесценс, се наблюдаваше повишаване на нивата на експресия на aSMase (*фигура 14A*), което индикира повишено разграждане на сфингомиелина, но същевременно може да води и до реорганизация на липидните домени в плазмената мембрана.

Вторият анализиран ензим беше неутрална сфингомиелиназа 1 (EC:3.1.4.12) (nSMase1), която също катализира разграждането на сфингомиелина до церамид и фосфохолин, но се различава по рН оптимума си от aSMase и по зависимостта си от магнезиеви йони за своята активност. Точната биологична роля на nSMase1 не е добре изяснена, но е известно че този ензим е свързан главно с отговора на клетката към различни стресори и последваща сигнална трансдукция [188, 189]. При анализа на нивата на експресия беше установено, че за разлика от aSMase, нивата на иРНК за nSMase1 се запазваха относително постоянни при човешки кератиноцити, в хода на настъпване на репликативен сенесценс (*фигура 14B*).

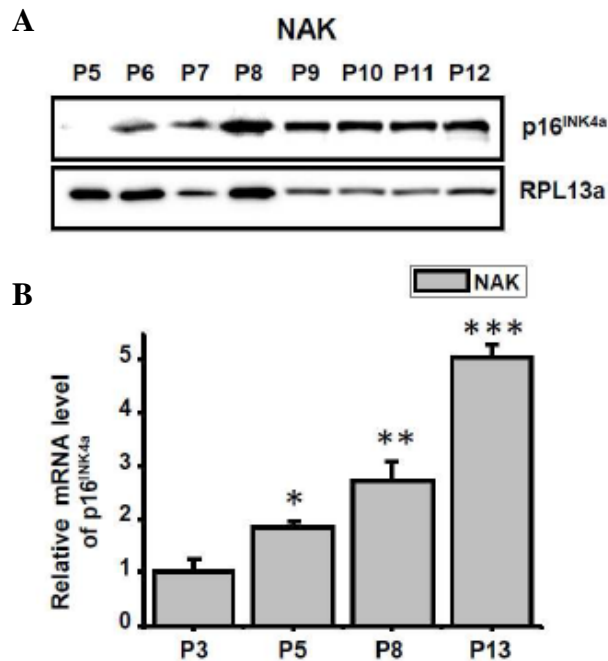
Третият белтък, чиято експресия беше анализирана, е сфингомиелин синтаза 2 (EC:2.7.8.27) (SMS2), която катализира получаването на сфингомиелин от церамид и фосфатидилхолин, като в тази реакция се получава и ДАГ. Този ензим в клетката е локализиран преобладаващо в плазмената мембрана [190] и участва главно в регулацията на хомеостазата на различни сигнални липиди и последващата сигнална трансдукция в клетката [191]. При настоящите експерименти, свързани със стареенето на нормални човешки кератиноцити, беше установено намаляване на нивата на експресия на SMS2 в хода на възникване на репликативен сенесценс (*фигура 14C*).

На база на получените резултати за експресията на тези три ключови ензими, свързани с метаболизма на сфингомиелин в клетката, може да бъде хипотезирано, че установеното намаляване на броя и на интензитета на богатите на сфингомиелин домени е възможно да се дължи както на усилено разграждане под действието на aSMase, така и да е резултат от намален синтез на сфингомиелин (поради намалената експресия на SMS2), или да е обусловено от цялостно изменение на хомеостазата на сфингомиелин в клетъчната мембрана. Поради свързаните с ремоделиране на мембраната ефекти на aSMase е възможно наблюдаваното запазване на относителната



площ на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени да се дължи на повишените нива на експресия на този ензим.

Необходими са допълнителни експерименти, които да изяснят как наблюдаваните промени в експресията на ключови ензими, свързани със синтеза и разграждането на сфингомиелин, корелират с наблюдаваните изменения в броя и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.



**Фигура 15.** Нива на експресия на сенесцентния маркер p16<sup>INK4a</sup> при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.

С цел да бъде допълнително потвърдено, че изследваните нормални човешки кератиноцити от късни пасаж (P8 и P13) наистина се навлезли в състояние на необратим арест в клетъчния цикъл и съответно репликативен сенесценс, посредством Western блот анализ и RT-qPCR бяха определени нивата на експресия на белтъка p16<sup>INK4a</sup>, който действа като инхибитор на циклин-зависимите кинази и е често използван сенесцентен биомаркер [192]. Нивата на експресия на p16<sup>INK4a</sup>, както на ниво белтъчно съдържание (*фигура 15A*), така и на ниво иРНК (*фигура 15B*) се повишаваха при навлизането на нормалните човешки кератиноцити в състояние на репликативен сенесценс, което допълнително потвърждава, че кератиноцитните култури от късен пасаж наистина се намираха в състояние на необратим арест в клетъчния цикъл.

На база на проведената анализи на структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в мембраната на нормални човешки кератиноцити в хода на настъпването на репликативен сенесценс може да се заключи, че промените в липидния състав засягат количеството сфингомиелин и домените, които са обогатени с този липиден компонент на мембраната. Липсата на изменение както на количеството холестерол, така и в броя на обогатените на холестерол субмикрометрични домени в плазмената мембрана предполага, че функционалната

роля на тези домени при нормални кератиноцити не е свързана с настъпването на репликативен сенесценс, но това не изключва възможността тези домени да се променят при настъпването на други форми на клетъчно стареене.

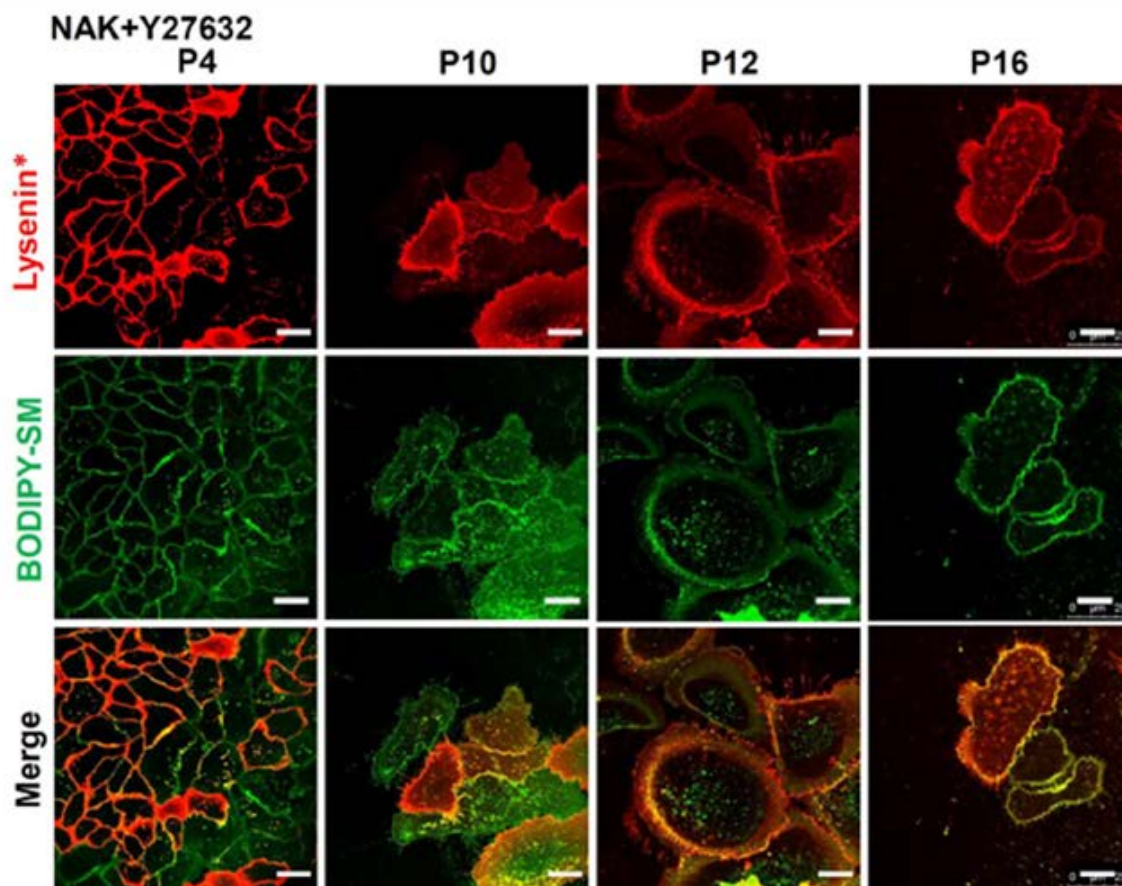
***Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, третирани с инхибитора Y27632, в хода на настъпване на репликативен сенесценс***

С цел да бъде установено дали предотвратяването на клетъчното стареене посредством ROCK киназния инхибитор Y27632 подпомага и запазването на структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на кератиноцитите, беше проведена визуализация на тези липидни структури с помощта на lysenin\* и BODIPY-SM (*фигура 16*).

Нормални човешки кератиноцити, отглеждани в присъствието на 10  $\mu$ M Y27632 бяха маркирани с lysenin\* (за ендогенния сфингомиелин) и BODIPY-SM (за екзогенния сфингомиелин) като беше използвана същата методология, използвана при визуализацията на субмикрометрични липидни домени при нормални, нетретирани кератиноцити. Визуализация на богатите на холестерол субмикрометрични домени не беше осъществена, поради получените резултати при нормални, нетретирани кератиноцити (*фигура 11*), при които тези домени се запазваха в хода на индукция на репликативен сенесценс.

При ранните пасажи (P4) на третираните с ROCK инхибитора Y27632 нормални кератиноцити се установиха значителен брой домени в плазмената мембрана, които се маркираха за ендогенен сфингомиелин (чрез lysenin\*) и привличаха екзогенния сфингомиелин (BODIPY-SM), като голяма част от тези домени също така се и припокриваха (*фигура 16, първа колона*). При по-късните пасажи на културата (P10 и P12) се наблюдаваше намаляване на броя на домените в мембраната, привличащи екзогенния сфингомиелин (BODIPY-SM), а също така и на домените, които се маркираха за ендогенен сфингомиелин чрез lysenin\* (*фигура 16, втора и трета колона*). Същевременно се наблюдаваше и значително припокриване между маркираните с lysenin\* и с BODIPY-SM субмикрометрични липидни домени.

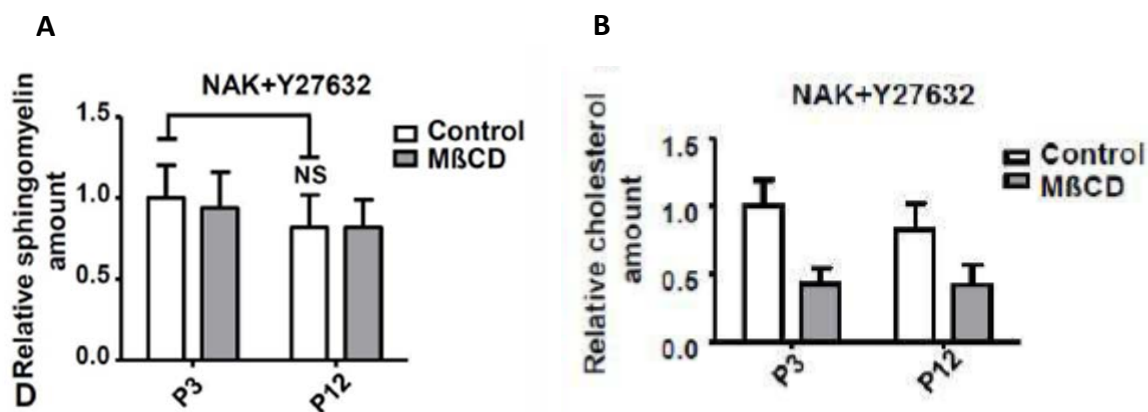
Когато визуализация беше проведена с клетки от много късен пасаж (P16) се наблюдаваха както липидни домени, които се маркираха с lysenin\*, а също така и домени, които привличаха екзогенния BODIPY-SM (*фигура 16, последна колона*). Подобно на по-ранните пасажи на третираните с ROCK инхибитора Y27632, маркираните с lysenin\* и BODIPY-SM субмикрометрични липидни домени отново показваха значителна степен на припокриване.



**Фигура 16.** Визуализация на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на нормални кератиноцити, третирани с 10  $\mu$ M Y27632.

Третирането на нормални човешки кератиноцити с инхибитора на ROCK киназите Y27632 водеше до запазване на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на кератиноцитите, визуализиращи се с помощта на lysenin\* (фигура 16, *Lysenin\**), като същевременно се запазваше и способността на определени домени в мембраната за привличане на екзогенен BODIPY-SM (фигура 16, *BODIPY-SM*). Значителната степен на припокриване между липидните домени (фигура 16, *Merge*), маркиращи се с lysenin\* и с BODIPY-SM, предполага запазване на функционалността на плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити в резултат на третиране с ROCK киназния инхибитор Y27632.

Третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 води не само до запазване на пролиферативния потенциал на клетка и до избягване на настъпването на репликативен сенесценс, но същевременно подпомага и запазването на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана. Запазването на тези структури в плазмената мембрана вероятно е свързано и със запазване на способността за сигнална трансдукция през тях, но тази хипотеза е необходимо да бъде изследвана допълнително.



