



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΙΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ»

ΦΑΡΑΟΥ ΕΛΕΝΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....(Επιβλέπων/ούσα)
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ.....(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)
ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ.....(Μέλος Τριμελούς
Επιτροπής)

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

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

«DNA DAMAGE RESPONSE AND AGE-RELATED DISEASES»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μηχανισμός απόκρισης των κυττάρων έναντι πιθανών βλαβών του γενετικού υλικού (DDR) είναι αρμόδιος για την παρακολούθηση και αποκατάσταση βλαβών που μπορεί να πηγάζουν είτε από το εσωτερικό είτε από το εξωτερικό τους περιβάλλον. Πρόκειται για ένα σύνθετο δίκτυο που απαρτίζεται από ποικίλους μηχανισμούς και μόρια και έχει στόχο την εξασφάλιση της γενετικής σταθερότητας και πιστότητας και την αποφυγή ανεπιθύμητων για το κύτταρο καταστάσεων όπως η γήρανση. Η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται ως ένα πιθανό υπόβαθρο για την επαγωγή του ανθρώπινου γήρατος αλλά και την εκδήλωση ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων. Η άθικτη λειτουργικότητα του DDR, σε συνδυασμό φυσικά με άλλες παραμέτρους όπως ο τρόπος λειτουργίας του p53, κατέχει διακεκριμένο ρόλο προκειμένου να μην κάνουν την εμφάνιση τους ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις σε συστήματα όπως το νευρικό και το μυοσκελετικό. Επομένως, μεταξύ του μηχανισμού DDR και των ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων εντοπίζεται μια σχέση άμεσης εξάρτησης καθώς τυχόν δυσλειτουργία του πρώτου συνεπάγει την πρόκληση του δεύτερου.

ABSTRACT

Cells hold a mechanism known as DNA damage response which acts against possible genetic damage (DDR) and is responsible for monitoring and remedying damage that may arise from either the internal or external environment. It is a complex network composed of various mechanisms and molecules and aims at ensuring genetic stability and conformance and avoiding undesirable states such as aging. Cellular aging is characterized as a potential background for induction of human aging but also for the occurrence of age-related diseases. The intact functionality of DDR, in combination with other parameters such as the operation of the oncogene p53, has a distinct role by preventing the presence of age-dependent diseases in systems such as nervous and musculoskeletal. Therefore, a relationship of direct dependence is found between the DDR mechanism and the age-dependent diseases, since any malfunction of the former involves the appearance of the second.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	Σελίδα 3
Abstract	Σελίδα 4
Εισαγωγή	Σελίδα 7
ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο « Μηχανισμός DDR »	
1.1 Τι είναι το DDR και ποιος ο ρόλος του	Σελίδα 9
1.2 Περιεχόμενα DDR	Σελίδα 10
1.2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες ως το βασικό εργαλείο DDR	Σελίδα 11
1.2.2 Βασικές λειτουργίες των PIKKs	Σελίδα 13
1.2.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs)	Σελίδα 15
1.2.4 Απόκριση του κυττάρου στο DDR	Σελίδα 17
1.2.4.1 Μονοπάτια επιδιόρθωσης DNA	Σελίδα 18
1.2.4.2 Κυτταρικός κύκλος και επιδιόρθωση του DNA	Σελίδα 25
1.2.4.3 Το μονοπάτι της αυτοφαγίας	Σελίδα 27
1.2.4.4 Απόπτωση του κυττάρου	Σελίδα 29
1.2.4.5 Κυτταρική γήρανση	Σελίδα 30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο « DDR ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ »	
2.1 Γήρας και κεντρικό νευρικό σύστημα	Σελίδα 34
2.2 Νευροεκφυλιστικά σύνδρομα λόγω βλαβών των επιδιορθωτικών μηχανισμών	Σελίδα 38
2.2.1 Ataxia-Telangiectasia (AT)	Σελίδα 39
2.2.2 Xeroderma pigmentosum (XP)	Σελίδα 41
2.2.3 Nijmegen breakage syndrome (NBS)	Σελίδα 42
2.2.4 Trichothiodystrophy	Σελίδα 43
2.3 Σύνδρομα προγηρίας	Σελίδα 44
2.3.1 Cockayne syndrome (CS)	Σελίδα 44
2.3.2 Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS)	Σελίδα 46
2.3.3 Werner syndrome (WS)	Σελίδα 48
2.4 Νευροεκφυλιστικά σύνδρομα και DDR	Σελίδα 48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο « DDR και μυοσκελετικές ασθένειες »	
3.1 Γήρας και μυοσκελετικό σύστημα	Σελίδα 57

3.2 Μυοσκελετικές παθήσεις και DDR	Σελίδα 58
3.2.1 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (RA)	Σελίδα 58
3.2.2 Οστεοαρθρίτιδα (OA)	Σελίδα 67
3.2.3 Οστεοπόρωση	Σελίδα 74
Συμπεράσματα	Σελίδα 80
Βιβλιογραφία	Σελίδα 82

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος γενετικό υλικό χρησιμοποιείται ευρέως για την περιγραφή του συνολικού DNA ή αντίστοιχα RNA ενός οργανισμού. Η σημασία του τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι τεραστίων διαστάσεων. Αυτή, μπορεί να αιτιολογηθεί από τις βασικότερες λειτουργίες του γενετικού υλικού όπως ο έλεγχος της σύνθεσης και δράσης των πρωτεϊνικών μορίων, η αποθήκευση και ο καθορισμός όλων των χαρακτηριστικών ενός οργανισμού αλλά και η ικανότητα του να αυτοδιπλασιάζεται μεταβιβάζοντας με συντηρητικό τρόπο τη γενετική πληροφορία από γενιά σε γενιά. Προκειμένου όμως η μεταβίβαση αυτή να χαρακτηρίζεται από πιστότητα και ακρίβεια απαιτείται η ικανότητα επιδιόρθωσης ύστερα από επαγόμενες ή αυθόρμητες βλάβες (Ciccía & Elledge, 2010).

Το γενετικό μας υλικό αποτελεί ιδανικό στόχο για παράγοντες, ενδογενείς και εξωγενείς που μπορούν να επιφέρουν σε αυτό σοβαρές και μη επιπτώσεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενδογενών παραγόντων αποτελούν τα μεταβολικά παράγωγα ενζυμικών αντιδράσεων όπως λόγω χάρη οι ελεύθερες ρίζες, είδη αζώτου, δραστικά μόρια οξυγόνου αλλά και λάθη που μπορεί να προκληθούν κατά την διάρκεια των κυτταρικών διαδικασιών (Ciccía & Elledge, 2010). Αντίθετα, στους εξωγενείς παράγοντες συγκαταλέγονται βλάβες που μπορεί να οφείλονται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ακτίνες χ, τοξίνες, χιλιάδες γενοτοξικά χημικά, κάπνισμα κ.α. όπου η διαρκής έκθεση σε αυτά έχει σαν βασική συνέπεια την διατάραξη της σταθερότητας του γονιδιώματος και την πρόκληση μεταλλάξεων (Giglia-Mari, Zotter, & Vermeulen, 2011).

Οι κατηγορίες των πιθανός εμφανιζόμενων μεταλλάξεων μπορούν να διαφοροποιηθούν με βάση τις συνθήκες εμφάνισης αλλά και της έκτασης των αλλαγών που έχουν προκληθεί. Στην πρώτη κατηγορία, απαντώνται οι αυτόματες μεταλλάξεις οι οποίες οφείλονται σε λάθη κατά την αντιγραφή είτε σε χημικά παράγωγα μεταβολικών διεργασιών αλλά και στις επαγόμενες μεταλλάξεις που εμφανίζονται έπειτα από την επίδραση χημικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Στην δεύτερη κατηγορία, ανήκουν οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπου παρατηρούνται αλλαγές σε τμήματα ή σε ολόκληρο το χρωμόσωμα αλλά και οι γονιδιακές μεταλλάξεις που χαρακτηρίζονται από αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA (Shendure & Akey, 2015). Να σημειωθεί επίσης ότι η δεύτερη κατηγορία μπορεί να προκληθεί και από αυτόματες αλλαγές.

Τα είδη των βλαβών που εντοπίζονται στο γενετικό υλικό βάση των παραπάνω παραγόντων είναι ποικίλα. Αρχικά, κατά την διαδικασία διπλασιασμού του γενετικού υλικού υπάρχει η πιθανότητα κακής ζεύξης βάσεων από την DNA πολυμεράση. Ακόμα, μπορεί να προκύψουν αλλοιώσεις των βάσεων που απαρτίζουν το γενετικό μας υλικό από διεργασίες όπως η οξειδωση, απαμίνωση, υδρόλυση, μεθυλίωση κ.α. Επίσης, παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία αλλά και οι χημικές ενώσεις μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία διμερών πυριμιδινών και αντίστοιχα στην προσθήκη ογκωδών χημικών μορίων στο μόριο του DNA (Z. Li, Pearlman, & Hsieh, 2015). Βασικότερο παράδειγμα βλάβης, που μπορεί να επαχθεί από ποικίλους παράγοντες, είναι η θραύση της μιας αλυσίδας του DNA (ssbreak) αλλά και η θραύση των δυο αλυσίδων (dsbreak) που μπορεί να συντελέσει στην εμφάνιση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και κατ' επέκταση σε αστάθεια του γονιδιώματος (Harper & Elledge, 2007).

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η εκτεταμένη περιγραφή μιας σύνθετης οδού μεταγωγής σήματος που έχει την ικανότητα να ανιχνεύει τις παραπάνω βλάβες που θέτουν σε κίνδυνο το γενετικό υλικό και να το μεταδίδει στο κύτταρο επηρεάζοντας έτσι την κυτταρική απόκριση. Αυτός ο μηχανισμός ορίζεται ως μηχανισμός απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) και είναι ζωτικής σημασίας τόσο για το κύτταρο όσο και για τον ίδιο τον οργανισμό χάρη στην ιδιότητα του να αποκαθιστά τυχόν απειλές στο γενετικό υλικό (Sirbu & Cortez, 2013). Επίσης, στόχο της παρούσας εργασίας αποτελεί η περιγραφή των νεότερων δεδομένων που αφορούν την εμπλοκή και σημασία του μηχανισμού αυτού στη γήρανση του κυττάρου αλλά και στις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες, όπως οι νευροεκφυλιστικές και οι ασθένειες του μυοσκελετικού συστήματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ DDR

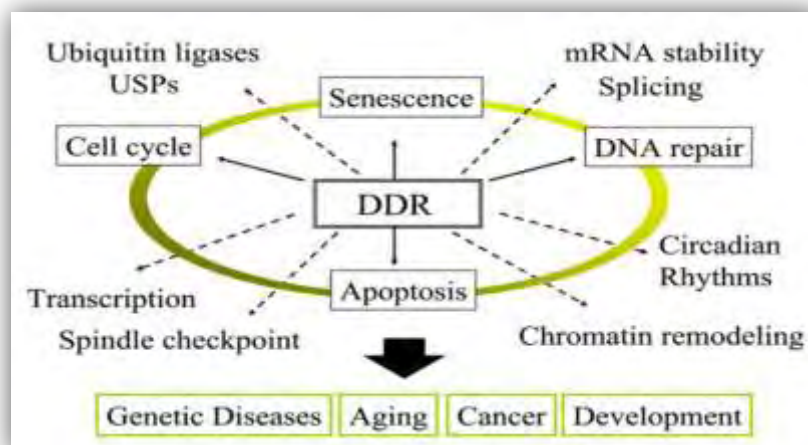
1.1 Τι είναι το DDR και ποιος ο ρόλος του

Η καταστροφή του γενετικού υλικού είναι μια απειλή σε διαρκής εξέλιξη η οποία χαρακτηρίζεται από σοβαρό κίνδυνο μεταβίβασης της γενετικής πληροφορίας σε μη συντηρητική μορφή αλλά και αμφιβολίες για την ίδια μας την επιβίωση. Τυχόν δομικές μεταβολές του DNA από ποικίλες πηγές βλάβης μπορούν να συντελέσουν σε διατάραξη βασικών λειτουργιών του κυττάρου. Βασική προϋπόθεση για την συντονισμένη λειτουργία των κυττάρων αλλά και την ιδιότητα τους για ορθή μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από κύτταρο σε κύτταρο και κατ' επέκταση από γενιά σε γενιά αποτελεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος.