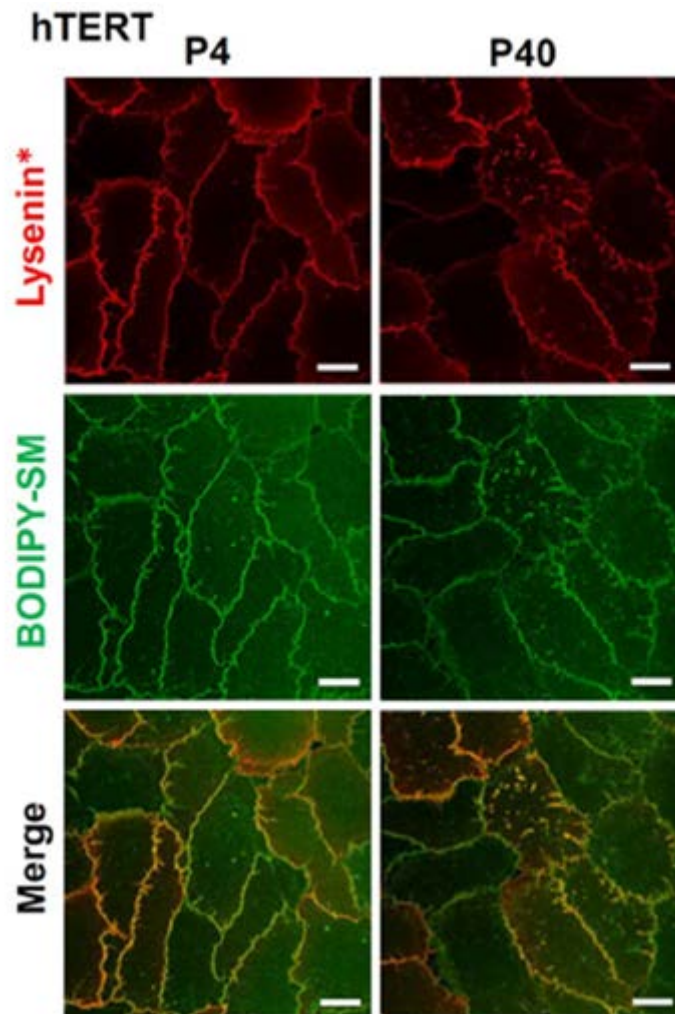
Фигура 17. Относителни нива на сфингомиелин (А) и на холестерол (В) при нормални човешки кератиноцити, третиран с инхибитора Y27632.

Допълнително беше проведен количествен анализ на съдържанието на сфингомиелин и на холестерол при нормални човешки кератиноцити, третиран с инхибитора Y27632. По отношение на съдържанието на сфингомиелин не беше установена статистически значима разлика между клетките от ранни пасажи (P3) и тези от късни пасажи (P12) на културата (*фигура 17А*), което предполага че третирането на нормални човешки кератиноцити с инхибитора Y27632 подпомага запазването на количеството сфингомиелин в клетката. По отношение на съдържанието на холестерол също не беше установена разлика между клетките от ранни (P3) и късни пасажи (P12) (*фигура 17В*), като дори и при извличане на холестерола от мембраната посредством третиране с MβCD не беше установена разлика в съдържанието на холестерол.

На база на получените резултати за състава и структурата на липидните домени при нормални кератиноцити, третиран с ROCK киназния инхибитор Y27632, може да се направи извода, че третирането на кератиноцитите с Y27632 не само предотвратява настъпването на репликативен сенесценс, но също така запазва структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на клетките.

### ***Промени в структурата и състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани човешки кератиноцити***

С цел да бъде установено дали при hTERT-имортализирани човешки кератиноцити настъпват промени в богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени при продължително культивиране на клетките, беше осъществена визуализация на тези домени с Iysenin\* (ендогенен сфингомиелин) и BODIPY-SM (екзогенен сфингомиелин).

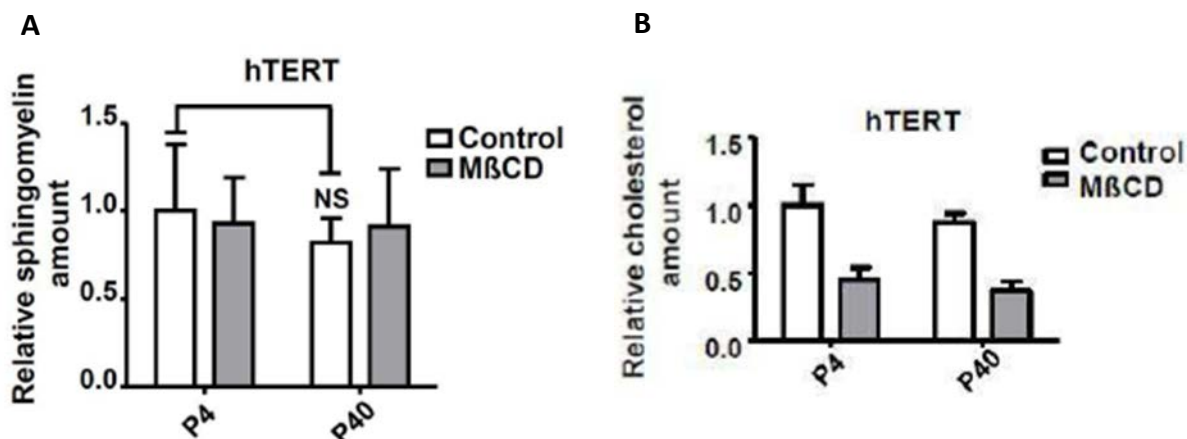


**Фигура 18. Визуализация на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализирани кератиноцити.**

При анализирането на ендогенния сфингомиелин чрез визуализация с lysenin\* беше установено, че при hTERT-имортализираните кератиноцити както от ранни (P4), така и от късни пасажи (P40) се запазва богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени (*фигура 18, Lysenin\**). Същевременно специфични области запазваха способността си да привличат екзогенния BODIPY-SM както при ранни пасажи (P4), така и при късни пасажи (P40) на културата (*фигура 18, BODIPY-SM*). Значителна част от наблюдаваните субмикрометрични липидни домени също така се припокриваха (*фигура 18, Merge*), което предполага запазване на функционалността на плазмената мембрана при hTERT-имортализираните човешки кератиноцити.

На база на тези резултати може да се заключи, че при hTERT-имортализираните човешки кератиноцити, неподатливи към настъпването на репликативен сенесценс, не се наблюдават изменения в структурата, броя и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени (на база на маркирането с lysenin\*), като се запазва и способността на мембраната да привлича екзогенен BODIPY-SM. Наблюдаваните различия между нормални, нетретираните кератиноцити и hTERT-имортализирани кератиноцити предполагат, че наблюдаваните промени вероятно се

дължат на настъпването на репликативен сенесценс при нормалните клетки и е възможно тези изменения да са както причина, така и следствие от клетъчното стареене.



**Фигура 19. Относителни нива на сфингомиелин (А) и на холестерол (В) при hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.**

За потвърждаване на резултатите от визуализацията на субмикрометричните липидни домени беше определено относителното количество на сфингомиелин и холестерол при hTERT-имортализирани кератиноцити от ранни и късни пасажи. По отношение съдържанието на сфингомиелин не беше установена статистически значима разлика между клетките от ранни (P4) и късни (P40) пасажи на културата, като екстракцията на холестерол чрез третиране с MβCD не доведе до промяна в относителното съдържание на сфингомиелин (*фигура 19A*). При количественият анализ на съдържанието на холестерол също не беше установена статистически значима разлика между hTERT-имортализирани кератиноцити от различни пасажи, както при контролни клетки, така и при екстракция на холестерола чрез третиране с MβCD (*фигура 19B*).

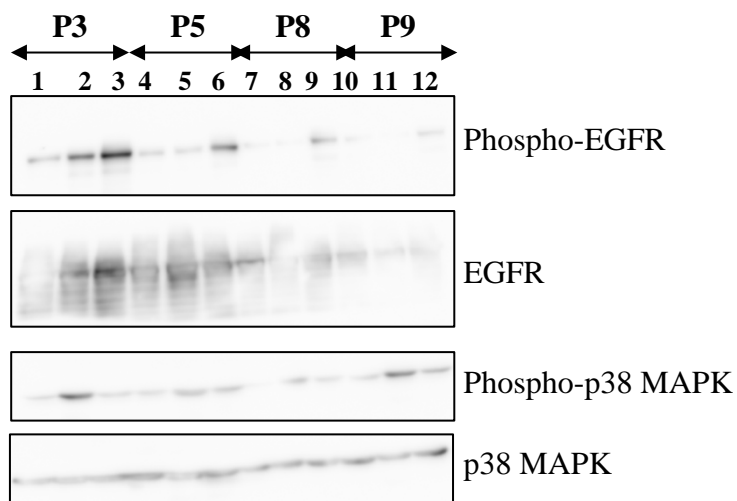
На база на данните за структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични домени в плазмената мембрана на hTERT-имортализираните кератиноцити може да заключим, че при продължително поддържане на клетките в условията на пролиферираща култура не настъпват промени в структурата на богатите на сфингомиелин домени, като същевременно се запазва и относителното съдържание на сфингомиелин и на холестерол на клетките. Наблюдаваните различия в структурата и състава на богатите на сфингомиелин домени между нормални и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити, предполагат, че дефекта в сенесцентната програма (т.е. експресията на p16<sup>INK4a</sup>) при имортализираните клетки подпомага запазването на структурата и състава на липидните домени в плазмената мембрана, но са необходими допълнителни експерименти, които да изяснят точните механизми за това.

Наблюдаваното запазване на богатите на сфингомиелин липидни домени при hTERT-имортализирани човешки кератиноцити при продължително поддържане на културата в пролиферативно състояние не изключва възможността да настъпват

промени в други мембранни структури, включително и такива с преобладаващо липидна природа, които обаче не бяха обект на изследване при настоящата дисертационна работа.

### **Western блот анализи**

За да бъде установено дали и как промените в субмикрометричните липидни домени в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити повлияват основни сигнални пътища в клетката беше проведен Western блот анализ на ключови компоненти на сигнални пътища, за които е известно от научната литература, че се повлияват от структурата и състава на клетъчната мембрана и/или участват в основните сигнални пътища в клетката, активиращи се от компоненти в плазмената мембрана.



**Фигура 20. Western блот анализ на EGFR и p38 MAPK при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс.**

Легенда: 1,4,7,10 – контролни, нетретиранни клетки; 2,5,8,11 – клетки, третирани с MβCD (7.5 mM); 3,6,9,12 – клетки, третирани с EGF (10 ng/mL).

Рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR) представлява рецепторна тирозин киназа, сигнализацията през която стимулира клетъчния растеж, оцеляване и миграция. Различната локализация на белтъка, включително и в плазмената мембрана, води до модулирането на множество сигнални пътища, включително и на p38 MAPK сигналния път [193]. p38 MAPK е член на семейството на митоген-активираните серин/треонин протеин кинази (MAPK) и също е ключов регулаторен белтък в клетката, участващ в отговора на стресори и при възпалителните реакции, но също така действа и като регулатор на пролиферацията, диференциацията и оцеляването на определени клетъчни типове [194].

Посредством Western блот анализ при нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс беше установено понижаване на нивата както на активната (фосфорилирана) форма на EGFR, така и на общото количество EGFR в клетката (*фигура 20*). Съгласно литературните данни, рецептора EGFR се асоциира с богатите на холестерол субмикрометрични липидни домени, поради което

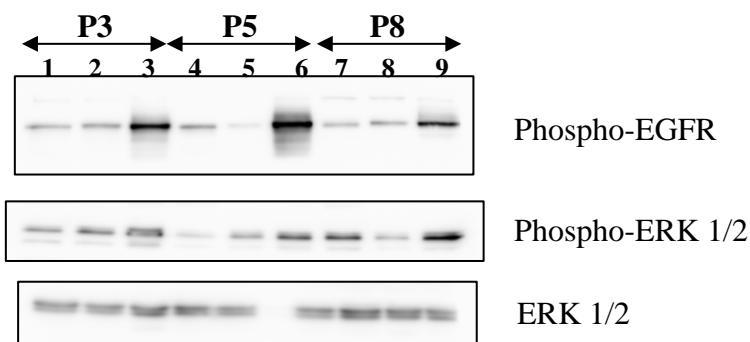
количеството на ензима и неговата активност бяха определени и при третиране с М $\beta$ CD (*фигура 20, стартове 2,5,8,11*), като отново беше установена както загуба на активната форма на EGFR, така и на общото количество на белтъка в клетката. Количеството и активността на EGFR бяха определени и при стимулиране на рецептора с неговия лиганд EGF (10 ng/mL), като при настъпването на репликативен сенесценс (P8 и P9) отново беше наблюдавано намалено количество на активната форма на тази рецепторна тирозин киназа, а също така и силно понижаване на общото количество на ензима (*фигура 20, стартове 3,6,9,12*). Обобщено резултатите за активността и количеството на EGFR показват, че при нормални човешки кератиноцити при настъпването на репликативен сенесценс се наблюдава както загуба на активността на тази рецепторна тирозин киназа, така и на общото ѝ количество, независимо от запазването на богатите на холестерол субмикрометрични домени в плазмената мембрана на клетката, към които е известно от литературата, че се асоциира.

При анализа на активността и количеството на p38 MAPK посредством Western блот анализ беше установено, че в хода на настъпване на репликативен сенесценс количеството на активната (фосфорилирана) форма на тази серин/треонин киназа намалява, но дори и при човешки кератиноцити от късни пасажии (P8 и P9) количеството на активната форма беше достатъчно високо и тя беше успешно детектирана чрез Western блот (*фигура 20*). По отношение на общото количество на p38 MAPK беше установено незначително намаляване на относителното съдържание на този белтък в хода на настъпване на репликативен сенесценс. При екстракция на холестерола от мембраната чрез третиране с М $\beta$ CD се наблюдаваше повишаване на нивата на активната форма на p38 MAPK, но не и на общото количество на ензима (*фигура 20, стартове 2,5,8,11*), което предполага активация на този сигнален път при промени в структурата на клетъчната мембрана. Точният механизъм, отговорен за повишаването на активността на p38 MAPK при извличане на холестерола от мембраната, е неизяснен и неговото идентифициране изисква провеждането на допълнителни експерименти. При стимулация на кератиноцитите с епидермалния растежен фактор (10 ng/mL) не беше наблюдавана промяна както по отношение на активната форма, така и в общото количество на p38 MAPK (*фигура 20, стартове 3,6,9,12*). В обобщение, в хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити се наблюдаваше намаляване на активността на p38 MAPK, но дори и при сенесцентни клетки успешно бе детектирана активната форма на ензима, макар и в изключително ниски нива. Същевременно в хода на настъпване на сенесценс беше установено и незначително снижаване на общото количество на тази протеин киназа.

Ако резултатите за EGFR и p38 MAPK бъдат разгледани съвместно може да се заключи, че при настъпването на репликативен сенесценс се загубва активността и на двата ензима, като при сенесцентни кератиноцити на практика не се детектираше активната форма на EGFR, освен при стимулиране на клетките със съответния лиганд (EGF), докато нивата на активната форма на p38 MAPK се запазваха относително високи, но е спорно доколко при запазената активност на тази протеин киназа е достатъчна за осъществяването на нормалните физиологични функции, свързани с този ензим.



Освен загуба на активност по отношение на EGFR беше установено намаляване на общото количество на тази тирозин киназа, което е възможно да се дължи както на намален синтез или на усилено разграждане на самия белтък, но са необходими допълнителни експерименти, които да установят точната причина. Общото количество на p38 MAPK също беше понижено, но намаляването на нивата на тази протеин киназа не беше статистически значимо.



**Фигура 21. Western блот анализ на EGFR и ERK1/2 при нормални човешки кератиноцити, третирани с ROCK киназния инхибитор Y27632.**

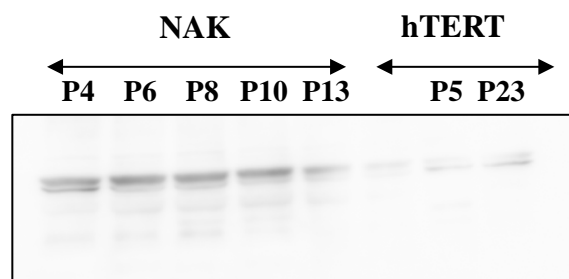
Легенда: 1,4,7 – контролни, нетретирани клетки; 2,5,8,11 – клетки, третирани с MβCD (7.5 mM); 3,6,9,12 – клетки, третирани с EGF (10 ng/mL).

Предвид загубата на експресия и на активност на EGFR, наблюдавани в хода на настъпване на сенесценс при нормални кератиноцити, нивата и активността на тази рецепторна тирозин киназа бяха изследвани и при нормални човешки кератиноцити, третирани с ROCK киназния инхибитор Y27632. При Western блот анализа на третирани с Y27632 нормални кератиноцити от възрастен индивид беше установено запазване в значителна степен на нивата на активната форма на EGFR (*фигура 21*), а също така и на тоталното количество на този белтък (данните не са представени). Същевременно при екстракцията на холестерола от мембраната чрез третиране с MβCD не се наблюдаваше статистическо значимо снижаване на нивата на активната форма на EGFR (*фигура 21, стартове 2,5,8*), а при стимулиране на рецептора с неговия лиганд EGF се наблюдаваше активация, като при късните пасажи на третираните с инхибитора Y27632 кератиноцити нивата на активната форма на EGFR (*фигура 21, стартове 3,6,9*) бяха съизмерими с наблюдаваните при ранни пасажи на нетретирани кератиноцити (*фигура 20, стартове 3,6,9,12*). Това наблюдение предполага, че функционалността на рецепторната тирозин киназа EGFR при третиране с ROCK инхибитора Y27632 (и съответно репресия на репликативния сенесценс) се запазва, което вероятно способства за запазването на пролиферативния капацитет на клетките.

Освен EGFR бяха изследвани и активността и количеството на MAP киназата ERK 1/2, известна и като p44/p42 MAPK, която подобно на p38 MAPK играе важна роля в редица сигнално-трансдукционни пътища в клетката. ERK1 и ERK2 представляват силно консервативни серин/треонин кинази, част от Ras-Raf-MEK-ERK сигналната каскада, която участва в регулацията на разнообразни процеси в клетката, включително в клетъчната адхезия, прогресията на клетъчния цикъл, клетъчната миграция, оцеляване, диференциация, метаболизъм и транскрипция [195]. Поради високата степен

на хомоложност между двата ензима (84% идентична белтъчна секвенция) и припокриването на биологичните им функции [196], нивата на активност и количеството на тези MAPK кинази бяха определени с помощта на антитела, които разпознават и двете изоформи. При третиране с ROCK инхибитора Y27632 нормални кератиноцити бяха установени сходни нива на експресия на активната форма на ERK1/2 при клетки от ранни (P3) и късни (P8) пасажи (*фигура 21*), като отстраняването на холестерола от мембраната чрез третиране с M $\beta$ CD не водеше до промяна в нивата на активната форма и в общото количество на тези два киназни ензима (*фигура 21, стартове 2,5,8*). При третиране на клетките с EGF се наблюдаваше минимално, но статистически незначимо, повижаване на нивата на активната форма на ERK1/2, но не и на общото количество на ензима (*фигура 21, стартове 3,6,9*). На база на тези резултати може да се заключи, че третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 не води до промяна в активността и нивата на ERK1/2, което предполага запазване и на предаването на сигнала през този сигнално-трансдукционен път.

На база на тези изследвания може да се заключи, че в хода на настъпване на клетъчен сенесценс настъпват промени не само в организацията на плазмената мембрана, но и при сигнализацията, опосредствана от специфични домени в нея. При третирането на нормалните човешки кератиноцити с ROCK киназния инхибитор Y27632 се наблюдава запазване както на активността, така и на количеството на някои от регулаторните белтъци, асоцииращи се с плазмената мембрана или участващи в сигнални каскади, които се медиират от мембранни компоненти. Поради относително малкият набор от сигнални белтъци, които са били анализирани при реализирането на настоящата дисертация, за да бъдат по-детайлно изяснени последствията както от клетъчното стареене, така и от възпрепятстването на този процес чрез специфични химични агенти, е необходимо провеждането на по-мощни изследвания, които да комбинират класически подходи за изучаване на сигналната трансдукция в клетката с достиженията на –омикс технологиите.



**Фигура 22.** Western блот анализ на p16<sup>INK4a</sup> при нормални човешки кератиноцити, третиране с ROCK киназния инхибитор Y27632, и hTERT-имортализирани човешки кератиноцити.

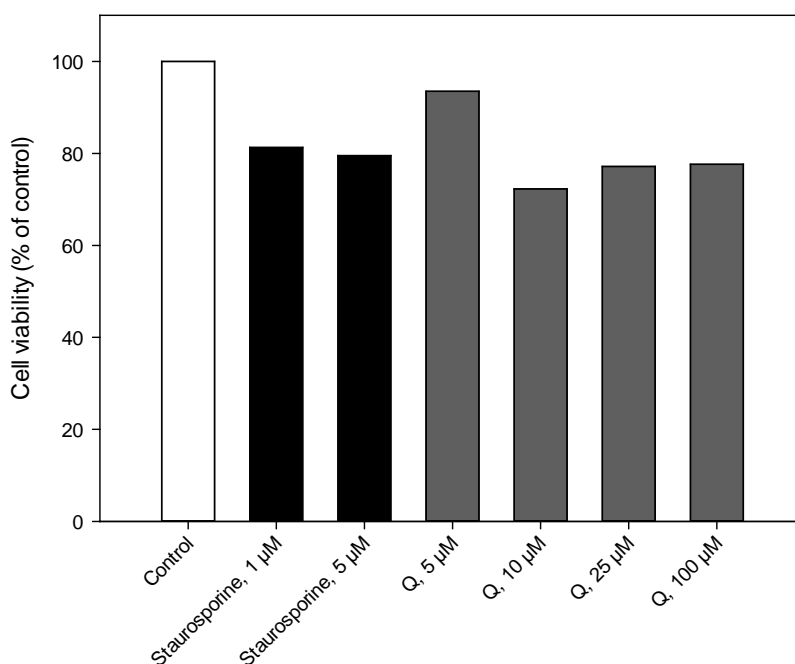
С цел да се потвърди, че наистина третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK киназния инхибитор Y27632 води до избягване на клетъчното стареене, бяха анализирани нивата на експресия на сенесцентния маркер p16<sup>INK4a</sup> при нормални клетки, третиране с този инхибитор (*фигура 22*). Както се и очакваше не беше наблюдавано повишаване на експресията на този сенесцентен маркер при

продължителното култивиране на клетките, като дори при късните пасажи експресията на белтъка се запазваше относително постоянна и сравнима с нивата при ранни пасажи на културата. При hTERT-имортилизираните кератиноцити, които са неспособни да навлязат в състояние на клетъчен сенесценс, не беше установена експресия на p16<sup>INK4a</sup>, което съответства и на информацията в научната литература.

На база на последните анализи може да се заключи, че третирането с инхибитора Y27632 води до запазване на нивата на експресия на инхибитора на циклин-зависимите кинази p16<sup>INK4a</sup> при продължително култивиране на клетките, което е в съответствие с наблюдаваното избягване на клетъчното стареене.

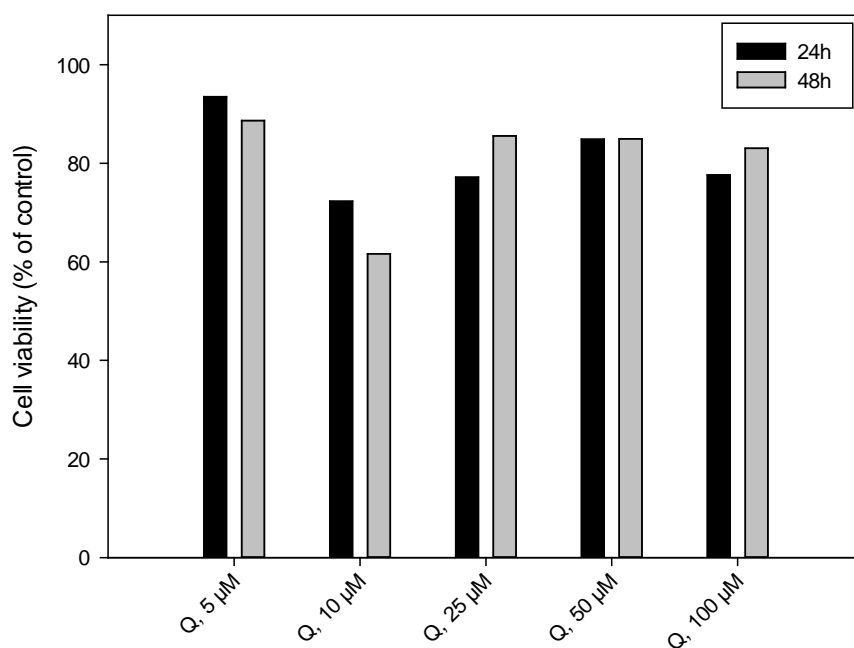
### ***Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки кератиноцити***

За голям брой биологично активни молекули има данни в научната литература, че са способни да повлияват различни регулаторни и сигнални пътища в клетката, които имат отношение към процесите на клетъчна смърт и клетъчно стареене [197]. Значителна част от тези молекули спадат към групата на природните флавоноиди, голяма част от които се определят и като антиоксиданти. Кверцитинът и дихидрокверцитинът представляват два структурно-свързани представители на класа на флавоноидите, като за кверцитина е известно, че може да повлиява редица вътреклетъчни процеси, включително и някои процеси на програмирана клетъчна смърт [198]. Наличната информация относно биологичните ефекти на дихидрокверцитина е силно ограничена и се свежда основно до ефектите му върху сърдечно-съдовата система при моделни организми и при човека [199]. Поради тези причини ние си поставихме за цел да установим ефектите от третиране с тези два антиоксиданта върху преживяемостта и морфологията на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид с идеята тези съединения да бъдат приложени и при експерименти, включващи модулиране на клетъчното стареене.