Το ευκαρυωτικό κύτταρο ωστόσο έχει φροντίσει για αυτό χάρη στην ανάπτυξη ενός πολύπλοκου δικτύου (DDR) που λειτουργεί σε πρώτη φάση σαν ανιχνευτής τυχόν βλαβών του γενετικού υλικού και στη συνέχεια σαν μεταδότης του σήματος αυτού στο κύτταρο (REF) (Maréchal & Zou, 2013). Με αυτό τον τρόπο, διεγείρει την κυτταρική απόκριση μέσω ενός οπλοστασίου ενζυμικών εργαλείων όπου σαν αποτέλεσμα, με επιλεκτικό τρόπο, επιτυγχάνεται ενεργοποίηση διεργασιών που εμπλέκουν πολλαπλά επίπεδα αποφάσεων τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, παύση του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση, αυτοφαγία, ακόμα και γήρανση ή νέκρωση του κυττάρου ώστε να εξουδετερώνονται κατεστραμμένα κύτταρα. Ακόμη, συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η μείωση, η διατήρηση της ομοιόστασης των τελομερών αλλά και σε περιπτώσεις μόλυνσης από ιούς (REF) (Huen, 2008).

Όμως, προκειμένου να αποφεύγονται ανεπιθύμητες και καταστροφικές αλλοιώσεις που μπορεί να αφορούν τη δομή του κυττάρου, τη διάρκεια και τη διεξαγωγή κυτταρικών διεργασιών και μπορούν να φτάσουν έως και την καρκινογένεση βασική προϋπόθεση είναι όλες οι δραστηριότητες του DDR να είναι αυστηρά ελεγχόμενες τόσο ως προς το χρόνο όσο προς το χώρο (Z. Li et al., 2015). Γενικότερα, τα μονοπάτια του DDR έχουν μια κοινή πλώρη πλεύσης μέσω της οποίας προηγείται η ανίχνευση της βλάβης, ακολουθεί η εγκατάσταση των DNA επιδιορθωτικών παραγόντων και τελικά αποκατάσταση της βλάβης. Έτσι, η

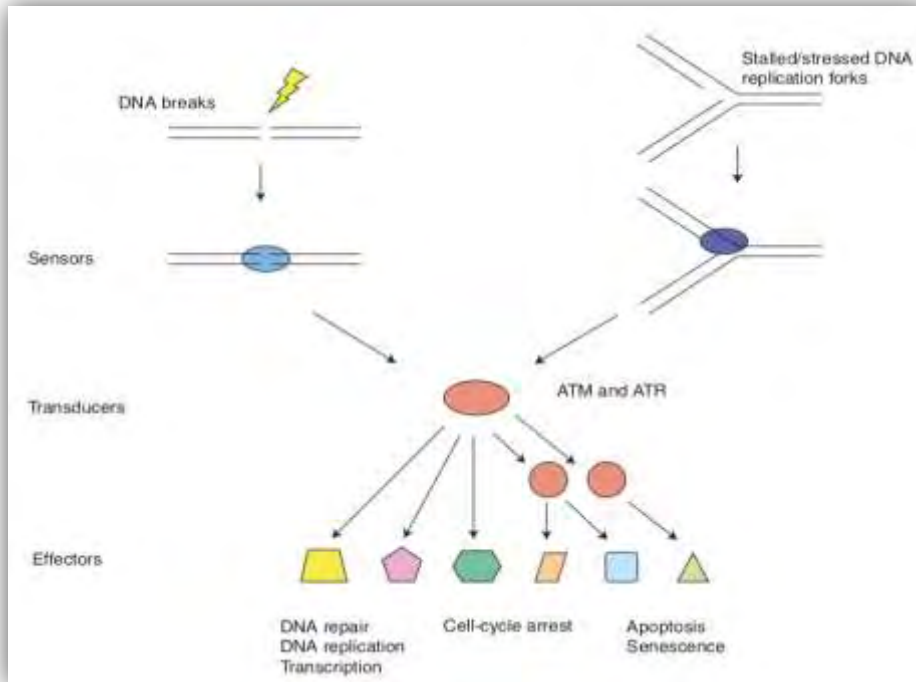
εξασφάλιση της σταθερότητας του γονιδιώματος συμβάλει την αποφυγή της ανάπτυξης ασθενειών που έχουν άμεση σχέση με την ακεραιότητα του γενετικού υλικού όπως λόγω χάρη ο καρκίνος, ή/και ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, οι νόσοι του μυοσκελετικού κ.α (Y. Liu, Li, & Lu, 2016).



Εικόνα 1.1: Αναπαράσταση μηχανισμού DDR και επιλογές απόκρισης του κυττάρου (Harper & Elledge, 2007).

1.2 Περιεχόμενα DDR

Όπως κάθε άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι, έτσι και το DDR απαρτίζεται από πολλά εν μέρη τμήματα που συμβάλουν στη σωστή λειτουργία και διεξαγωγή του με σκοπό την διατήρηση της γονιδιακής σταθερότητας. Πρώτα από όλα, αφού το γενετικό υλικό υποστεί μια βλάβη, ειδικοί ανιχνευτές, που ανήκουν κυρίως στην ομάδα των πρωτεϊνών, μπορούν και εντοπίζουν τη βλάβη αυτή. Σε δεύτερη φάση, εξασφαλίζουν την ενεργοποίηση ειδικών μεταδοτών που πρόκειται κυρίως για πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες με την σειρά τους ενεργοποιούν ειδικά υποστρώματα που οδηγούν στην απόκριση του κυττάρου με ποικίλους τρόπους (Maréchal & Zou, 2013).



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση ροής μονοπατιού DDR. Αφού μια βλάβη διαταράζει τη δομή και τη λειτουργία του γενετικού υλικού, η δραστηριοποίηση του μονοπατιού DDR διαμεσολαβεί από ειδικούς ανιχνευτές, μεταδότες και τελεστές (Maréchal & Zou, 2013).

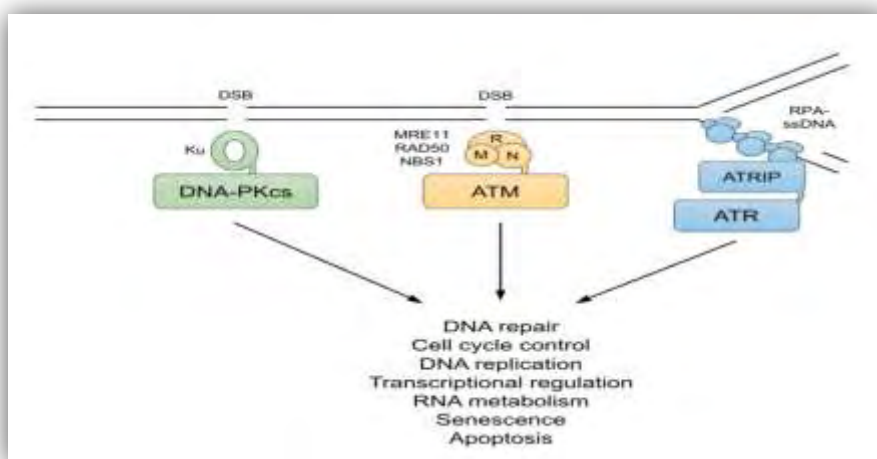
1.2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες ως το βασικό εργαλείο του DDR

Η απόκριση των ευκαρυωτικών κυττάρων σε περιπτώσεις ανώμαλων δομών του γενετικού υλικού, στηρίζεται στην δράση μιας οικογένειας πρωτεϊνών που δρουν κυρίως σαν ανιχνευτές. Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών-κινασών ονομάζεται PIKKS (Phosphoinositide-3-related protein kinase) και περιλαμβάνει τρία βασικά μέλη, την ATM (ataxia-telangiectasia mutated), την ATR (ataxia-telangiectasia related) και την DNA-PK (DNA-protein kinase catalytic subunit). Βασικός τους ρόλος αφού ενεργοποιηθούν, είναι η φωσφορυλίωση ειδικών υποστρωμάτων και η μεταφορά του σήματος συμμετέχοντας έτσι στην διασφάλιση της γονιδιακής σταθερότητας (Hiom, 2005).

Κοινό χαρακτηριστικό των κινασών αυτών αποτελεί το γεγονός ότι μοιράζονται μεταξύ τους ίδιο χώρο οργάνωσης και διαθέτουν παρόμοια δομικά συστατικά (Baretic & Williams, 2014). Σχετικά με την ενεργοποίησή τους, βασικό

ρόλο παίζουν ειδικοί συμπαράγοντες οι οποίοι δρουν σαν δεσμευτικοί τους συνεργάτες και μπορούν και καθορίζουν βασικές τους λειτουργίες όπως τη δραστηριότητα τους σαν κινάσες, την επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος δέσμευσης αλλά και τη θέση εντοπισμού τους (Baretic & Williams, 2014). Ο συμπαράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για την δραστηριοποίηση της ATM είναι ο NBS1, για την ATR ο ATRIP ενώ για την DNA-PK οι Ku70 και Ku80 (Blackford & Jackson, 2017). Μόλις το γενετικό υλικό υποστεί βλάβη, αυτή εντοπίζεται άμεσα από ειδικούς ανιχνευτές όπως το σύμπλοκο MRN (MRE11-RAD50-NBS1) που δρα σαν ενεργοποιητής της ATM και το TOPBP1 αντίστοιχα για την ATR (Baretic & Williams, 2014).

Κάθε μια από τις τρεις κινάσες είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση συγκεκριμένου τύπου βλάβης του DNA. Συγκεκριμένα, η ATM αποκρίνεται σε επιπλοκές που μπορεί να προέρχονται από υπέρυθη ακτινοβολία όπως οι διπλές θραύσεις του γενετικού υλικού ή διαταραχές στη δομή της χρωματίνης. Αντίθετα, η ATR ανταποκρίνεται σε θραύσεις της μιας έλικας του γενετικού υλικού αλλά και βλάβες που οφείλονται κυρίως σε υπεριώδη ακτινοβολία και μπορούν να οδηγήσουν σε παρεμπόδιση της δημιουργίας πιρουινίων διπλασιασμού (Mordes & Cortez, 2008). Σε αυτή την περίπτωση, ο συμπαράγοντας ATRIP αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη RPA η οποία εμπλέκεται σε θραύσεις της μια έλικας του DNA (Z. Li et al., 2015). Τέλος, η DNA-PK κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στον επιδιορθωτικό μηχανισμό NHEJ και είναι παρόν σε περιπτώσεις αποκατάστασης διπλών θραύσεων του DNA, συμμετέχει στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και στη διατήρηση των τελομερών (Serrano et al., 2013).



Εικόνα 1.3: Ρόλος των PIKKS στον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του DNA και σύμπλοκα προσέγγισης τους (Blackford & Jackson, 2017).

1.2.2 Βασικές λειτουργίες των PIKKS

Όπως προαναφέρθηκε, οι τρεις βασικές πρωτεϊνικές κινάσες, ATM, ATR και DNA-PK στρατολογούνται στο σημείο ύπαρξης βλάβης ύστερα από αλληλεπιδράσεις με ειδικούς συμπαράγοντες και πρωτεϊνικά μόρια. Εφόσον εγκατασταθούν, στο σημείο αυτό λαμβάνουν μέρος μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αλλά και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις οδηγώντας με αυτό τον τρόπο τις κινάσες στη φωσφορυλίωση στόχων που ανήκουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι πρωτεΐνες τελεστές του DDR μπορεί να είναι είτε απευθείας φωσφορυλιωμένες από τις ATM, ATR ή από τις Chk1 ή Chk2 του κυτταρικού κύκλου (Baretic & Williams, 2014).

Γενικότερα, μπορούμε να διακρίνουμε τρία βασικά στάδια επιδιορθωτικής δράσης των κινασών όπου και αποτελούν τις βασικότερες προσφερόμενες λειτουργίες του στο μηχανισμό DDR. Αρχικά, συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA, στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με βάση την ύπαρξη ή όχι μιας βλάβης καθώς επίσης στον καθορισμό της μοίρας του κυττάρου. Δεύτερον, μπορούν και μεταβάλουν την δομή της χρωματίνης ώστε το περιβάλλον να είναι κατάλληλο για να διεξαχθεί τυχόν επιδιόρθωση. Ακόμα, διαθέτουν την ικανότητα ρύθμισης του κυτταρικού περιβάλλοντος με το να επιβλέπουν την λειτουργία του κυτταρικού κύκλου αλλά και τη διαδικασία της μεταγραφής (Sirbu & Cortez, 2013).

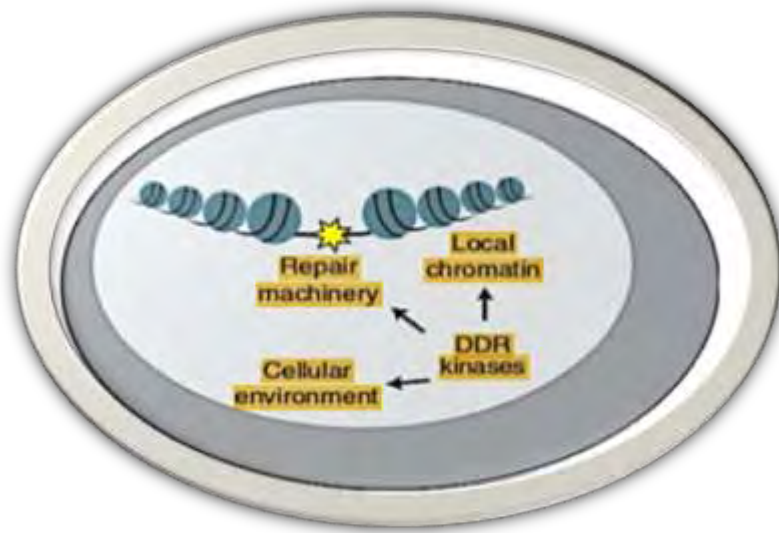
Αναλυτικότερα, στην πρώτη περίπτωση, οι κινάσες ATM και ATR αφού ενεργοποιηθούν λόγω ύπαρξης βλάβης, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν στόχους με αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου. Οι στόχοι αυτοί μπορεί να είναι η Chk1 ή η Chk2 όπου αποτελούν τις κινάσες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Με αυτό τον τρόπο, ενεργοποιούνται τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ο κυτταρικός κύκλος σταματά και παραχωρείται στα κύτταρα το απαραίτητο χρονικό διάστημα για να επιλέξουν μεταξύ της επιδιόρθωσης, της απόπτωσης ή ακόμα της νέκρωσης τους (Maréchal & Zou, 2013).

Εκτός από τους δυο παραπάνω στόχους, οι δυο κινάσες μπορούν να φωσφορυλιώσουν και στόχους όπως το p53 όπου οδηγούμαστε σε παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, το BRCA1 και το SMC1 όπου αντίστοιχα ο

κυτταρικός κύκλος σταματά στην φάση S. Επίσης, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, σε περιπτώσεις διπλής θραύσης του γενετικού υλικού, επιδρά με την ATM και την Chk2 κι έτσι πέρα της παύσης του κυτταρικού κύκλου μπορεί να προκύψει το γήρας ή η απόπτωση του κυττάρου λόγω μεταγραφικής ρύθμισης των CDKS από τον αναστολέα p21 και τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες BAX και PUMA (Ciccia & Elledge, 2010).

Στην δεύτερη περίπτωση, πολύ βασική παράμετρος που επηρεάζει την απόκριση σε τυχόν βλάβες του DNA αλλά και την ικανότητα επιδιόρθωσης αποτελεί η ρύθμιση της δομής της χρωματίνης. Στις διπλές θραύσεις του DNA, η ATM και ATR ρυθμίζουν την χρωματίνη κοντά στο σημείο της βλάβης ώστε να διευκολύνουν το έργο της επιδιόρθωσης (Baretic & Williams, 2014). Πιο συγκεκριμένα, η ετεροχρωματίνη σε αντίθεση με την ευχρωματίνη είναι πολύ πιο δύσκολα προσβάσιμη από επιδιορθωτικές πρωτεΐνες επηρεάζοντας έτσι την δραστηριότητα τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ρύθμισης της χρωματίνης αποτελεί η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX σε γH2AX από την ATM σε παρουσία διπλής θραύσης του DNA. Με αυτό τον τρόπο, η χρωματίνη σημαίνεται άμεσα για επιδιόρθωση προσελκύοντας έτσι χιλιάδες επιδιορθωτικές πρωτεΐνες (Maréchal & Zou, 2013).

Έτσι, οι κινάσες DDR διευκολύνουν την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού εξασφαλίζοντας ένα άριστο κυτταρικό περιβάλλον. Μέσω της ιδιότητάς τους να ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου παρουσία βλάβης, προσδίδουν στο κύτταρο χρόνο για επιδιόρθωση πρώτου υποστεί μίτωση. Επίσης, τυχόν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων από τις συγκεκριμένες κινάσες μπορούν να διαφοροποιήσουν τα επίπεδα επιδιορθωτικών ενζύμων ή ακόμα τις ιστόνες και τα νουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα τόσο για την επιδιόρθωση του DNA όσο για την τροποποίηση της χρωματίνης (Sirbu & Cortez, 2013).



Εικόνα 1.4: Βασικές λειτουργίες DDR κινασών. Η ρύθμιση του μηχανισμού επιδιόρθωσης σε συνδυασμό με τη ρύθμιση της χρωματίνης και του κυτταρικού περιβάλλοντος συνεπάγεται την καταπολέμηση των βλαβών του γενετικού υλικού (Sirbu & Cortez, 2013).

1.2.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs)

Το ευκαρυωτικό κύτταρο προκειμένου να εξασφαλίσει τον διπλασιασμό του αλλά και την ασφαλή ροή της γενετικής πληροφορίας μπορεί και ανιχνεύει σε πρώτη φάση τυχόν απειλές και στη συνέχεια να διεγείρει την απόκριση του κυττάρου με ποικίλους τρόπους. Βασικό ρόλο στον μηχανισμό απόκρισης του κυττάρου σε προκληθέντες βλάβες παίζουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση, ακετυλίωση κ.α. Ωστόσο, πρωταγωνιστικό ρόλο διαθέτουν η φωσφορυλίωση και η ουβικιτινιλίωση των πρωτεϊνών εξασφαλίζοντας έτσι την γενετική σταθερότητα αλλά και την αποτροπή της ογκογένεσης. Οι τροποποιήσεις αυτές γίνονται ανιχνεύσιμες από πρωτεϊνικούς φορείς πολλοί από τους οποίους συμμετέχουν στην πρόληψη έναντι βλαβών του γενετικού υλικού (Huen, 2008).

Αρχικά, κατά τη διαδικασία της φωσφορυλίωσης, οι πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας PIKKS φωσφορυλιώνουν ειδικά υποστρώματα που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση μιας γενετικής βλάβης, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο αλλά και την εξουδετέρωση του γενοτοξικού στρες (Huen, 2008). Όπως έχει προαναφερθεί, χαρακτηριστικά υποστρώματα των PIKKS μπορεί να αποτελέσουν η Chk1 ή η Chk2 αλλά και άλλα πρωτεϊνικά μόρια

που ξεπερνούν τα 700 σε αριθμό. Βασική τους δράση είναι η ομοιοπολική σύνδεση μιας φωσφορικής ομάδας με μια σερίνη, τυροσίνη ή θρεονίνη του αντίστοιχου υποστρώματος που τίθεται προς φωσφορυλίωση. Ως αποτέλεσμα, το υπόστρωμα στόχος αποκτά αρνητικό φορτίο, το οποίο μπορεί να αναστραφεί μέσω της δράσης των φωσφατάσεων και αντίστοιχα να προκύψει ενεργοποίηση ή αναστολή της δράσης ενός ενζύμου (Y. Liu et al., 2016).

Αμέσως μετά την εμφάνιση μιας βλάβης πραγματοποιείται άμεση φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX σε γH2AX από την κινάση ATM και ακολούθως αναγνώριση της γH2AX ιστόνης από την MDC1 η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνεται εξίσου από την ATM (Y. Liu et al., 2016). Στη συνέχεια μια μικρή πρωτεΐνη 76 αμινοξέων, η ουβικουϊτίνη, παίζει ρόλο στην αναστολή της δράσης ή αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης μέσω της σύνδεσης της σε ποικίλες δεσμευτικές περιοχές λυσίνης. Οι δυο τύποι ουβικουϊτινίωσης, μονουβικουϊτινίωση και πολουβικουϊτινίωση, συντελούν στην μεταφορά του σήματος για την δραστηριοποίηση των παραγόντων που συμμετέχουν στο μονοπάτι DDR (Roos & Kaina, 2006). Ο μηχανισμός της ουβικουϊτινίωσης διεκπεραιώνεται από τρία ένζυμα-λιγάσες, E1, E2 και E3 όπου ανιχνεύουν το στόχο και ως συνέπεια τον μεταφέρουν στο πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση (Huen, 2008).

Οι δυο περισσότερο διαδεδομένες λιγάσες ουβικουϊτίνης E3 που συμμετέχουν στον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του κυττάρου είναι η RNF8 και η RNF168. Στον πρώτο γύρο ουβικουϊτινίωσης, σε περιπτώσεις βλάβης, εμφανίζεται αρχικά η RNF8 η οποία δρα ουβικουϊτινιώνοντας ιστόνες τύπου H2A όπου στη συνέχεια θα παίξουν τον ρόλο του δημιουργού περιοχών δέσμευσης για την RNF168. Με αυτό τον τρόπο θα τεθεί σε λειτουργία ο δεύτερος γύρος της ουβικουϊτινίωσης όπου σαν αποτέλεσμα το σήμα θα επεκταθεί και θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση επιδιορθωτικών πρωτεϊνών όπως η BRCA1 (Ciccía & Elledge, 2010). Γενικότερα, εκτιμώντας την δραστικότητα των RNF8 και RNF168, η RNF8 από μόνη της είναι μια μη λειτουργική H2X E3 λιγάση όπου είναι ανίκανη να επιδιορθώσει ένα σφάλμα, σε αντίθεση με την RNF168 που μπορεί αποτελεσματικά να πολουβικουϊτινιώσει ιστόνες και να μεταφέρει επιτυχώς το σήμα κινδύνου (Y. Liu et al., 2016).