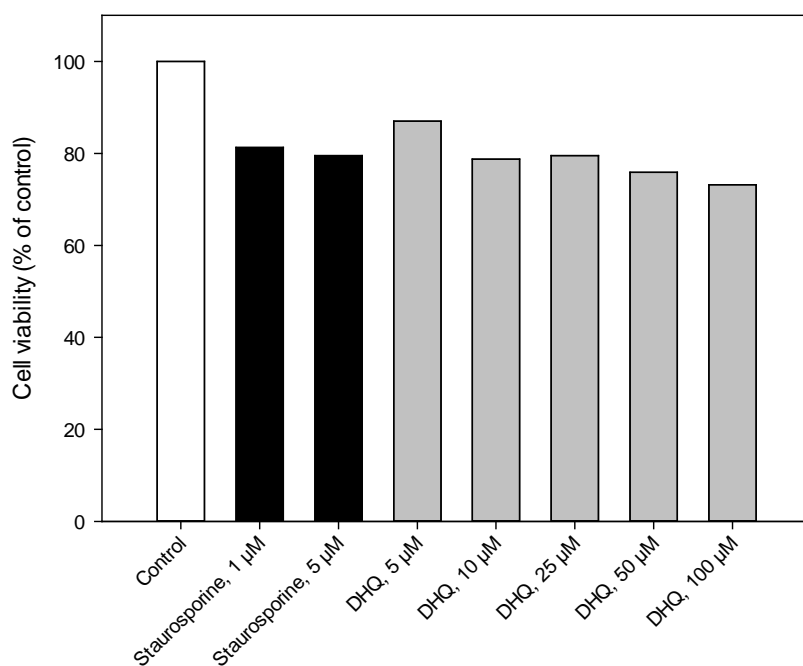
**Фигура 23. Клетъчна преживяемост (MTT тест) на нормални човешки кератиноцити, третираны с нарастваща концентрация на кверцитин (Q) в продължение на 24 часа.**

При третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин (*фигура 23*) беше установено известно намаляване на клетъчната преживяемост, като най-силен инхибиторен ефект беше установен при концентрация 10  $\mu\text{M}$ , но дори и при нея преживяемостта на културата беше над 50% при продължителност на третирането от 24 часа. Най-слабо изразен инхибиторен ефект беше установен при третиране на клетките с 5  $\mu\text{M}$  кверцитин, като при това третиране преживяемостта на клетките е близка до установената за контролни, нетретираны кератиноцити. С цел индукция на апоптоза, нормални човешки кератиноцити бяха третираны със стауроспорин, който представлява неселективен инхибитор на протеин киназите и е добре известен от литературата индуктор на ПКС [200]. При третирането на клетките със стауроспорин беше установено понижаване на клетъчната преживяемост, като е интересно наблюдението, че третирането на кератиноцити с 10  $\mu\text{M}$  кверцитин водеше до по-силен инхибиторен ефект от третиране със 5  $\mu\text{M}$  стауроспорин при продължителност на третирането от 24 часа. При по-продължително третиране на клетките със стауроспорин беше установено засилване на инхибиторния ефект, което водеше до значително намаляване на преживяемостта на културата.



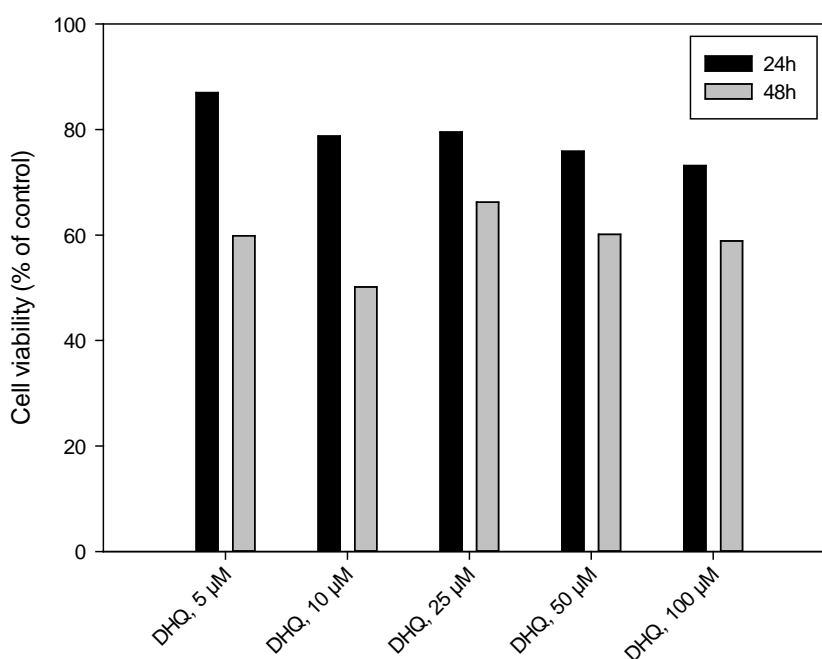
**Фигура 24. Клетъчна преживяемост на нормални човешки кератиноцити, третиран с нарастваща концентрация на кверцитин (Q), при различна продължителност на третирането (24 и 48 часа).**

При увеличаването на продължителността на третирането до 48 часа, при ниски концентрации на кверцитина (съответно 5 µM и 10 µM) беше наблюдаван по-силно изразен инхибиторен ефект в сравнение с третирането с продължителност 24 часа (*фигура 24*). Изненадващо, при по-високи концентрации (съответно 25 µM и 100µM) беше установена по-висока преживяемост на нормалните кератиноцити при по-продължително третиране, докато при третиране на клетките с 50 µM кверцитин не беше установена разлика в преживяемостта при различните периоди на третиране. Наблюдаваното повишаване на клетъчната преживяемост при третиране с високи концентрации на кверцитин (25 µM и 100 µM) може да се дължи на селекция в резултат на третирането на клетки с по-висок пролиферативен потенциал, като същевременно кверцитина води до загуба на клетките с по-нисък пролиферативен потенциал, като тези различия в пролиферативния потенциал могат да бъдат обяснени с хетерогенната природа на изолираните първични кератиноцитни култури, използвани при реализирането на дисертацията.



**Фигура 25. Клетъчна преживяемост (MTT тест) на нормални човешки кератиноцити, третирани с нарастваща концентрация на дихидрокверцитин (DHQ) в продължение на 24 часа.**

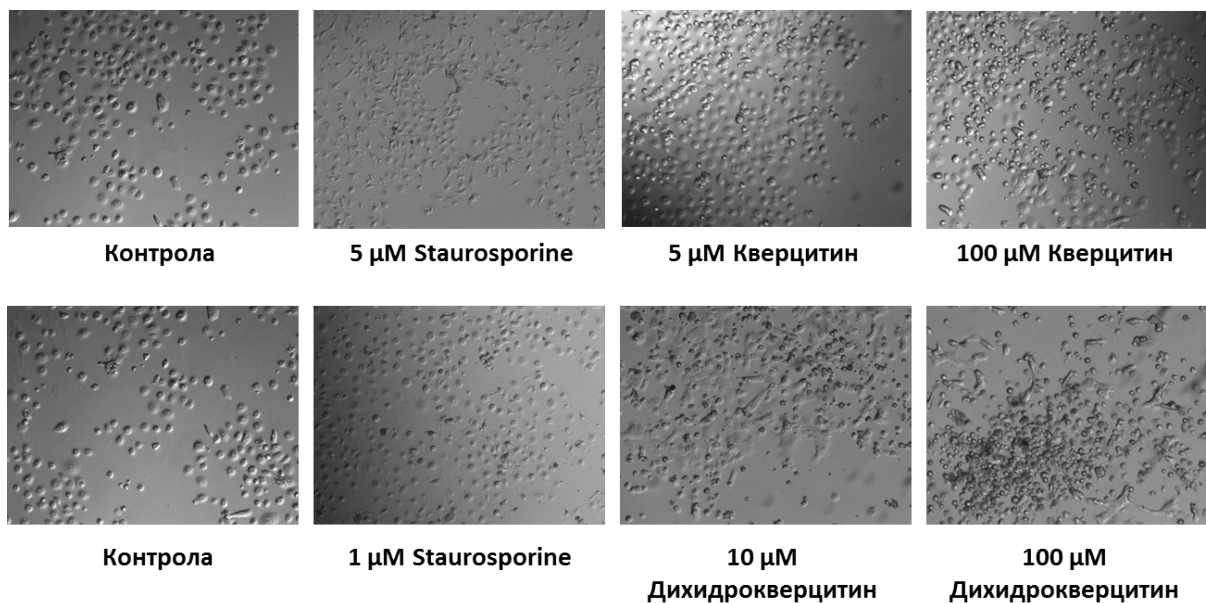
Беше проведен и аналогичен експеримент, при който нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид бяха третирани с нарастващи концентрации на дихидрокверцитин (*фигура 25*). При третиране на клетките в продължение на 24 часа, най-силен инхибиторен ефект беше установен при концентрация 100 μM дихидрокверцитин, докато най-слабо изразен беше инхибиторния ефект върху клетъчната преживяемост при концентрация 5 μM. В изследваната концентрационна област също така беше установена и дозова зависимост, като при нарастването на концентрацията на дихидрокверцитин се засилваше и инхибиторния ефект върху клетъчната преживяемост, но дори и при най-високата използвана концентрация (100 μM) клетъчната преживяемост е над 50% от тази на контролните, нетретирани клетки.



**Фигура 26. Клетъчна преживяемост на нормални човешки кератиноцити, третирани с нарастваща концентрация на дихидрокверцитин (DHQ), при различна продължителност на третирането (24 и 48 часа).**

При увеличаване на продължителността на третирането от 24 на 48 часа, беше установено засилване на инхибиторния ефект при всички тествани концентрации на дихидрокверцитина, като най-силно изразен инхибиторен ефект при по-продължителното третиране беше наблюдаван при 10 µM дихидрокверцитин, а най-слабо изразен антипролиферативен ефект беше установен при 25 µM дихидрокверцитин (*фигура 26*). При по-продължителното третиране на нормални кератиноцити с дихидрокверцитин се губеше и концентрационната зависимост, проявяваща се при третиране в продължение на 24 часа. Вероятна причина за това е отново хетерогенната природа на използваните първични кератиноцитни култури.

С цел да се установи на какво се дължат наблюдаваните различия по отношение преживяемостта на нормални човешки кератиноцити третирани с едни и същи концентрации на кверцитин и дихидрокверцитин, но при различна продължителност на третирането беше проведен анализ на клетъчната морфология посредством светлинна микроскопия. Целта на този анализ беше да се установят на макроскопично ниво промените в клетъчната морфология и да се предположи какъв е подлежащия механизъм за подтискане на клетъчната преживяемост.



**Фигура 27. Ефекти на кверцитин и дихидрокверцитин върху морфологията на нормални човешки кератиноцити, третираны в продължение на 48 часа.**

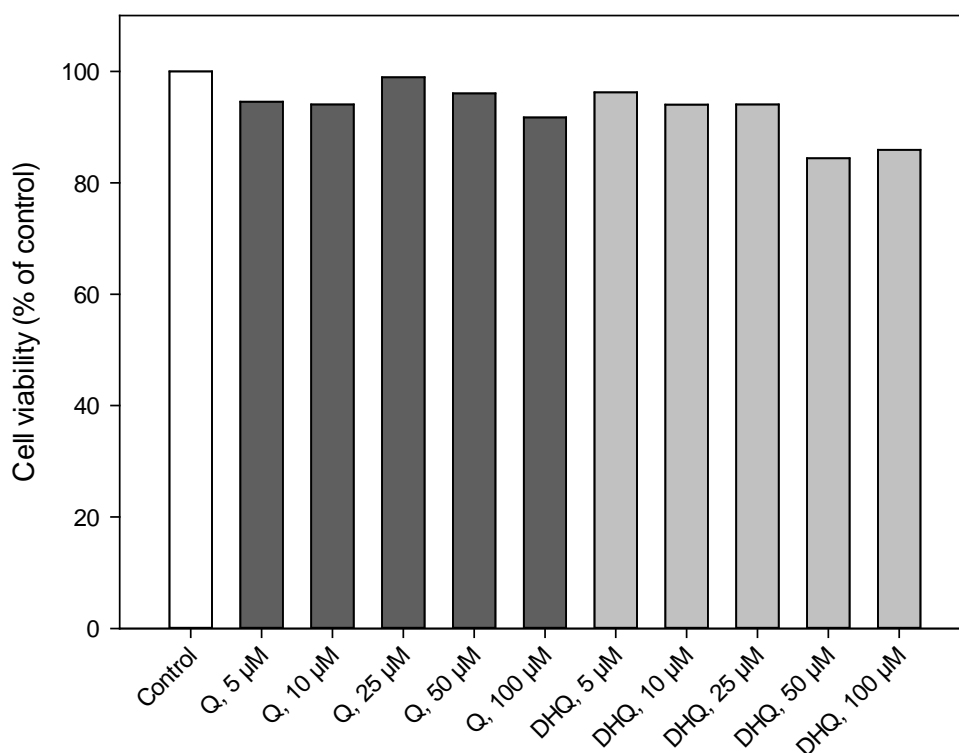
Когато беше анализирана клетъчната морфология при третиране в продължение на 48 часа с 5 μM кверцитин, за който бе установено, че проявява най-слаб инхибиторен ефект (*фигура 24*), беше установено, че третираните кератиноцити до голяма степен запазват морфологията си, като незначителна част от клетките се окръгляха и отлепаха от дъното на културалния съд, което предполага индукция на апоптотичен тип клетъчна смърт при тези клетки (*фигура 27*). При третирането със 100 μM кверцитин, за който беше установен по-силен инхибиторен ефект (*фигура 24*), по-голямата част от клетките се окръгляха и отлепаха от дъното на културалните съдове (индикиращо индукция на апоптотична клетъчна смърт), като същевременно клетките, оставащи прикрепени към дъното на съда, увеличаваха значително размерите си и изменяха морфологията си, като загубваха и характерната за кератиноцити призматична форма (*фигура 27*). Наблюдаваните промени в клетъчната морфология обаче не съответстват на настъпващите при третиране с неселективния протеин киназен инхибитор стауроспорин, които са характерни за индукция на класическия път на апоптоза. На база на това наблюдение може да се заключи, че третирането на нормални кератиноцити с кверцитин води до понижаване на клетъчната преживяемост и промени в клетъчната морфология, нехарактерни за класическия апоптотичен път на ПКС.