Έπειτα από αρκετές μελέτες, ανακάλυψαν ότι όλα τα είδη μετα-μεταφραστικής τροποποίησης αλληλεπιδρούν αλλά και συνυπάρχουν μεταξύ τους στο DDR. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 το οποίο μπορεί να υποστεί ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση αλλά και

ουβικουιτινιλίωση με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δραστηριότητας του ως μεταγραφικός παράγοντας. Έτσι, μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη γήρανση, έως και την απόπτωση του κυττάρου (Huen, 2008). Επίσης, ένα ακόμη παράδειγμα διασύνδεσης μεταξύ των επιγενετικών τροποποιήσεων αποτελεί το γεγονός ότι βασική προϋπόθεση για την ουβικουιτινιλίωση της ιστόνης H2A είναι η ακετυλίωση αυτής νωρίτερα (Huen, 2008).

Επιπλέον μια βλάβη στο γενετικό υλικό μπορεί να σταθεί εμπόδιο στη δράση των μεθυλοτρανφερασών και τελικά να οδηγήσει σε απομεθυλίωση αλλά και αναστολή της αποσιώπησης κάποιων γονιδίων (Moskalev et al., 2013). Σημειώνεται ότι βασική λειτουργία του μηχανισμού της μεθυλίωσης είναι η αποσιώπηση γονιδίων μέσω της μεταφοράς και προσθήκης σε ειδικές περιοχές μιας μεθυλομάδας από τις μεθυλοτρανσφεράσες. Έτσι οι βλάβες του γενετικού υλικού και κατ'επέκταση ο μηχανισμός DDR εμπλέκονται και στη δράση των επιγενετικών μηχανισμών. Επιπλέον, βρέθηκε ότι μεθυλίωση του DNA σχετίζεται άμεσα με τη γήρανση και τις ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες γεγονός που άμεσα συσχετίζει το μηχανισμό DDR με αυτές τις παθολογίες (Moskalev et al., 2013).

Τέλος, ένας ακόμη επιγενετικός μηχανισμός που συμβάλει στον έλεγχο του επιπέδου των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο DDR, κυρίως σε dsbreaks, είναι τα microRNAs. Η ανίχνευση τους γίνεται ενδοκυτταρικά ή στα υγρά του σώματος και επιδιώκουν τον έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών μέσω της αποικοδόμησης του mRNA ή καταστολή της διαδικασίας της μετάφρασης. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα από το σύνολο των miRNAs είναι το miR-24 το οποίο σε περιπτώσεις υπερέκφρασης μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση της ιστόνης H2AX, που όπως αναφέρθηκε αποτελεί βασικό ανιχνευτή των dsbreaks (Hu & Gatti, 2011). Επιπλέον, το miR-421 όπου σε κατάσταση αυξημένης έκφρασης αναστέλλει τη δράση της ATM, προκαλεί την ατελή λειτουργία του S σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και κατ' επέκταση συνεπάγει την υπερευαισθησία του γενετικού υλικού σε ιοντόζουσα ακτινοβολία κ.α. (Hu & Gatti, 2011).

1.2.4 Απόκριση του κυττάρου στο DDR

Το ευκαρυωτικό κύτταρο, όπως αναφέρθηκε, έχει εφεύρει ένα εκλεπτυσμένο δίκτυο απόκρισης σε πιθανές βλάβες του DNA (DDR) με σκοπό την επίλυση

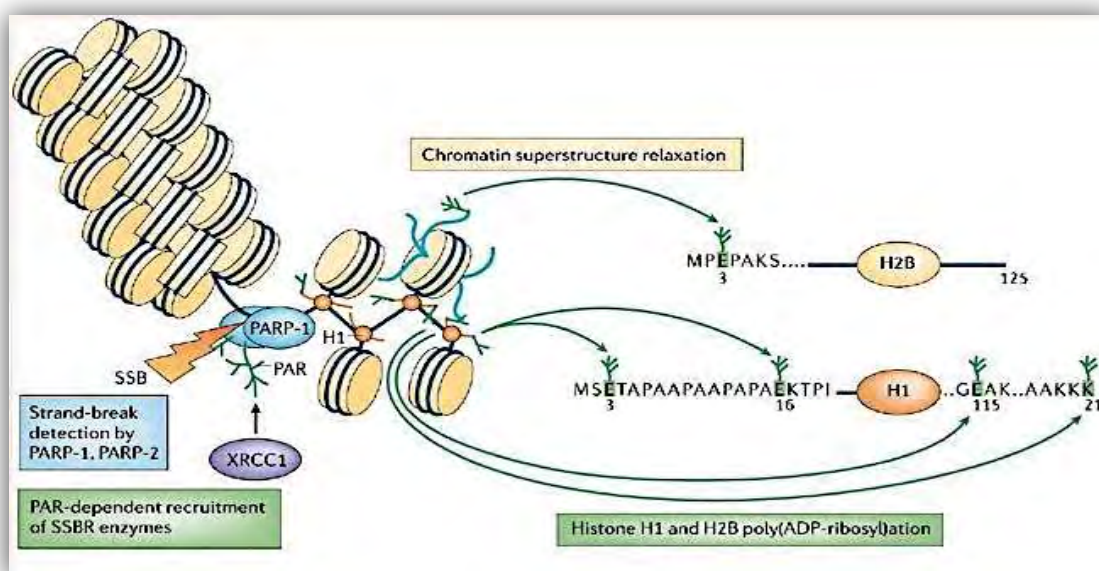
προβλημάτων που καθίστανται σαν απειλές για το γενετικό υλικό. Βασικά περιεχόμενα του δικτύου αυτού είναι ένα σύνολο επιδιορθωτικών μηχανισμών, μηχανισμοί ανεκτικότητας του κυττάρου καθώς επίσης σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Giunta, Belotserkovskaya, & Jackson, 2010). Στόχος του DDR μηχανισμού είναι αρχικά η εξασφάλιση της γενετικής σταθερότητας και κατ' επέκταση της ανθρώπινης υγείας αποτρέποντας την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών που μπορεί να επηρεάσουν το νευρικό ιστό, το μυοσκελετικό σύστημα κ.α.

1.2.4.1 Μονοπάτια επιδιόρθωσης DNA

Τον ρόλο του πυρήνα στο μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του γενετικού υλικού κατέχουν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA όπου καθένας από αυτούς είναι αρμόδιος για την επίλυση συγκεκριμένου τύπου βλάβης. Λειτουργώντας όλοι μαζί σαν σύνολο καταφέρνουν να απομακρύνουν την πλειονότητα των βλαβών που απειλούν την σταθερότητα του γονιδιώματος και να αποτρέψουν την επίδραση τυχόν μεταλλάξεων. Πιο συγκεκριμένα, σε θραύσεις της μιας έλικας του γενετικού υλικού έχουν την ιδιότητα να ανιχνεύουν το σφάλμα και να το επιδιορθώνουν χρησιμοποιώντας σαν καλούπι την πληροφορία από την συμπληρωματική έλικα του DNA σε αντίθεση με τις θραύσεις και των δυο συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA όπου δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο (Chapman, Taylor, & Boulton, 2012).

Γενικότερα, πρωταρχικό κριτήριο για την ενεργοποίηση ενός από τους ποικίλους μηχανισμούς επιδιόρθωσης είναι εάν έχει προηγηθεί θραύση της μιας έλικας του DNA (ssbreak) είτε θραύση και στις δυο έλικες (dsbreaks). Σε κάθε μια από τις δυο περιπτώσεις κάνουν την εμφάνιση τους διαφορετικοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί. Στην περίπτωση βλαβών της μιας έλικας του DNA, οι δυο πιο άμεσοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι η απευθείας αναστροφή των βλαβών με τη μέθοδο της φωτόλυσης αλλά και με τη δράση του αυτοκτονικού ενζύμου MGMT. Στην πρώτη περίπτωση, ειδικά ένζυμα, φωτολυάσες, έχουν την επιλεκτική ικανότητα να αναστρέφουν άμεσα βλάβες του γενετικού υλικού που οφείλονται σε ακτινοβολία UV (Giglia-Mari et al., 2011). Στην δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται μεθυλίωση της γουανίνης που οδηγεί στην παραγωγή 06-μεθυλογουανίνης. Η διόρθωση γίνεται μέσω της μεταφοράς της μεθυλομάδας στο ένζυμο MGMT καθιστώντας το αυτόματα σε ενεργή κατάσταση και ακολούθως σε αποικοδόμηση αυτού από το πρωτεόσωμα (Z. Li et al., 2015).

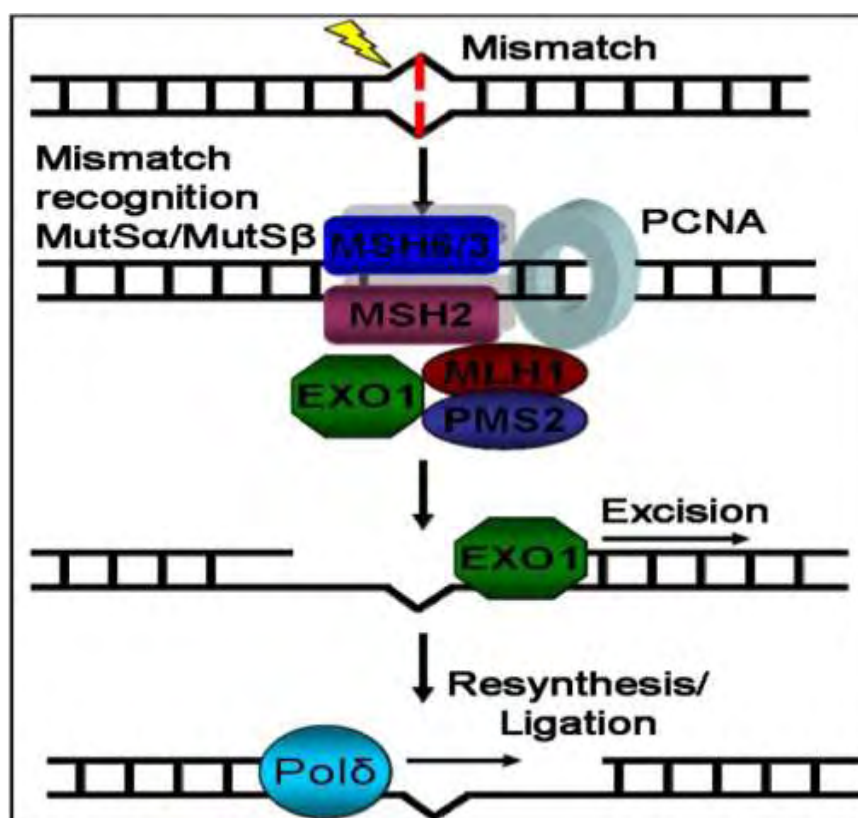
Ακόμα ένας μηχανισμός που συμμετέχει κυρίως στην αποκατάσταση βλαβών της μιας αλυσίδας είναι η ενεργοποίηση των πυρηνικών πρωτεϊνών της οικογένειας των PARP. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η PARP1 και η PARP2 που δρουν σαν μοριακοί ανιχνευτές τόσο των ssbreaks όσο των dsbreaks. Ένα από τα πιο πρώιμα γεγονότα του DDR είναι η δραστηριοποίηση των παραπάνω πρωτεϊνών, η σύνδεση τους στα σπασίματα του γενετικού υλικού και η δημιουργία ολιγο- ή πολυ- (ADP-ribose) αλυσίδων ομοιοπολικά στον εαυτό τους ή σε άλλες πρωτεΐνες στόχους. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες ονομάζονται αλυσίδες PAR και σχηματίζονται εντός ολίγων δευτερολέπτων με σκοπό την στρατολόγηση των παραγόντων DDR σε σπασίματα της χρωματίνης (Ciccia & Elledge, 2010).



Εικόνα 1.5: Δράση της πρωτεΐνης PARP (Schreiber, Dantzer, Amé, & De Murcia, 2006).

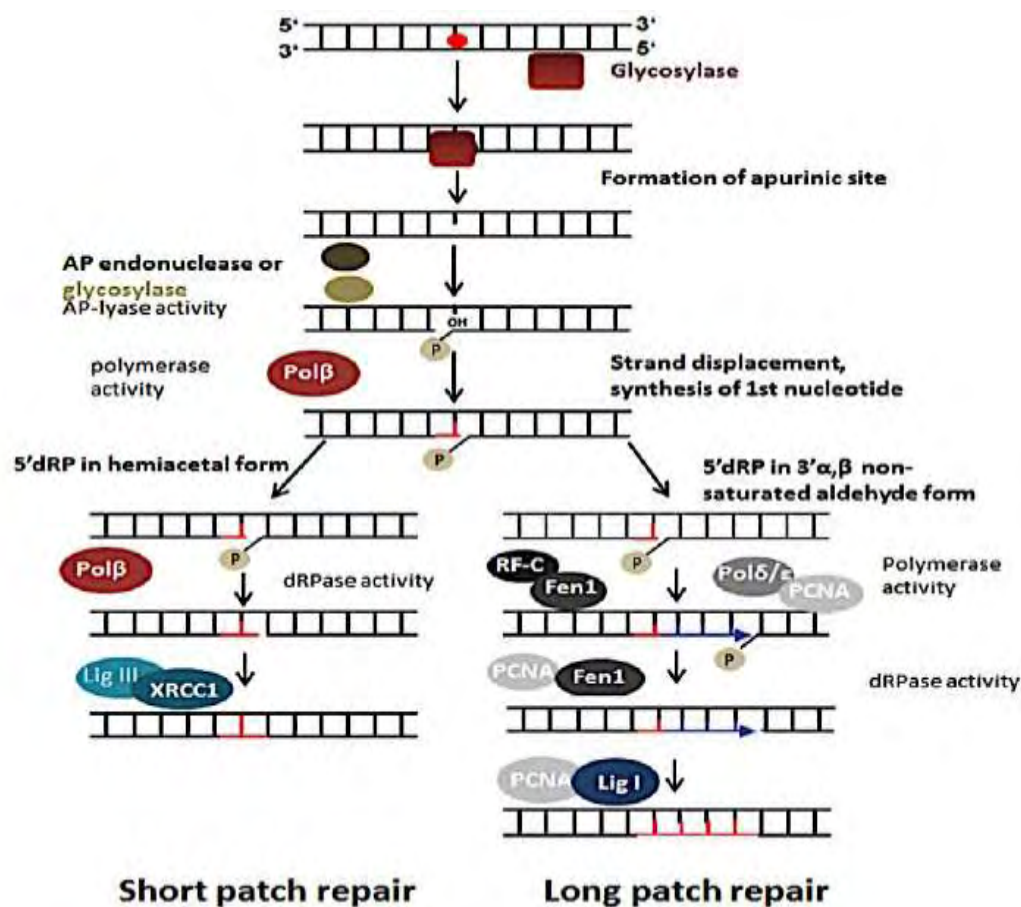
Εκτός των μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών υπάρχουν και μηχανισμοί που έχουν την ικανότητα εκτομής της βλάβης όπως ο MMR, ο BER και ο NER. Αναλυτικότερα, ο MMR (Mismatch Repair) είναι ο μηχανισμός επιδιόρθωσης κακής ζεύξης που διεξάγεται μετά τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού από την DNA πολυμεράση και εντοπίζει τυχόν τυπογραφικά λάθη όπως απαλοιφή ή λάθος προσθήκη βάσεων (Moskalev et al., 2013). Βασικότερα στάδια του μηχανισμού είναι η αναγνώριση της βλάβης, ξετύλιγμα της έλικας, αφαίρεση της βλάβης, πολυμερισμός και συγκόλληση. Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν είναι το MLH1 και το MSH2 το οποίο αλληλοεπιδρά με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και

συμμετέχει και σε άλλους μηχανισμούς όπως ο BER, NER κ.α. (Williams & Schumacher, 2016).



Εικόνα 1.6: Μηχανισμός επιδιόρθωσης κακής ζεύξης (MMR) (Themeli & Spyridonidis, 2012).

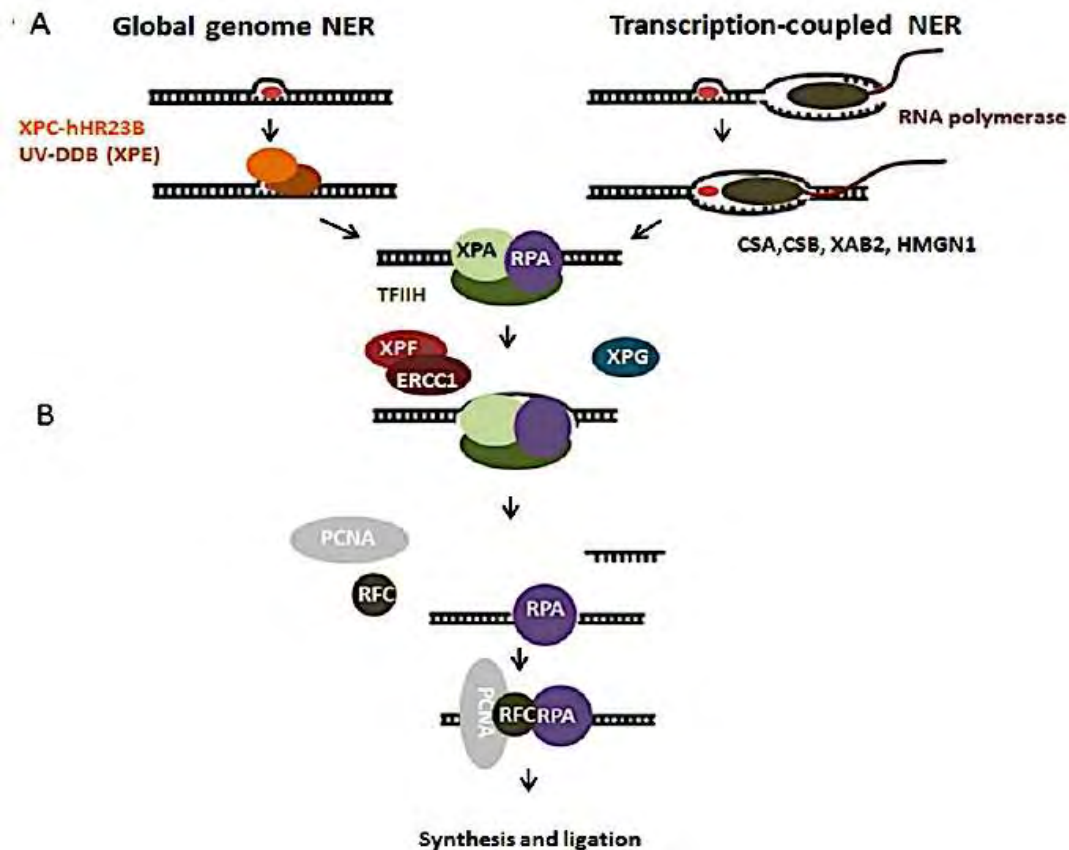
Στη συνέχεια, ένας ακόμη μηχανισμός που ανήκει στην ίδια κατηγορία με τον MMR είναι ο BER (Base excision repair) που συμβάλει στην επιδιόρθωση μέσω εκτομής μιας βάσης που εμφανίζει μικρές χημικές αλλοιώσεις. Οι αλλοιώσεις αυτές, οι οποίες είναι και οι συνηθέστερες, αφορούν χημικές τροποποιήσεις όπως η οξείδωση, η μεθυλίωση, η απαμίνωση κ.α. Αφού λοιπόν γίνει αναγνώριση της βλάβης, το ένζυμο DNA γλυκοσυλάση, το οποίο δέχεται επιρροή και από το p53, μέσω απαμίνωσης της κιτοσίνης στοχεύει στην αφαίρεση της ουρακίλης που έχει δημιουργηθεί λαθεμένα κόβοντας τον γλυκοζυτικό δεσμό μεταξύ της βάσης που έχει τη βλάβη και του σακχάρου. Έπειτα, μια ενδονουκλεάση, κόβει την αλυσίδα κοντά στην περιοχή της βλάβης, απομακρύνει μερικά νουκλεοτίδια και το κενό που δημιουργείται συμπληρώνεται με την δράση της ειδικής για τον BER πολυμεράσης β και τελικά υφίσταται τη δράση του συμπλόκου XRCC1/λιγάση 3 (Giglia-Mari et al., 2011).



Εικόνα 1.7: Μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω εκτομής βάσης (BER) (Leyns & Gonzalez, 2012).

Τελευταίος ο NER (Nucleotide excision repair), ένας περίπλοκος μηχανισμός, δρα επιδιορθώνοντας λάθη μέσω εκτομής ενός νουκλεοτιδίου και διεξάγεται από τουλάχιστον 25 διαφορετικά πολυπεπτίδια. Οι βλάβες αυτές είναι υπεύθυνες για την παραμόρφωση του σχήματος της έλικας του DNA αλλά και τη δημιουργία ομοιοπολικών συνδέσεων ογκοδών χημικών μορίων. Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από δυο διαφορετικούς τύπους, τον γενικό γονιδιωματικό NER ο οποίος συμβάλει στην επίλυση βλαβών που αφορούν ολόκληρο το γονιδίωμα (NER-GG) και τον συνδεδεμένο με την μεταγραφή NER που απομακρύνει βλάβες που έχουν προκύψει από την μεταγραφή (NER-TC) (Giglia-Mari et al., 2011). Γενικά, τα στάδια αποδιάταξης, ξετυλίγματος της έλικας και απομάκρυνσης της βλάβης είναι κοινά και στους δυο τύπους, με την μόνη διαφορά όμως ότι στον NER-TC η αναγνώριση της βλάβης γίνεται από την RNA πολυμεράση και τους παράγοντες CSA και CSB (

Cockayne syndrome factors A & B) ενώ στον NER-GG από την πρωτεΐνη XPC (Giglia-Mari et al., 2011).



Εικόνα 1.8: Μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω εκτομής νουκλεοτιδίου (NER) (Leyns & Gonzalez, 2012).

Όσον αφορά τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης σε θραύσεις και των δυο αλυσίδων του DNA, οι προηγούμενοι μηχανισμοί δεν ισχύουν καθώς η βλάβη αφορά και τις δυο αλυσίδες και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η άλλη αλυσίδα ως καλούπι. Τα dsbreaks αποτελούν το πιο σοβαρό είδος βλάβης και μπορούν να συμβούν κατά τη διάρκεια της μίτωσης καθώς επίσης κατά τη διάρκεια της μείωσης. Στην δεύτερη περίπτωση, η επιδιόρθωση μειωτικών λαθών είναι πολύ σημαντική καθώς η παραγωγή μη φυσιολογικών γαμετών κατά τις μειωτικές διαιρέσεις μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα κ.α. (Chapman et al., 2012).

Με βασικό κριτήριο σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου εντοπίζεται η βλάβη, έχουν διακριθεί τρία βασικά επιδιορθωτικά μονοπάτια των dsbreaks. Πρώτο μονοπάτι είναι η μη ομόλογη συγκόλληση σπασμένων άκρων με έλλειψη λίγων

νουκλεοτιδίων (NHEJ), δεύτερο μονοπάτι είναι το alternative-NHEJ ενώ τρίτο είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR). Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις σε αριθμό αυτούσιοι ανιχνευτές των dsbreaks όπως η PARP, το σύμπλοκο MRN, τα ετεροδιμερή Ku70/Ku80 και η RPA (Ciccica & Elledge, 2010).