При третирането на клетките с 10 μM дихидрокверцитин, който проявяваше най-силен инхибиторен ефект при продължителност на третирането от 48 часа (*фигура 26*), също беше наблюдавано окръгляне и отлепяне на част от клетките от дъното на културалните съдове (индикиращо индукция на апоптотичен тип клетъчна смърт), а останалите прикрепени към дъното на съда клетки изменяха морфологията си, подобно на клетките третираны с 100 μM кверцитин. При третирането на нормални кератиноцити с най-високата използвана концентрация на дихидрокверцитин (100 μM) морфологичните изменения бяха още по-силно изразени, като само малък процент от общото количество клетки оставаха прикрепени към дъното на съда. При третиране с



100  $\mu\text{M}$  дихидрокверцитин по-голямата част от клетките бяха със сферична форма и незакрепени за дъното на културалните съдове, което индикира индукция на по-скоро апоптотичен клетъчен тип. Подобно на третирането с кверцитин, третирането на нормални човешки кератиноцити с дихидрокверцитин също водеше до нехарактерни за апоптозата морфологични изменения.

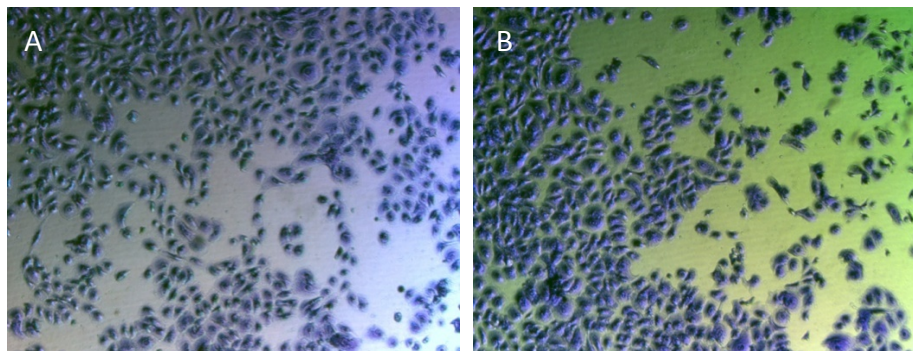
Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин води както до понижаване на клетъчната преживяемост, така и до значителни изменения в клетъчната морфология, които обаче не съответстват на наблюдаваните при индукция на класическия апоптотичен път посредством неселективния киназен инхибитор стауроспорин. Поради разнообразието по отношение на пътищата, водещи до клетъчна смърт и частичното припокриване между отделни регулаторни пътища [14], е необходимо провеждането на допълнителни експерименти, които да изяснят молекулния механизъм водещ до наблюдаваните морфологични изменения. Провеждането на тези допълнителни експерименти изисква и задълбочено изследване на научната литература, свързана с механизмите на клетъчна смърт, и подбор на най-подходящия набор от биомаркери, който да позволи правилната интерпретация на резултатите.



**Фигура 28. Клетъчна преживяемост (оцветяване с Crystal Violet) на нормални човешки кератиноцити, третиранни с нарастващи концентрации на кверцитин (Q) и дихидрокверцитин (DHQ) в продължение на 24 часа.**

С цел да бъдат потвърдени резултатите за клетъчната преживяемост, получени посредством класическия МТТ тест, беше осъществено оцветяване на нормалните

кератиноцити, третирани с кверцитин и дихидрокверцитин, с Crystal Violet (*фигура 28*), като този метод представлява алтернативен метод за определяне на клетъчната преживяемост. При проведените изследвания беше установено минимално снижаване на клетъчната преживяемост (под 20% намаление при всички използвани третирания), като резултатите не корелираха с получените чрез класическия МТТ тест (*фигура 23 и фигура 25*).



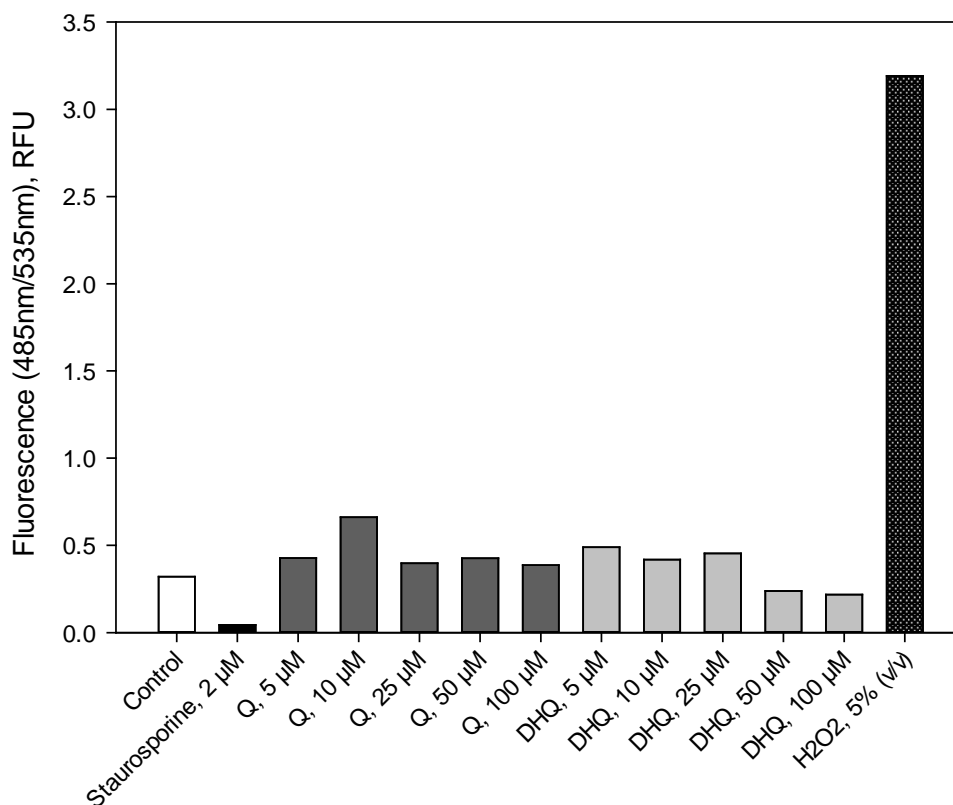
**Фигура 29.** Оцветяване на контролни клетки (А) и клетки, третирани с 5  $\mu\text{M}$  кверцитин (В) с Crystal Violet (0.5% в 20% метанол).

В опит да се обясни това несъответствие на резултатите от двата теста за клетъчна преживяемост, клетки, оцветени с Crystal Violet бяха наблюдавани чрез светлинна микроскопия (*фигура 29*). Беше установено, че багрилото е способно да навлиза не само в „живите клетки“, но също така и в клетъчни фрагменти и други артефакти от „мъртвите клетки“, които оставаха прикрепени към дъното на съда независимо от трикратното промиване преди оцветяването на клетките с Crystal Violet, което има за цел именно елиминирането на мъртвите клетки, присъстващи в клетъчната култура. Този недостатък на използваната методология я направи неприложима при използваната моделна система, тъй като при това оцветяване бяха детектирани не само останалите живи клетки, но също така и клетъчни фрагменти и артефакти от мъртвите клетки. Именно този важен недостатък прави оцветяването с Crystal Violet неподходяща алтернатива на МТТ теста при определянето на клетъчната преживяемост на нормални кератиноцити при третиране с антиоксидантни съединения, но метода е подходящ за изследвания, целящи изследване на промените в клетъчната морфология.

### ***Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху генерирането на свободни радикали (ROS) при нормални човешки кератиноцити***

Наблюдаваните изменения в клетъчната морфология, дължащи се на третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин, е възможно да се дължат на промени в редокс-статуса на клетката и генерирането на свободни кислородни радикали (ROS). С цел да се установят ефектите от третирането върху нивата на свободни кислородни радикали, беше използвано оцветяване на клетките с дихлорофлуоресцеин диацетат (DCFDA). DCFDA представлява нефлуоресцентна молекула, способна да преминава безпрепятствено през плазмената мембрана и да се превръща в клетката в дихлорофлуоресцеин (DCF), който е силно

флуоресцентен. Превръщането на DCFDA в DCF става под действието на митохондриални ензими, които присъстват и са активни единствено при живи клетки, така че получените данни за нива на ROS се отнасят само за живите клетки, присъстващи в културата.

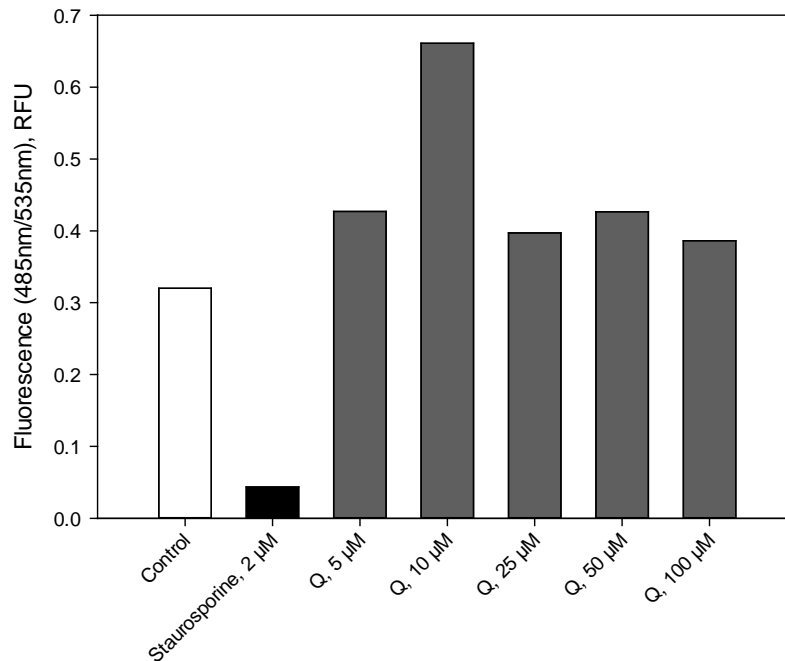


**Фигура 30. Ефекти третирането с кверцитин и дихидрокверцитин върху генерирането на свободни кислородни радикали при нормални човешки кератиноцити.**

Легенда: Q - кверцитин, DHQ – дихидрокверцитин, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водороден пероксид.

При третирането на нормални кератиноцити с нарастващи концентрации на кверцитин и дихидрокверцитин беше установено повишаване на нивата на свободни радикали, на база на повишената флуоресценция дължаща се на DCF, но това повишаване на ROS беше значително по-слабо изразено от наблюдаваното при третиране на кератиноцитите с 5% водороден пероксид (*фигура 30*). Използваната относително висока концентрация на водороден пероксид доведе до многократно повишаване на нивата на ROS, които бяха над 6 пъти по-високи от установените при контролни, нетретирани клетки. Подобно нива на свободни радикали в клетката водят до индукция на остър оксидативен стрес, необратимо увреждане на клетката и индукция на клетъчна смърт. При нито една от използваните концентрации на кверцитин и на дихидрокверцитин не беше установено подобно рязко повишаване на нивата на свободни радикали, индикиращо проявата на про-оксидантно действие от страна на тези два флавоноида. Ниските стойности за флуоресценцията на DCF при третирани със стауроспорин кератиноцити бяха резултат от индукцията на клетъчна

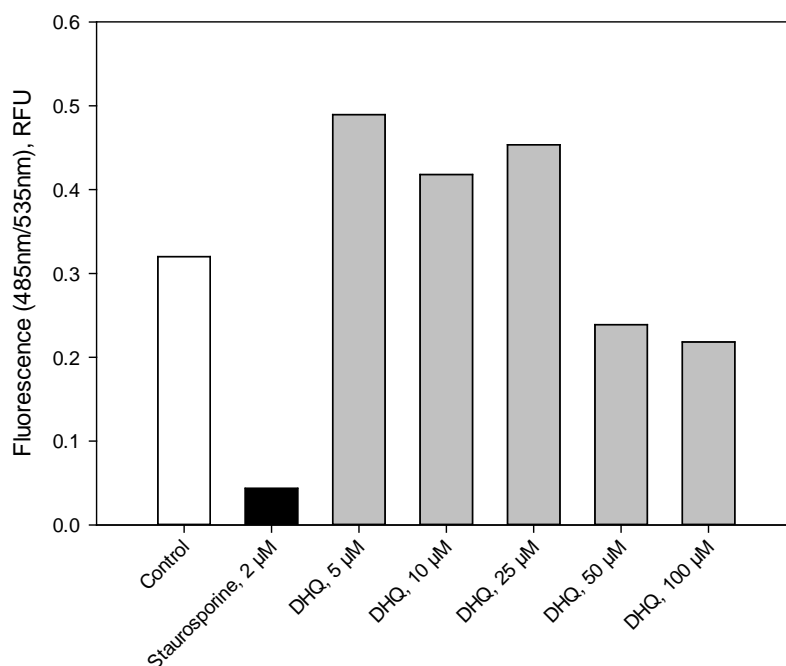
смърт под действие на този киназен инхибитор, а не бяха резултат от антиоксидантно действие на стауроспорина. Намаленият брой живи клетки при третиране със стауроспорин води до намаляване на нивата на съответните ензими и съответно много по-малка част от DCFDA се окисляваше до до флуоресцентния продукт DCF.



**Фигура 31. Ефекти на третирането с кверцитин (Q) върху генерирането на свободни кислородни радикали при нормални човешки кератиноцити.**

Третирането на нормални кератиноцити с нарастващи концентрации на кверцитин водеше до повишаване на нивата на свободни радикали, но не беше установена концентрационна зависимост (фигура 31). Напротив, нивата на свободни радикали (на база на флуоресценцията на DCF) бяха по-високи при ниски концентрации и особено при концентрация 10 μM кверцитин, при която флуоресценцията бе над 2 пъти по-висока от установената при контролни, нетретиранни кератиноцити. При същата концентрация на кверцитин беше установена и най-ниска преживяемост на клетките (фигура 23) и може да се хипотезира, че именно повишените нива на свободни радикали в клетката водят и до намаляване на клетъчната преживяемост, но са необходими допълнителни анализи които да потвърдят или оборят тази хипотеза.

На база на резултатите за нивата на свободни радикали може също така да се хипотезира, че в зависимост от използваната концентрация, кверцитина може да действа както като антиоксидант, така и като про-оксидант, като при настоящите експерименти използването на концентрация от 10 μM водеше до проявата на про-оксидативни ефекти, като същевременно нито една от останалите използвани концентрации не водеше до значителен антиоксидантен ефект.



**Фигура 32. Ефекти на третирането с кверцитин върху генерирането на свободни кислородни радикали при нормални човешки кератиноцити.**

При третирането на нормални човешки кератиноцити с дихидрокверцитин, беше наблюдавано повишаване на нивата на свободни радикали при ниски концентрации (5-25  $\mu$ M) (фигура 32), като при 5  $\mu$ M и 10  $\mu$ M беше установен и по-силен инхибиторен ефект по отношение на клетъчната преживяемост (фигура 25). При високи концентрации (50  $\mu$ M и 100  $\mu$ M) се наблюдаваше намаляване на нивата на ROS, като стойностите бяха по-ниски от установените при контролни, нетретиранни клетки. Това снижаване на нивата на свободни радикали би могло да е резултат от намалената клетъчна преживяемост (фигура 25 и фигура 26), но не е изключено да бъде и резултат от антиоксидантното действие на дихидрокверцитина в тази концентрационна област. За изясняването на точната причина водеща до снижаване на нивата на ROS при третиране на нормални кератиноцити с дихидрокверцитин, е необходимо провеждането на допълнителни експерименти, при които нивата на свободни радикали да бъдат определени с помощта на алтернативен биомаркер.

Дълго време в научната литературата съществуваше догма, че дадена молекула може да действа или само като оксидант или само като антиоксидант, но в последните години се натрупват все повече данни, че редица съединения могат да проявяват както антиоксидантни, така и про-оксидантни свойства [201, 202] като точния ефект на дадена молекула се определя както от нейната концентрация, така и от структурата ѝ. При настоящите експерименти бяха използвани два структурно сходни флавоноида от растителен произход, които обаче проявяват различни ефекти върху генерирането на свободни радикали при нормални човешки кератиноцити. Докато в използваната концентрационна област (5 – 100  $\mu$ M) кверцитина проявява по-скоро про-оксидантно

действие, то в същия концентрационен диапазон дихидрокверцитина проявява както про-оксидантни ефекти (при концентрация между 5 и 25  $\mu\text{M}$ ), но при по-висока концентрация (50  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) тази молекула привидно проявява антиоксидантно действие. Намалените нива на свободни радикали при третиране с високи концентрации на дихидрокверцитин обаче не е изключено да се дължат и на понижаване на клетъчната преживяемост и следователно намален капацитет на клетъчната култура за окисление на DCFDA до флуоресцентния продукт DCF.

Невъзможността за правилно корелиране на данните за клетъчната преживяемост и за генерирането на свободни радикали поради липсата на надежден референтен маркер (общото количество белтък не беше подходящо при настоящия експеримент) налага провеждането на допълнителни анализи, при които да бъдат използвани алтернативни маркери за оксидативен стрес, включително определяне нивата на определени представители на ейкозаноидите (по-специално на простагландините) и на активността на антиоксидантни и окислителни ензими в клетката. За съжаление дори използването на алтернативни биомаркери за оценка на редокс-статуса на клетката не би могло недвусмислено да покаже какъв е точния механизъм на действие на дихидрокверцитина (а също така и на кверцитина) при нормални човешки кератиноцити, изолирани от възрастни индивиди. Изясняването на точните механизми на повлияване на кверцитина и особено на дихидрокверцитина изисква мащабни изследвания, при които класическите подходи за изучаване на сигнално-трансдукционните пътища в клетката трябва да бъдат съчетани със съвременните –омикс технологии.

## ИЗВОДИ

- Третирането на нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид с инхибитора на ROCK киназите Y27632 води до запазване на пролиферативния капацитет на клетките и избягване на индукцията на репликативен сенесценс, възникващ при продължителното култивиране на нормални кератиноцити в отсъствието на инхибитора. Третирането с инхибитора Y27632 води и до запазване на нормалната клетъчна морфология.
- Третирането на hTERT-имортализирани кератиноцити с ROCK киназия инхибитор Y27632 не води до промени в пролиферативния капацитет на клетката и в клетъчната морфология. При hTERT-имортализираните човешки кератиноцити при продължително култивиране не настъпват промени в структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени, независимо от присъствието или отсъствието на инхибитора Y27632 в културалната среда.
- В хода на настъпване на репликативен сенесценс при нормални човешки кератиноцити се наблюдава намаляване на броя и интензитета на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени, като същевременно не се наблюдават промени в богатите на холестерол мембранни домени.
- При репликативен сенесценс се наблюдава повишаване на нивата на експресия на киселата сфингомиелиназа (aSMase), докато тези на сфингомиелин синтаза 2 (SMS2) се понижават, а експресията на неутрална сфингомиелиназа 1 (nSMase1) се запазва. Наблюдаваните промени в експресията на тези ензими вероятно са свързани и със наблюдаваните промени в структурата и състава на обогатените на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в хода на настъпване на репликативен сенесценс.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 води до запазване на структурата и състава на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана. Запазването на количественото съдържание на сфингомиелин предполага и запазване на функционалността на богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени.
- При нормални човешки кератиноцити в хода на настъпване на репликативен сенесценс се наблюдава загуба на активността и на количеството на рецепторната киназа EGFR, независимо от запазването на богатите на холестерол субмикрометрични липидни домени, с които белтъка се асоциира. При индукция на сенесценс се запазват нивата на активната форма и на тоталното количество на p38 MAPK, която играе ключова роля при стресовите отговори на клетката.
- При третиране с ROCK инхибитора Y27632 се запазват нивата на активната форма и тоталното количество на рецепторната тирозин киназа EGFR, а също така и на серин/треонин киназата ERK1/2, която подобно на p38 MAPK играе роля в отговора на клетката на външни стимули. Запазването на нивата на тези

важни регулаторни ензими вследствие репресия на репликативния сенесценс предполага и запазване на техните функционални роли.

- Третирането на нормални човешки кератиноцити с ROCK инхибитора Y27632 води до запазване на нивата на инхибитора на циклин-зависимите кинази p16<sup>INK4a</sup>, което е индикативно за репресия на репликативния сенесценс.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин води до понижаване на клетъчната преживяемост и значителни морфологични изменения, несъответстващи на наблюдаваните при индукция на класическия апоптотичен път под действие на неспецифичния киназен инхибитор стауроспорин. Необходими са допълнителни експерименти, чрез които да бъде установен точния механизъм на повлияване.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин води до повишаване на нивата на свободни радикали в клетката, което е индикативно за про-оксидантно действие на кверцитина в концентрационния диапазон от 5 до 100  $\mu\text{M}$ .
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с ниски концентрации (5-25  $\mu\text{M}$ ) на дихидрокверцитин води до генерането на свободни радикали и проявата на про-оксидантни ефекти. Използването на по-високи концентрации на дихидрокверцитин (50 и 100  $\mu\text{M}$ ) води до снижаване на нивата на свободни радикали, като е възможно това да е резултат от проявата на антиоксидантно действие.
- Необходимо е провеждането на допълнителни експерименти, които да изяснят точните механизми на действие на кверцитина и дихидрокверцитина при нормални човешки кератиноцити, преди да бъде възможно прилагането на тези два флавоноида при модулацията на процесите на клетъчна смърт и/или клетъчно стареене.



## НАУЧНИ ПРИНОСИ

- Беше установено за първи път, че в хода на настъпване на репликативен сенесценс настъпват промени в богатите на сфингомиелин субмикрометрични липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити, но не и в богатите на холестерол липидни рафтове.
- За първи път беше установено, че третирането на нормални човешки кератиноцити в условията на монокултура с инхибитора на ROCK киназите Y27632 води до избягване на настъпването на репликативен сенесценс.
- Третирането на нормални човешки кератиноцити с инхибитора на ROCK киназите Y27632 води до запазване както на структурата, така и на състава на субмикрометричните липидни домени в плазмената мембрана на нормални човешки кератиноцити.
- Установено беше про-оксидантно и антиоксидантно действие на флавоноида дихидрокверцитин при нормални човешки кератиноцити от възрастен индивид, като точните молекулни механизми на действие на дихидрокверцитина е необходимо да бъдат по-детайлно проучени при тази моделна система.
- Изолираните първични култури от нормални човешки кератиноцити обогатиха наличната клетъчна колекция на Лабораторията по клетъчна сигнализация към катедрата по Медицинска химия и биохимия на Медицинския факултет на МУ-София.

## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Mound A, **Lozanova V**, Warnon C, Hermant M, Robic J, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Tyteca D, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017, 1862(9):958-71.  
**IF (2017) = 4.966**
2. Mound A, Hermant M, **Lozanova V**, Tyteca D, de Rouvroit CL, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. Rôle des microdomaines lipidiques lors de la sénescence des kératinocytes épidermiques. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 2015, 142 (6-7), p. S289  
**IF (2015) = 0.215**
3. Kalenderova S, **Lozanova V**, Praskova M, Lozanov V. UV light stimulated activation of CaMKII in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of Biomedical and Clinical Research*. 2018. (приета за печат)

### ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Mound A, **Lozanova V**, Warnon C, Hermant M, Robic J, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Tyteca D, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. Non-senescent keratinocytes organize in plasma membrane submicrometric lipid domains enriched in sphingomyelin and involved in re-epithelialization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017, 1862(9):958-71.

#### Забелязани цитирания:

- Conrard L, Stommen A, Cloos AS, Steinkühler J, Dimova R, Pollet H, Tyteca D. Spatial relationship and functional relevance of three lipid domain populations at the erythrocyte surface. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;51(4):1544-65.
- Borodkina AV, Deryabin PI, Griukova AA, Nikolsky NN. To Find and Destroy: Identification and Elimination of Senescent Cells. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2018 Jul 1;12(3):223-33.
- Kandell RM. ASSESSING THE PHOTOPROTECTIVE EFFECTS OF FLUORESCENT SPHINGOMYELIN AGAINST UVB INDUCED DNA DAMAGE IN HUMAN KERATINOCYTES (Doctoral dissertation, California Polytechnic State University, San Luis Obispo). (*докторска дисертация*)

#### **УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

1. Весела Лозанова, Виолета Димитрова, Анелия Василева, Мария Драгнева, Ваньо Митев. Ефекти на кверцитин и дихидрокверцитин върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки кератиноцити. Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология – нови хоризонти“, ИМБ-БАН, 06-07.04.2017, София.
2. Mound A, Warnon C, Lozanova V, Guere C, Vie K, Tyteca D, de Rouvroit CL, Debacq-Chainiaux F, Poumay Y. 103 Sphingomyelin concentrates into lipid microdomains only in non-senescent cells and enhances keratinocyte migration. 46th Annual ESDR Meeting, 07-10.09.2016, Munich, Germany.
3. Mound A, Lozanova V, Tyteca D, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Chainiaux-Debacq F, Poumay Y. Development of senescence corresponds to the loss of sphingomyelin-enriched submicrometric domains and their associated EGFR-signaling in epidermal keratinocytes. 75th SID Annual Meeting, 11-16.05.2016, Scottsdale, AZ, USA.
4. Mound A, Hermant M, Lozanova V, Tyteca D, Guere C, Vie K, de Rouvroit CL, Chainiaux-Debacq F, Poumay Y. Imaging membrane lipid microdomains in live human keratinocytes. 45th ESDR Annual Meeting, 09-12.09.2015, Rotterdam, The Netherlands
5. Mound A, Lozanova V, Tyteca D, Guere C, Vie K, Lambert C, Chainiaux F, Poumay YG. Lipid microdomains in keratinocyte membranes are characteristics of cells that do not undergo replicative senescence. American Society of Cell Biology (ASCB) Meeting, 12-16.12.2015, San Diego, CA, USA.