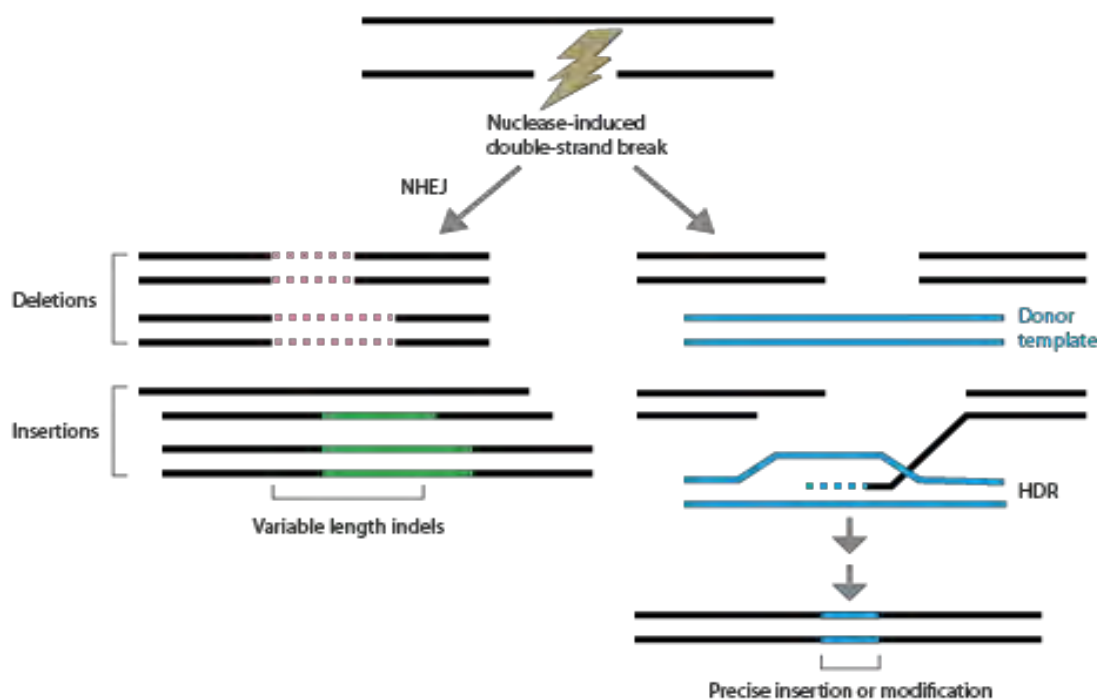
Αρχικά, ο NHEJ είναι ένας μηχανισμός ο οποίος διεξάγεται κατά την G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου όπου δεν εντοπίζονται ακόμα οι αδελφές χρωματίδες. Η ανίχνευση της βλάβης γίνεται από το σύμπλοκο DNA-PK που απαρτίζεται από τα δυο ετεροδιμερή Ku70/Ku80 και την καταλυτική υπομονάδα DNA-PKs. Ρόλος των Ku70/Ku80 είναι η ισχυρή πρόσδεση τους στα δυο σπασμένα άκρα έτσι ώστε να τα διατηρούν σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους και να μπορούν να αναγνωρίζονται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (Lieber, 2010). Αντίστοιχος είναι και ο ρόλος της καταλυτικής υπομονάδα DNA-PKs στο να προσελκύει αλλά και να φωσφορυλιώνει τις απαιτούμενες πρωτεΐνες. Σειρά έχει το σύμπλοκο MRN (MRE11, Rad50, NBS1) με ενδονουκλεολυτική ενεργότητα το οποίο συμβάλει στην επεξεργασία των άκρων και τέλος η DNA λιγάση IV/XRCC4 που συγκολλά τα άκρα (Lieber, 2010).

Σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η εφαρμογή του μονοπατιού NHEJ υπάρχει η δυνατότητα διεξαγωγής ενός εναλλακτικού μονοπατιού που ονομάζεται alternative-NHEJ (alt-NHEJ). Ακόμα και σε περιπτώσεις απουσίας των κλασσικών παραγόντων που συμμετέχουν στο NHEJ όπως ο Ku ή ο XRCC4 το συγκεκριμένο μονοπάτι καταφέρνει και λειτουργεί κανονικά. Ωστόσο, συγκριτικά με το κλασσικό μονοπάτι NHEJ θεωρείται πιο επιρρεπή σε σφάλματα δημιουργώντας μικρές προσθήκες ή και διαγραφές (B. Liu, K.H Yip, & Zhou, 2012).

Ο τρίτος σε σειρά επιδιορθωτικός μηχανισμός των dsbreaks είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) που διεξάγεται κατά την φάση S και G2 του κυτταρικού κύκλου. Βασική προϋπόθεση είναι να έχει προηγηθεί διπλασιασμός του γενετικού υλικού και κατά συνέπεια σύνθεση των αδελφών χρωματίδων που θα αποτελέσουν το καλούπι για την επιδιόρθωση της βλάβης (Giglia-Mari et al., 2011). Σε πρώτη φάση, το σύμπλοκο MRN συνδέεται στα σπασμένα άκρα και τα συγκρατεί σε κοντινή απόσταση. Στη συνέχεια, το BRCA1 επεξεργάζεται τα άκρα και η αδελφή χρωματίδη κάνει την εμφάνιση της εισβάλλοντας με το 3' άκρο της στην περιοχή ομολογίας του μορίου DNA όπου θα γίνει ο πολυμερισμός. Ως αποτέλεσμα, προκύπτουν μόρια χωρίς και με ανταλλαγή υλικού με την αδελφή χρωματίδα (Giglia-Mari et al., 2011).

Όπως στα ssbreaks έτσι και στα dsbreaks κάνουν την παρουσία τους οι πρωτεΐνες της οικογένειας PARP. Πρώτον, έχουν την ικανότητα ενεργοποίησης του

μονοπατιού alt-NHEJ το οποίο δρα σαν εναλλακτική λύση σε μη δυνατή διεξαγωγή του NHEJ. Επίσης, η PARP1 ανταγωνίζεται τον παράγοντα Ku στην πρόσδεση στα σπασμένα άκρα του DNA προκειμένου να ενεργοποιήσει το μονοπάτι HR (Ciccia & Elledge, 2010). Πέρα της πρωτεΐνης PARP, κατά την εκτομή και τη δημιουργία των διπλών θραύσεων του γενετικού υλικού στο 3' άκρο με ssbreak ενεργοποιείται το σύμπλοκο RPA (RPA1, RPA2, RPA3) το οποίο σταθεροποιεί τις περιοχές που έχουν υποστεί ssbreak κατά την διάρκεια της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης. Επιπλέον, η μορφή του ύστερα από την πρόκληση βλάβης χαρακτηρίζεται ως υπερφωσφορυλιωμένη και υπερουβικουιτινιωμένη και είναι αρκετά σημαντικό στην δραστικότητα της ATR αλλά και του μονοπατιού HR (Dubois et al., 2017).



Εικόνα 1.9: Αναπαράσταση επιδιορθωτικών μηχανισμών NHEJ και HR (Kass & Jasin, 2010).

Στις περιπτώσεις που το ευκαρυωτικό κύτταρο δεν έχει καταφέρει μέσω τον παραπάνω επιδιορθωτικών μηχανισμών να επιλύσει την βλάβη θα κάνει μια δεύτερη προσπάθεια επέμβασης δια μέσω του πολλαπλασιασμού του DNA. Τέτοιου είδους βλάβη, που να απαιτεί την ενεργοποίηση του μηχανισμού ανεκτικότητας του κυττάρου είναι η δημιουργία πιρουνιών διπλασιασμού. Οι δυο βασικοί μηχανισμοί ανεκτικότητας

του κυττάρου έναντι βλαβών είναι ο TLS (translesion synthesis) και ο DSGR (recombination-dependent daughter-strand and repair). Στην ουσία, βασική αρμοδιότητα των δυο αυτών μηχανισμών δεν είναι η απομόνωση της βλάβης αλλά η προσφορά μιας προσωρινής λύσης ώστε να ξεπεραστούν οι σταματημένες ‘μηχανές’ που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA (Giglia-Mari et al., 2011).

1.2.4.2 Κυτταρικός κύκλος και επιδιόρθωση του DNA

Προκειμένου οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου να χαρακτηρίζονται από διαδοχικότητα και ορθότητα κεντρικό ρόλο παίζουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Πρόκειται για μια ομάδα κυτταρικών μορίων που έχουν σαν στόχο τον συντονισμό αλλά και την περιοδική λειτουργία των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Αυτά συμβάλουν στην εσωτερική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στο συντονισμό λειτουργιών όπως ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού πριν το ξεκίνημα της κυτταρικής διαίρεσης, η διάρκεια της κάθε φάσης κ.α. (Branzei & Foiani, 2008). Δίχως την παρουσία τους πόσο μάλλον και τη σωστή λειτουργία τους, η ανεξέλεγκτη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου θα μπορούσε να οδηγήσει από αναστολή της λειτουργίας του έως και καρκινογένεση. Σε περίπτωση που δεν έχει προκύψει κάποιο σφάλμα και η μια φάση διαδέχεται την άλλη περνώντας από όλα τα σημεία ελέγχου τότε ο κυτταρικός κύκλος διεξάγεται υπό φυσιολογικές συνθήκες (Branzei & Foiani, 2008).

Αρχικά, το πρώτο σημείο ελέγχου το οποίο ανιχνεύεται στο τέλος της φάσης G1 ονομάζεται περιοριστικό σημείο ή σημείο εκκίνησης (START). Δεύτερο σημείο ελέγχου το οποίο απαντάται σε τρία διαφορετικά σημεία του κυτταρικού κύκλου ονομάζεται σημείο ελέγχου βλαβών του DNA. Αυτά τα τρία σημεία είναι η φάση G1, η φάση S και η φάση G2. Η βασική λειτουργία των σημείων ελέγχου των βλαβών του DNA, είναι η ανίχνευση τυχόν λαθών στη σύνθεση του DNA ή η ανίχνευση γενετικού υλικού που δεν έχει ολοκληρωθεί η αντιγραφή (Barnum & O’Connell, 2014). Σε περίπτωση που ανιχνευτεί κάτι από τα παραπάνω πραγματοποιείται επιδιόρθωση των βλαβών ή ολοκλήρωση της διαδικασίας της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Έπειτα, ένα ακόμα σημείο ελέγχου είναι η επιβεβαίωση ότι το DNA έχει όντως διπλασιαστεί στο τέλος της φάσης S και τέλος το τελικό σημείο

ελέγχου το οποίο είναι αυτό της συγκρότησης της μιτωτικής ατράκτου στο στάδιο M (Barnum & O'Connell, 2014).

Έχοντας ως βασικό κριτήριο σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου και ποια είναι η φύση της βλάβης, θα γίνει παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1/S ή στην S ή στην G2/M, επιλογή του κατάλληλου μονοπατιού επιδιόρθωσης και επαναλειτουργία του κύκλου μόλις αποκατασταθεί η βλάβη. Ειδικά, η συσσώρευση πολλών βλαβών συγχρόνως ή η αδυναμία επιδιόρθωσης μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση (Barnum & O'Connell, 2014). Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν το μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του DNA αλλά και την εξασφάλιση της περιοδικής μετάβασης από τη μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες (Cdk) (Branzei & Foiani, 2008).

Ανάλογα σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται το κύτταρο, το DNA έχει συγκεκριμένη δομή και συγκεκριμένο είδος βλάβης κι έτσι υπόκειται τη δράση συγκεκριμένης πρωτεϊνικής κινάσης. Για παράδειγμα, κατά τη φάση G1 ανιχνεύονται dsbreaks που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ATM και DNA-PK ενώ ένα άλλου είδους βλάβης που μπορεί να προέρχεται από υπερϊώδη ακτινοβολία οδηγεί στην δραστηριοποίηση της ATR. Σε περίπτωση μη επιδιόρθωσης κατά την φάση G1, δημιουργούνται κατεστραμμένα πιρούνια διπλασιασμού που απαιτούν την δράση της κινάσης ATM ενώ κατά την φάση S είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της ATR (Branzei & Foiani, 2008).

Αναλυτικότερα, στο G1/S σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, συμμετέχει είτε ο συνδυασμός των ATM/CHK2 είτε ο ATR/CHK1 με σκοπό την σταθεροποίηση του p53 και αναστολή του p21 μετά από πρόκληση ssbreak ή dsbreak. Το p21 αναστέλλει την δράση των Cdk οδηγώντας στην αποσιώπηση του συμπλόκου cyclinE/CDK2 που προωθεί την μετάβαση από την G1 στην S και επιπροσθέτως προκαλεί την παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 (Barnum & O'Connell, 2014). Ένας ακόμη μονοπάτι, ανεξάρτητο από τη δράση του p53, διεκπεραιώνεται από τις CHK1/2 όπου απευθείας επιδρούν στην CDC25A φωσφατάση μέσω της ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος οδηγώντας στην καταστολή της δράσης του συμπλόκου cyclinE/CDK2 και στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1. Σε αντίθεση με τα εξαρτημένα από το p53 μονοπάτια, το συγκεκριμένο μονοπάτι έχει παροδική δράση και διαρκεί μονάχα για λίγες ώρες (Hu & Gatti, 2011).

Στο σημείο ελέγχου S συμμετέχουν δυο βασικά μονοπάτια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Το πρώτο μονοπάτι είναι το CHK1/2-CDC25A-cyclinE/CDK2, κοινό με αυτό που διεξάγεται κατά την G, όπου μπλοκάρεται η δράση του CDC45 στην διαμόρφωση της χρωματίνης που είναι απαραίτητη για την δράση της DNA πολυμεράσης α στην σύνθεση του DNA. Στο δεύτερο μονοπάτι, συμμετέχει η ATM η οποία φωσφορυλιώνει την NBS1 και την στρατολογεί για την δημιουργία ενός συμπλέγματος, κρίσιμου για την ρύθμιση της δράσης του σημείο ελέγχου S (Hu & Gatti, 2011).

Τελευταίο το σημείο ελέγχου G2/M στο οποίο εμπλέκονται δυο ξεχωριστά μονοπάτια εξαρτώμενα και μη από το p53. Στο πρώτο μονοπάτι συμμετέχουν οι ATM/CHK2 ή οι ATR/CHK1 φωσφορυλιώνοντας το p53 το οποίο με την σειρά του επιδρά στο p21 με σκοπό την αναστολή της δράσης των cyclinB/CDK1 και παύση του κύκλου στην G2. Αντίθετα, στο μη εξαρτημένο από το p53 μονοπάτι, οι CHK1/CHK2 ελέγχουν τρία παράλληλα μονοπάτια. Πρώτον, φωσφορυλιώνουν και καταστέλλουν τη δράση των CDC25A, CDC25B και CDC25C. Δεύτερον, αναστέλλουν την δράση της κινάσης PLK1 που είναι αρμόδια για την ενεργοποίηση του CDC25C. Τρίτον, ρυθμίζουν τη δράση της κινάσης WEE1 μέσω φωσφορυλίωσης, οδηγώντας έτσι στην καταστολή την ανασταλτικής φωσφορυλίωσης της CDK1 (Hu & Gatti, 2011).

Κάθε βασικός επιδιορθωτικός μηχανισμός που στοχεύει στην καταπολέμηση μιας βλάβης μπορεί να διεξαχθεί σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι λοιπόν, σε τυχόν dsbreaks κατά την φάση G1 ενεργοποιείται ο μηχανισμός NHEJ ενώ το ίδιο είδος βλάβης στην φάση S ή G2 θα απαιτούσε την δράση του μονοπατιού HR καθώς θα είναι πια ορατές οι αδελφές χρωματίδες (Branzei & Foiani, 2008). Επίσης, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης MMR έχει την υψηλότερη σημασία για την φάση S όπου το γενετικό υλικό διπλασιάζεται από την DNA πολυμεράση και υπάρχει επικινδυνότητα δημιουργίας τυπογραφικού λάθους κατά τον πολυμερισμό. Όταν όμως στην φάση G1 κάνουν την εμφάνιση τους ογκώδης βλάβες, όπως λόγω χάρη διμερή πυριμιδινών, τότε ο μόνος επιδιορθωτικός μηχανισμός που μπορεί να ανταπεξέλθει είναι ο NER (Branzei & Foiani, 2008).

1.2.4.3 Το μονοπάτι της αυτοφαγίας

Ο μηχανισμός απόκρισης του κυττάρου σε βλάβες του γονιδιώματος εκτός των επιδιορθωτικών μηχανισμών, της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, τη νέκρωση ή απόπτωση περιλαμβάνει και τον καταβολικό μηχανισμό επιβίωσης του κυττάρου, την αυτοφαγία. Η αυτοφαγία ορίζεται ως η κυτταρική διαδικασία αυτοαποδόμησης του κυττάρου στα λυσοσώματα όπου τα κύτταρα έχουν την δυνατότητα ανακύκλωσης κατεστραμμένων οργανιδίων ή πρωτεϊνών που έχουν υποστεί κάποιου είδους βλάβη καθώς επίσης αυτοανανέωσης και διατήρησης τους λειτουργικά. Στις περιπτώσεις αναστολής της αυτοφαγίας παρατηρείται αποσταθεροποίηση των χρωμοσωμάτων όπου σε συνδυασμό με το μεταβολικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση (REFS) (Czarny, Pawlowska, Bialkowska-Warzecha, Kaarniranta, & Blasiak, 2015).

Σύμφωνα με μελέτες, ο βασικός συντελεστής για την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας κατά το DDR είναι η αναστολή της δράσης του συμπλόκου mTORC1. Ο παράγοντας αυτός είναι υπεύθυνος για την παρεμπόδιση της διεξαγωγής της αυτοφαγίας φωσφορυλιώνοντας το σύμπλοκο ULK1/2-Atg13-FIP200 και αναστέλλοντας την ζύμωση πρόδρομων δομών απαραίτητων για την αυτοφαγία. Έτσι, σε περίπτωση βλάβης του γενετικού υλικού, το mTORC1 αναγνωρίζεται από πρωτεΐνες και διάφορα σύμπλοκα, όπως για παράδειγμα η PARP1 ή το σύμπλοκο MRN, όπου ενεργοποιούν ειδικούς καταστολείς που δεσμεύουν τον mTORC1 (Czarny et al., 2015).

Αναλυτικότερα, αφού μια βλάβη θέσει σε λειτουργία την κινάση ATM, τότε αυτόματα προκαλείται καταστολή του mTORC1 και ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η μετάδοση του σήματος αυτού από την ATM στο mTORC1, γίνεται από την κινάση AMPK η οποία περιλαμβάνει το σύμπλοκο TSC1/2 αλλά και την φωσφορυλίωση του ULK1. Τέλος, ένας επιπρόσθετος παράγοντας που συμμετέχει στην αυτοφαγία είναι η πρωτεΐνη PARP-1 σχηματίζοντας αλυσίδες πολυ- (ADP-ribose) μετά από πρόκληση βλάβης. Υπάρχουν περιπτώσεις βέβαια όπου η υπερδραστηριοποίηση της έναντι βλαβών μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του παραγόμενου NAD⁺ με αποτέλεσμα τη νέκρωση του κυττάρου (Czarny et al., 2015).

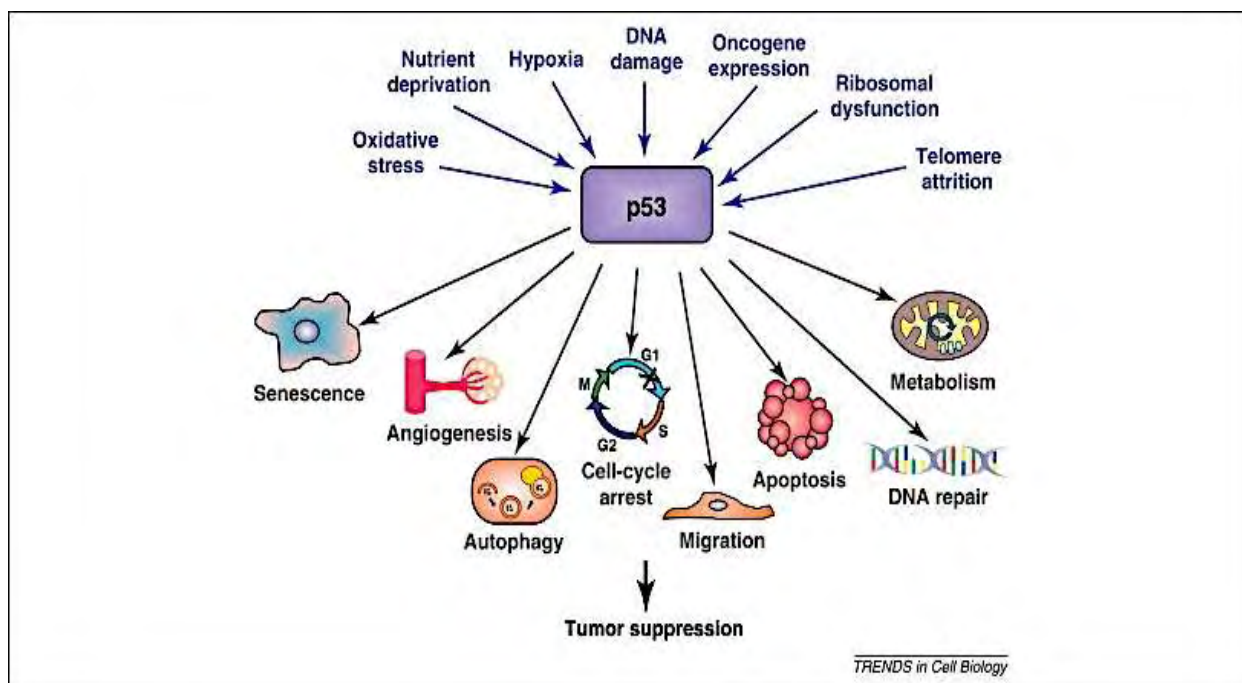
1.2.4.4 Απόπτωση του κυττάρου

Το γενετικό υλικό αποτελεί ιδανικό στόχο για γενοτοξικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, τα αντικαρκινικά φάρμακα κ.α. Σε περίπτωση μη επιδιόρθωσης, τις περισσότερες φορές αποτελεί μονόδρομη λύση το μονοπάτι της κυτταρικής απόπτωσης. Η απόπτωση ορίζεται ως η αυτοκτονία του κυττάρου λόγω εμφάνισης βλάβης και διακρίνεται από την νέκρωση του κυττάρου που οφείλεται κυρίως σε τραυματισμό (Kaina, 2003). Το κύτταρο γενικότερα έχει αναπτύξει τρεις βασικές στρατηγικές απάντησης σε βλάβες, την επιδιόρθωση, αν φυσικά είναι εφικτή, και την απόπτωση ή ακόμα νέκρωση του κυττάρου. Οι βλάβες οι οποίες προκαλούν την απόπτωση συμπεριλαμβάνουν την Ο⁶μεθυλογουανίνη-θυμίνη, τις αλκυλιώσεις στα Ν τελικά άκρα των βάσεων, την ενσωμάτωση ογκώδη χημικών μορίων στο DNA και τις θραύσεις της διπλής έλικας (Norbury & Zhivotovsky, 2004).