#### **УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

1. Договор №23/2016 от конкурса „Грант“ към Съвета по медицински науки на МУ-София на тема „Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху апоптотичната сигнална каскада при нормални човешки кератиноцити“; участник в изследователския екип.
2. Договор №11-Д/2015 от конкурса „Млад изследовател“ към Съвета по медицински науки на МУ-София на тема „Ефекти на кампферол и кампферол-3-глюкозид върху пролиферацията на кератиноцити и застарването на рани“; изпълнител-докторант на проекта.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2016 May;15(5):348.
2. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015 Jun;16(6):329.
3. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016 Jun 1;73(11-12):2405-10.
4. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):742-58.
5. Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD, Golstein P. Programmed cell death in *Dictyostelium*. *Journal of cell science*. 1994 Oct 1;107(10):2691-704.
6. Green DR, Fitzgerald P. Just so stories about the evolution of apoptosis. *Current Biology*. 2016 Jul 11;26(13):R620-7.
7. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation*. 2015 Jan;22(1):58.
8. Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annual review of genetics*. 2009 Dec 1;43:493-523.
9. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012 Dec;12(12):860.
10. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012 Dec;13(12):780.
11. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.
12. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 2012 Jan;19(1):107.
13. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*. 2009 Aug;16(8):1093.
14. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018 Jan 23:1.
15. Lee Y, Karuppagounder SS, Shin JH, Lee YI, Ko HS, Swing D, Jiang H, Kang SU, Lee BD, Kang HC, Kim D. Parthanatos mediates AIMP2-activated age-dependent dopaminergic neuronal loss. *Nature neuroscience*. 2013 Oct;16(10):1392.

16. Serrano-Puebla A, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016 May;1371(1):30-44.
17. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009 Jul;10(7):481.
18. Kers J, Leemans JC, Linkermann A. An overview of pathways of regulated necrosis in acute kidney injury. In *Seminars in nephrology* 2016 May 1 (Vol. 36, No. 3, pp. 139-152). WB Saunders.
19. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature reviews Cancer*. 2016 Feb;16(2):99.
20. Mason JA, Hagel KR, Hawk MA, Schafer ZT. Metabolism during ECM detachment: Achilles heel of cancer cells?. *Trends in cancer*. 2017 Jul 1;3(7):475-81.
21. Angeli JP, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities. *Trends in pharmacological sciences*. 2017 May 1;38(5):489-98.
22. Dillon CP, Green DR. Molecular cell biology of apoptosis and necroptosis in cancer. In *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy* 2016 (pp. 1-23). Springer, Cham.
23. Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science*. 2016 Apr 1;352(6281):aaf2154.
24. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK, Kroemer G. Necroptosis: mechanisms and relevance to disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2017 Jan 24;12:103-30.
25. Dorn II GW. Novel pharmacotherapies to abrogate postinfarction ventricular remodeling. *Nature Reviews Cardiology*. 2009 Apr;6(4):283.
26. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Kroemer G. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2009 May 1;1787(5):402-13.
27. Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*. 2015 Sep 10;373(11):1021-31.
28. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017 Apr;16(4):273.
29. Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014 Feb;15(2):135.
30. Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, Ekert PG. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. In *Seminars in cell & developmental biology* 2015 Mar 1 (Vol. 39, pp. 63-69). Academic Press.
31. Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology*. 2014 Oct 6;30:337-56.
32. Golstein P. Conserved nucleolar stress at the onset of cell death. *The FEBS journal*. 2017 Nov 1;284(22):3791-800.

33. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2017 Apr;17(4):262.
34. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nature Reviews Immunology*. 2014 Nov;14(11):759.
35. Dudek AM, Garg AD, Krysko DV, De Ruyscher D, Agostinis P. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine & growth factor reviews*. 2013 Aug 1;24(4):319-33.
36. Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell death and differentiation*. 2014 Jan;21(1):39.
37. Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell death and differentiation*. 2014 Jan;21(1):26.
38. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*. 2016 Nov;35(46):5931.
39. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010 Mar;464(7285):104.
40. Sun S, Sursal T, Adibnia Y, Zhao C, Zheng Y, Li H, Otterbein LE, Hauser CJ, Itagaki K. Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. *PloS one*. 2013 Mar 20;8(3):e59989.
41. Soares MP, Teixeira L, Moita LF. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nature Reviews Immunology*. 2017 Feb;17(2):83.
42. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961 Dec 1;25(3):585-621.
43. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1965 Mar 1;37(3):614-36.
44. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014 Jul;15(7):482.
45. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes & development*. 2010 Nov 15;24(22):2463-79.
46. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013 Nov 21;155(5):1104-18.
47. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dollé ME, Hoeijmakers JH. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell*. 2014 Dec 22;31(6):722-33.
48. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*. 2010 Jan;10(1):51.
49. Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014 May;509(7501):439.
50. Childs BG, Durik M, Baker DJ, Van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*. 2015 Dec;21(12):1424.

51. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*. 2018 Apr 2;128(4):1238-46.
52. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011 Nov;479(7374):547.
53. Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nature communications*. 2014 Jun 24;5:4172.
54. di Fagagna FD. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*. 2008 Jul;8(7):512.
55. di Fagagna FD, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003 Nov;426(6963):194.
56. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004 Nov 17;432(7015):307.
57. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 2003 Aug 15;22(16):4212-22.
58. Sharpless NE, DePinho RA. Model organisms: The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature reviews Drug discovery*. 2006 Sep;5(9):741.
59. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*. 2015 Jul;15(7):397.
60. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013 Nov 21;155(5):1119-30.
61. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005 Aug 25;576(1-2):22-38.
62. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010 Feb;463(7283):899.
63. Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Mönch K, Minucci S, Porse BT, Marine JC, Hansen KH. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & development*. 2007 Mar 1;21(5):525-30.
64. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006 Sep;7(9):667.
65. Martin N, Popov N, Aguilo F, O'loghlen A, Raguz S, Snijders AP, Dharmalingam G, Li S, Thymiakou E, Carroll T, Zeisig BB. Interplay between Homeobox proteins and Polycomb repressive complexes in p16INK4a regulation. *The EMBO journal*. 2013 Apr 3;32(7):982-95.

66. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Nov 1;114(9):1299-307.
67. Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *The Journal of cell biology*. 2009 Aug 10;186(3):393-407.
68. Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, Darr DB, Krishnamurthy J, Deal AM, Bardeesy N, Castrillon DH, Beach DH, Sharpless NE. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16 INK4a-luciferase model. *Cell*. 2013 Jan 17;152(1):340-51.
69. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, Van De Sluis B, Kirkland JL, Van Deursen JM. Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011 Nov;479(7372):232.
70. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews cancer*. 2009 Feb;9(2):81.
71. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*. 2010 Feb 28;5:99-118.
72. Hoare M, Ito Y, Kang TW, Weekes MP, Matheson NJ, Patten DA, Shetty S, Parry AJ, Menon S, Salama R, Antrobus R. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature cell biology*. 2016 Sep;18(9):979.
73. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging cell*. 2012 Apr;11(2):345-9.
74. Biran A, Perelmutter M, Gal H, Burton DG, Ovadya Y, Vadai E, Geiger T, Krizhanovsky V. Senescent cells communicate via intercellular protein transfer. *Genes & development*. 2015 Apr 8.
75. Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, McCubrey JA, Renegar RH, Wang R, Terrian DM. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer research*. 2008 Oct 1;68(19):7864-71.
76. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1006-18.
77. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):363-74.
78. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1019-31.
79. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrusis M, Pascual G. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*. 2013 Aug;15(8):978.



80. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Oct 9;98(21):12072-7.
81. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013 Jul;499(7456):97.
82. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, Koenig K, Le C, Mitin N, Deal AM, Alston S. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer discovery*. 2017 Feb 1;7(2):165-76.
83. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011 Nov;479(7374):547.
84. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007 Feb;445(7128):656.
85. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, Medina-Echeverez J, Longerich T, Forgues M, Reisinger F, Heikenwalder M. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression. *Cancer Cell*. 2016 Oct 10;30(4):533-47.
86. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2014 May 8;69(Suppl\_1):S4-9.
87. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K. Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016 Feb;530(7589):184.
88. Baar MP, Brandt RM, Putavet DA, Klein JD, Derks KW, Bourgeois BR, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*. 2017 Mar 23;169(1):132-47.
89. Biran A, Zada L, Abou Karam P, Vadai E, Roitman L, Ovadya Y, Porat Z, Krizhanovsky V. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging cell*. 2017 Aug;16(4):661-71.
90. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology*. 2010 Jul;12(7):676.
91. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):657-67.
92. Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP, Sansom OJ, Zender L, Keyes WM. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & development*. 2017 Jan 31.
93. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*. 2009 Aug;11(8):973.

94. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO journal*. 2011 Apr 20;30(8):1536-48.
95. Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Jun 6;114(23):E4612-20.
96. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premsrirut P, Luo W, Chicas A, Lee CS, Kogan SC. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & development*. 2011 Oct 6.
97. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1 $\alpha$  is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Sep 23;pnas-0905299106.
98. Capell BC, Drake AM, Zhu J, Shah PP, Dou Z, Dorsey J, Simola DF, Donahue G, Sammons M, Rai TS, Natale C. MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes & development*. 2016 Feb 1;30(3):321-36.
99. Chen H, Ruiz PD, McKimpson WM, Novikov L, Kitsis RN, Gamble MJ. MacroH2A1 and ATM play opposing roles in paracrine senescence and the senescence-associated secretory phenotype. *Molecular cell*. 2015 Sep 3;59(5):719-31.
100. Tasdemir N, Banito A, Roe JS, Alonso-Curbelo D, Camiolo M, Tschaharganeh DF, Huang CH, Aksoy O, Bolden JE, Chen CC, Fennell M. BRD4 connects enhancer remodeling to senescence immune surveillance. *Cancer discovery*. 2016 Apr 20.
101. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature cell biology*. 2015 Aug;17(8):1049.
102. Herranz N, Gallage S, Mellone M, Wuestefeld T, Klotz S, Hanley CJ, Raguz S, Acosta JC, Innes AJ, Banito A, Georgilis A. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nature cell biology*. 2015 Sep;17(9):1205.
103. Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, Hong S, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavaré S. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science*. 2011 Apr 21:1205407.
104. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, Lu T, Yankner BA, Campisi J, Elledge SJ. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*. 2015 Sep 25;349(6255):aaa5612.
105. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, Shirakawa K, Lim HW, Davis SS, Ramanathan A, Gerencser AA. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell metabolism*. 2016 Feb 9;23(2):303-14.
106. Hoare M, Ito Y, Kang TW, Weekes MP, Matheson NJ, Patten DA, Shetty S, Parry AJ, Menon S, Salama R, Antrobus R. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature cell biology*. 2016 Sep;18(9):979.
107. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*. 2000 Oct 15;113(20):3613-22.

108. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging cell*. 2006 Apr;5(2):187-95.
109. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995 Sep 26;92(20):9363-7.
110. Hildebrand D, Lehle S, Borst A, Haferkamp S, Essmann F, Schulze-Osthoff K.  $\alpha$ -Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence. *Cell Cycle*. 2013 Jun 15;12(12):1922-7.
111. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & development*. 2009 Apr 1.
112. Brusker I, Rhodes JM, Goldman R.  $\beta$ -Galactosidase—An indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. *Journal of cellular physiology*. 1982 Sep;112(3):385-90.
113. Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez MP, Zoumpourlis V, Trougakos IP, Kletsas D, Bartek J, Serrano M, Gorgoulis VG. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)*. 2013 Jan;5(1):37.
114. Adams PD. Remodeling chromatin for senescence. *Aging cell*. 2007 Aug;6(4):425-7.
115. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes & development*. 2000 Aug 15;14(16):2015-27.
116. Narita M, Nuñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):703-16.
117. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development*. 2014 Jan 15;28(2):99-114.
118. Chandra T, Kirschner K, Thuret JY, Pope BD, Ryba T, Newman S, Ahmed K, Samarajiwa SA, Salama R, Carroll T, Stark R. Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Molecular cell*. 2012 Jul 27;47(2):203-14.
119. Sadaie M, Salama R, Carroll T, Tomimatsu K, Chandra T, Young AR, Narita M, Pérez-Mancera PA, Bennett DC, Chong H, Kimura H. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes & development*. 2013 Aug 15;27(16):1800-8.
120. Chandra T, Ewels PA, Schoenfelder S, Furlan-Magaril M, Wingett SW, Kirschner K, Thuret JY, Andrews S, Fraser P, Reik W. Global reorganization of the nuclear landscape in senescent cells. *Cell reports*. 2015 Feb 3;10(4):471-83.
121. Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan JA, Zhu J, Ivanov A, Capell BC, Drake AM, Shah PP, Catanzaro JM. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*. 2015 Nov;527(7576):105.

122. Ivanov A, Pawlikowski J, Manoharan I, van Tuyn J, Nelson DM, Rai TS, Shah PP, Hewitt G, Korolchuk VI, Passos JF, Wu H. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol.* 2013 Jul 8;202(1):129-43.
123. Di Micco R, Sulli G, Dobрева M, Lontos M, Botrugno OA, Gargiulo G, Dal Zuffo R, Matti V, d'Ario G, Montani E, Mercurio C. Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature cell biology.* 2011 Mar;13(3):292.
124. Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JH, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature.* 2013 Sep;501(7467):421.
125. Wang Y, Wang XD, Lapi E, Sullivan A, Jia W, He YW, Ratnayaka I, Zhong S, Goldin RD, Goemans CG, Tolkovsky AM. Autophagic activity dictates the cellular response to oncogenic RAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012 Aug 14;109(33):13325-30.
126. Sun N, Youle RJ, Finkel T. The mitochondrial basis of aging. *Molecular cell.* 2016 Mar 3;61(5):654-66.
127. Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, Cole J, Carroll BM, Miwa S, Birch J, Merz A, Rushton MD. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO journal.* 2016 Apr 1;35(7):724-42.
128. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, van der Burg SH, Verdegaal EM, Cascante M, Shlomi T, Gottlieb E. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature.* 2013 Jun;498(7452):109.
129. Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim HP, Kim KT, Jang IS, Park SC. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Oct 1;279(40):42270-8.
130. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, Kaufman RJ. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature cell biology.* 2006 Oct;8(10):1053.
131. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer research.* 1995 Jun 1;55(11):2284-92.
132. Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mechanisms of ageing and development.* 2001 Oct 1;122(15):1695-706.
133. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, Vadai E, Dassa L, Shahar E, Condiotti R, Ben-Porath I. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature communications.* 2016 Apr 6;7:11190.
134. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature medicine.* 2016 Jan;22(1):78.
135. Zhu Y, Tchkonja T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Johnson KO, Giles CB, Wren JD. Identification of a novel senolytic

- agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging cell*. 2016 Jun;15(3):428-35.
136. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy. *Cancer discovery*. 2016 Apr 1;6(4):353-67.
137. Goñi FM. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2014 Jun 1;1838(6):1467-76.
138. de Kroon AI, Rijken PJ, De Smet CH. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Progress in lipid research*. 2013 Oct 1;52(4):374-94.
139. Zwaal RF, Comfurius P, Van Deenen LL. Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature*. 1977 Jul 28;268(5618):358-60.
140. Daleke DL. Phospholipid flippases. *Journal of biological chemistry*. 2007 Jan 12;282(2):821-5.
141. Mondal M, Mesmin B, Mukherjee S, Maxfield FR. Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells. *Molecular biology of the cell*. 2009 Jan 15;20(2):581-8.
142. Laude AJ, Prior IA. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Molecular membrane biology*. 2004 Jan 1;21(3):193-205.
143. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017 Jun;18(6):361.
144. Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS, Rhee SG. Activation of phospholipase C- $\gamma$  by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Feb 20;273(8):4465-9.
145. Hannun YA, Bell RM. Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. *Clinica Chimica Acta*. 1989 Dec 15;185(3):333-45.
146. Li ZL, Buck M. Computational modeling reveals that signaling lipids modulate the orientation of K-Ras4A at the membrane reflecting protein topology. *Structure*. 2017 Apr 4;25(4):679-89.
147. Mazhab-Jafari MT, Marshall CB, Smith MJ, Gasmi-Seabrook GM, Stathopoulos PB, Inagaki F, Kay LE, Neel BG, Ikura M. Oncogenic and RASopathy-associated K-RAS mutations relieve membrane-dependent occlusion of the effector-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 May 4:201419895.
148. Lim WA, Pawson T. Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell*. 2010 Sep 3;142(5):661-7.
149. Rameh LE, Chen CS, Cantley LC. Phosphatidylinositol (3, 4, 5) P<sub>3</sub> interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell*. 1995 Dec 1;83(5):821-30.
150. Park MJ, Sheng R, Silkov A, Jung DJ, Wang ZG, Xin Y, Kim H, Thiagarajan-Rosenkranz P, Song S, Yoon Y, Nam W. SH2 domains serve as lipid-binding modules for pTyr-signaling proteins. *Molecular cell*. 2016 Apr 7;62(1):7-20.

151. Mahata B, Banerjee A, Kundu M, Bandyopadhyay U, Biswas K. TALEN mediated targeted editing of GM2/GD2-synthase gene modulates anchorage independent growth by reducing anoikis resistance in mouse tumor cells. *Scientific reports*. 2015 Mar 12;5:9048.
152. Kundu M, Mahata B, Banerjee A, Chakraborty S, Debnath S, Ray SS, Ghosh Z, Biswas K. Ganglioside GM2 mediates migration of tumor cells by interacting with integrin and modulating the downstream signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016 Jul 1;1863(7):1472-89.
153. Byrne EF, Sircar R, Miller PS, Hedger G, Luchetti G, Nachtergaele S, Tully MD, Mydock-McGrane L, Covey DF, Rambo RP, Sansom MS. Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature*. 2016 Jul;535(7613):517.
154. Huang P, Nedelcu D, Watanabe M, Jao C, Kim Y, Liu J, Salic A. Cellular cholesterol directly activates smoothed in hedgehog signaling. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1176-87.
155. Luchetti G, Sircar R, Kong JH, Nachtergaele S, Sagner A, Byrne EF, Covey DF, Siebold C, Rohatgi R. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *Elife*. 2016 Oct 5;5:e20304.
156. Bovenga F, Sabbà C, Moschetta A. Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer. *Cell metabolism*. 2015 Apr 7;21(4):517-26.
157. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature medicine*. 2003 Feb;9(2):213.
158. Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, Gratton E, Parks J, Tontonoz P. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife*. 2015 Jul 14;4:e08009.
159. Schoeniger A, Fuhrmann H, Schumann J. LPS-or *Pseudomonas aeruginosa*-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. *PeerJ*. 2016 Feb 4;4:e1663.
160. Schumann J, Leichtle A, Thiery J, Fuhrmann H. Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264. 7 macrophages. *PloS one*. 2011 Aug 24;6(8):e24066.
161. Fritzsche M, Li D, Colin-York H, Chang VT, Moendarbary E, Felce JH, Sezgin E, Charras G, Betzig E, Eggeling C. Self-organizing actin patterns shape membrane architecture but not cell mechanics. *Nature communications*. 2017 Feb 13;8:14347.
162. Tomishige M, Sako Y, Kusumi A. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton. *The Journal of cell biology*. 1998 Aug 24;142(4):989-1000.
163. Tabeling C, Yu H, Wang L, Ranke H, Goldenberg NM, Zabini D, Noe E, Krauszman A, Gutbier B, Yin J, Schaefer M. CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Mar 17:201421190.
164. Ogiso H, Taniguchi M, Okazaki T. Analysis of lipid-composition changes in plasma membrane microdomains. *Journal of lipid research*. 2015 Jun 26;jlr-M059972.
165. Milovanovic D, Honigsmann A, Koike S, Göttfert F, Pähler G, Junius M, Müller S, Diederichsen U, Janshoff A, Grubmüller H, Risselada HJ. Hydrophobic mismatch sorts

- SNARE proteins into distinct membrane domains. *Nature communications*. 2015 Jan 30;6:5984.
166. Busch DJ, Houser JR, Hayden CC, Sherman MB, Lafer EM, Stachowiak JC. Intrinsically disordered proteins drive membrane curvature. *Nature communications*. 2015 Jul 24;6:7875.
  167. Minner F, Herphelin F, Poumay Y. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. In *Epidermal Cells 2010* (pp. 71-82). Humana Press, Totowa, NJ.
  168. Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16INK4a-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Molecular and cellular biology*. 2000 Feb 15;20(4):1436-47.
  169. Gosselin K, Deruy E, Martien S, Vercamer C, Bouali F, Dujardin T, Slomianny C, Houel-Renault L, Chelli F, De Launoit Y, Abbadie C. Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *The American journal of pathology*. 2009 Feb 1;174(2):423-35.
  170. Jans R, Atanasova G, Jadot M, Poumay Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *Journal of investigative dermatology*. 2004 Sep 1;123(3):564-73.
  171. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016 Apr 1;2016(4):pdb-rot087379.
  172. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J. and Toussaint, O., 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), p.1798.
  173. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 1970 Aug;227(5259):680.
  174. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*. 2008 Jun;3(6):1101.
  175. Terunuma A, Lingala RP, Park CJ, Choudhary I, Vogel JC. Efficient procurement of epithelial stem cells from human tissue specimens using a Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Tissue engineering Part A*. 2010 Jan 11;16(4):1363-8.
  176. McMullan R, Lax S, Robertson VH, Radford DJ, Broad S, Watt FM, Rowles A, Croft DR, Olson MF, Hotchin NA. Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway. *Current biology*. 2003 Dec 16;13(24):2185-9.
  177. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Jul 1;120(7):2619-26.
  178. Campisi J. The role of cellular senescence in skin aging. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 1998 Aug 1* (Vol. 3, No. 1, pp. 1-5). Elsevier.
  179. Yaar M, Gilchrest BA. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clinics in geriatric medicine*. 2001 Nov 1;17(4):617-30.
  180. De Vuyst E, Giltaire S, Lambert de Rouvroit C, Malaisse J, Mound A, Bourtembourg M, Nikkels AF, Chretien A, Salmon M, Poumay Y. M $\beta$ CD concurs with IL-4, IL-13 and IL-

- 25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis. *Exp Dermatol*. 2016;10.
181. Mathay C, Pierre M, Pittelkow MR, Depiereux E, Nikkels AF, Colige A, Poumay Y. Transcriptional profiling after lipid raft disruption in keratinocytes identifies critical mediators of atopic dermatitis pathways. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011 Jan 1;131(1):46-58.
182. Ludovic D, Van Der Smissen P, Bruyneel F, Courtoy PJ, Tyteca D. Segregation of fluorescent membrane lipids into distinct micrometric domains: evidence for phase compartmentation of natural lipids?. *PloS one*. 2011 Feb 28;6(2):e17021.
183. D'Auria L, Fenaux M, Aleksandrowicz P, Van Der Smissen P, Chantrain C, Vermeylen C, Vikkula M, Courtoy PJ, Tyteca D. Micrometric segregation of fluorescent membrane lipids: relevance for endogenous lipids and biogenesis in erythrocytes. *Journal of lipid research*. 2013 Jan 14;jlr-M034314.
184. Carquin M, Pollet H, Veiga-da-Cunha M, Cominelli A, Van Der Smissen P, N'kuli F, Emonard H, Henriet P, Mizuno H, Courtoy PJ, Tyteca D. Endogenous sphingomyelin segregates into submicrometric domains in the living erythrocyte membrane. *Journal of lipid research*. 2014 May 14;jlr-M048538.
185. Carquin M, Conrard L, Pollet H, Van Der Smissen P, Cominelli A, Veiga-da-Cunha M, Courtoy PJ, Tyteca D. Cholesterol segregates into submicrometric domains at the living erythrocyte membrane: evidence and regulation. *Cellular and molecular life sciences*. 2015 Dec 1;72(23):4633-51.
186. Gulbins E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacological Research*. 2003 May 1;47(5):393-9.
187. Schuchman EH. Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann–Pick disease. *FEBS letters*. 2010 May 3;584(9):1895-900.
188. Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular medicine*. 2010 Dec 1;12(4):320-30.
189. Clarke CJ. Neutral Sphingomyelinases in Cancer: Friend or Foe?. *Advances in Cancer Research*. 2018 May 28.
190. Huitema K, van den Dikkenberg J, Brouwers JF, Holthuis JC. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO journal*. 2004 Jan 14;23(1):33-44.
191. Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JC. The multigenic sphingomyelin synthase family. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Oct 6;281(40):29421-5.
192. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends in cell biology*. 2018 Feb 21.
193. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*. 2017 May;9(5):52.
194. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*. 2010 Aug 1;429(3):403-17.
195. Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*. 2012 Aug 1;66(2):105-43.
196. Lloyd AC. Distinct functions for ERKs?. *Journal of biology*. 2006 Oct;5(5):13.
197. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free radical biology and medicine*. 2004 Apr 1;36(7):838-49.



198. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*. 2008 May 13;585(2-3):325-37.
199. Weidmann AE. Dihydroquercetin: more than just an impurity?. *European journal of pharmacology*. 2012 Jun 5;684(1-3):19-26.
200. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research*. 1994 Apr 1;211(2):314-21.
201. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011 Jun 1;82(4):513-23.
202. Carcho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*. 2013 Jan 1;51:15-25.