Πρώτη σε σειρά είναι η βλάβη η οποία προέρχεται από την απουσία του ενζύμου MGMT που εμφανίζει τάση αυτοκτονίας. Αυτό είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση προμεταλλαξιγόνων και προκαρκινικών μεθυλιώσεων όπως η βλάβη Ο⁶μεθυλογουανίνη στο DNA (Z. Li et al., 2015). Το αποτέλεσμα από την απώλεια του παραπάνω ενζύμου είναι η εκδήλωση ενός φαινοτύπου που χαρακτηρίζεται από υπερευαισθησία και μεθυλίωση με αυξημένη τάση προς απόπτωση. Επίσης, κύτταρα που δεν εκφράζουν τις πρωτεΐνες του μηχανισμού MMR όπως η MSH2 και η MSH6 εκδηλώνουν αυξημένη ανεκτικότητα σε μεθυλιώσεις. Για αυτόν ακριβώς το λόγο η συγκεκριμένη βλάβη κατέχει την μεγαλύτερη ευθύνη για τον κυτταρικό θάνατο δια μέσω της απόπτωσης (Kaina, 2003).

Δεύτερη σε σειρά αιτία βλάβης υπεύθυνη για την απόπτωση του κυττάρου είναι οι αλκυλιώσεις στα Ν τελικά άκρα των βάσεων. Ο μηχανισμός BER γενικότερα είναι αρμόδιος για την αφαίρεση των βλαβών αυτών. Όμως, κύτταρα τα οποία εμφανίζουν ανεπάρκεια ως προς την DNA πολυμεράση β είναι υπερευαίσθητα στην συγκεκριμένη βλάβη με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (Kaina, 2003). Επιπλέον, μια ακόμη αφορμή απόπτωσης του κυττάρου είναι η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Λόγω αυτής, κάνουν την εμφάνιση τους βλάβες οι οξειδωτικές αλλοιώσεις. Επειδή λοιπόν ο μηχανισμός NER αφαιρεί αυτού του είδους βλάβες, σε περιπτώσεις ανικανότητας, οι βλάβες αυτές είναι οι κύριες αιτίες απόπτωσης μετά την ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία (Roos & Kaina, 2006).

Αξιοσημείωτη είναι η εμπλοκή του p53 στο μονοπάτι της απόπτωσης. Αυτό, αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ATM και ATR μαζί με την Chk1 και Chk2 κάτω από συνθήκες διπλής θραύσης της έλικας του DNA. Με τη σειρά τους η Chk1 και η Chk2 φωσφορυλιώνουν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο στη σερίνη20 με αποτέλεσμα την αναστολή της ουβικουιτίνωσης του από την E3 λιγάση αλλά και της αποικοδόμησης του από το πρωτεόσωμα (Williams & Schumacher, 2016). Έτσι το p53 σταθεροποιείται και ρυθμίζει τόσο προαποπτωτικά γονίδια όπως το PUMA και το Fas-R όσο και αντιαποπτωτικά γονίδια όπως το MSH2 και το MGMT. Επομένως, ο ρόλος του είναι διπλός καθώς μπορεί να εξασφαλίσει την προώθηση είτε της επιδιόρθωσης είτε της απόπτωσης του κυττάρου (Roos & Kaina, 2013).



Εικόνα 1.10: Το p53 ως βασικός ρυθμιστής της μοίρας του κυττάρου (Biegging & Attardi, 2012).

1.2.4.5 Κυτταρική γήρανση

Το ευκαρυωτικό κύτταρο, εκτίθεται σε καθημερινή βάση σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση γενετικών βλαβών. Ως απάντηση, το κύτταρο ενεργοποιεί τον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβες του DNA που περιλαμβάνει μονοπάτια επιδιόρθωσης, σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση, αυτοφαγία ή και νέκρωση του κυττάρου (Hoeijmakers, 2009). Παρόλα

αυτά, μπορεί η πλειονότητα των βλαβών να αποκαθίστανται με επιτυχία, όμως υπάρχει και το ενδεχόμενο μη επιδιόρθωσης και συσσώρευσης των βλαβών στο κύτταρο. Μερικές από αυτού του είδους βλάβες μπορεί να αποτελέσουν αφορμή για την εμφάνιση γονιδιακών μεταλλάξεων ή ακόμα να προκαλέσουν παραμόρφωση του κυττάρου (Hoeijmakers, 2009).

Η κυτταρική γήρανση διακρίνεται σε δυο βασικές κατηγορίες βάση του τρόπου επαγωγής της. Αρχικά, η αναδιπλασιαστική κυτταρική γήρανση (ΑΚΓ) είναι μια φάση βιώσιμης αναστολής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Το κύτταρο εμφανίζει μορφολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές, μόνιμη απώλεια της ικανότητας διπλασιασμού του γενετικού υλικού, μείωση των τελομερικών άκρων, αυξημένη οξειδωτική και μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά. Η δεύτερη κατηγορία είναι η κυτταρική γήρανση που επάγεται από το οξειδωτικό στρες συμβάλλοντας στην αυξημένη έκφραση ογκογονιδίων αλλά και εμφάνιση των επιπτώσεων της γήρανσης στο κύτταρο (Partridge, 2014).

Ένα από τα αποτελέσματα μη αποκατεστημένων βλαβών του κυττάρου αποτελεί το γήρας. Κάποια από τα συνηθέστερα χαρακτηριστικά του γήρατος είναι η γενετική αστάθεια, οι επιγενετικές τροποποιήσεις, φθορά των τελομερικών άκρων, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αλλά και η κυτταρική γήρανση. Ωστόσο, η παρουσία των παραπάνω φαινομένων ποικίλει ως προς το βαθμό εμφάνισης αλλά και τον τόπο διεξαγωγής τους (Partridge, 2014). Βάση της θεωρίας της γήρανσης, το κύτταρο παρουσιάζει παρατεταμένη ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου σε βλάβες και επίμονη ενεργοποίηση του DDR και εκδηλώνει μια κατάσταση που ονομάζεται κυτταρική γήρανση (B.Liu et al., 2012). Στην προκειμένη περίπτωση το κύτταρο προσωρινά ξεφεύγει ή σταματά σε συγκεκριμένη κυτταρική φάση, μπλοκάρονται οι διαδικασίες της αντιγραφής και μεταγραφής του και κατ'επέκταση αναστέλλεται η ανάπτυξη κατεστραμμένων κυττάρων (Hoeijmakers, 2009).

Στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, εμπλέκεται και ο μηχανισμός DDR μέσω του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 όπου κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο και αποτελεί βασικό ρυθμιστή του συγκεκριμένου μηχανισμού. Σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες ή μη φυσιολογικής λειτουργίας των τελομερών, ενεργοποιείται ο μηχανισμός DDR μέσω της κινητοποίησης των κινασών ATM και ATR που συμβάλουν στην παύση του κυτταρικού κύκλου μέσω της σταθεροποίησης του p53. Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί τον αναστολέα των CDK, p21, όπου επάγει τόσο

την παύση του κυτταρικού κύκλου όσο και την κυτταρική γήρανση (Van Deursen, 2014).

Ακόμα, ένας άλλος εναλλακτικός τρόπος επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης είναι μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ογκογονίδιο p16INK4a που κρίνεται απαραίτητο στοιχείο για την διατήρηση της κυτταρικής γήρανσης λόγω της ιδιότητας του να ενεργοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pRB. Αυτή με τη σειρά της συμβάλει στην εγκατάσταση του παράγοντα SAHF που οδηγεί στην αποσιώπηση γονιδίων που προωθούν την ογκογένεση (Iannello & Raullet, 2014). Ακόμα, το ογκογονίδιο Ras δρα μέσω της υπερέκφρασης του Cdc6 και αναστολή του νουκλεοτιδικού μεταβολισμού. Έτσι, προκαλεί την εκδήλωση φαινομένων όπως ανώμαλη αντίγραφο του γενετικού υλικού, ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR και επαγωγή της γήρανσης (Van Deursen, 2014).

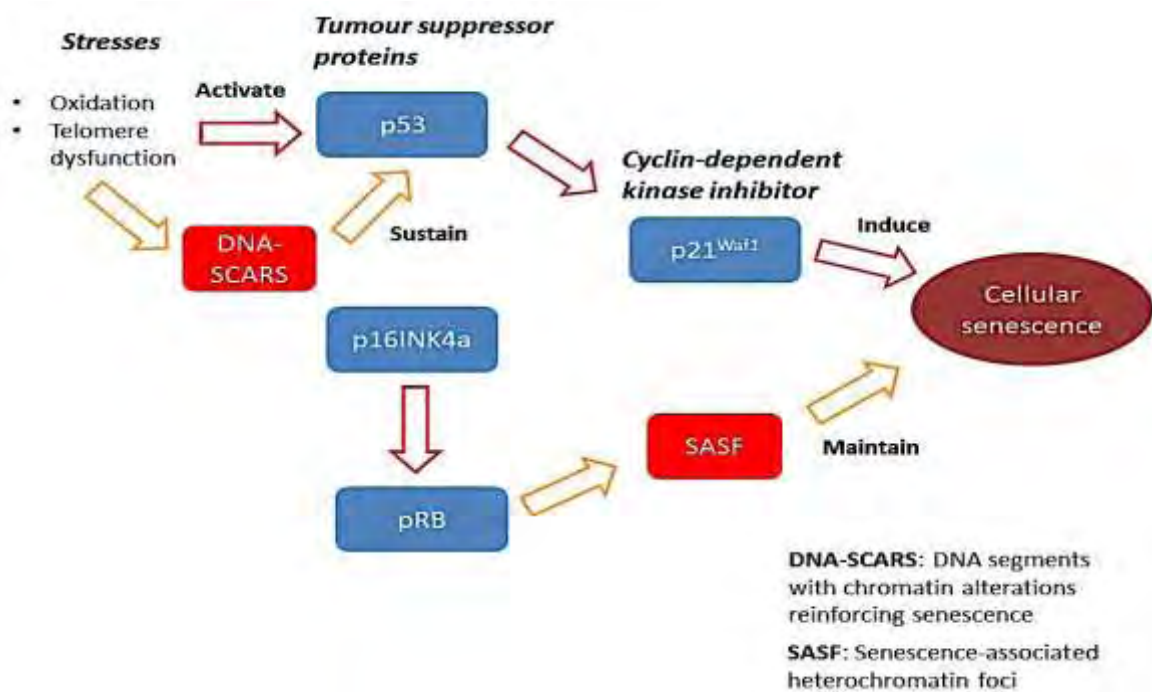
Στους επαγωγείς της κυτταρικής γήρανσης συγκαταλέγεται επίσης το στρες που είναι υπεύθυνο για τις επιγενετικές τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, αλλαγές στο επίπεδο της χρωματίνης λόγω έκθεσης σε αναστολείς της αποακετυλίωσης των ιστονών οδηγούν στην κυτταρική γήρανση μέσω του p21 (Van Deursen, 2014).

Η κυτταρική γήρανση έχει αναδειχθεί ως δυνητικά σημαντικός παράγοντας τόσο στο ανθρώπινο γήρας όσο και στις ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις. Στον οργανισμό, με την πάροδο του χρόνου, το γήρας είναι υπεύθυνο για την απώλεια της λειτουργικότητας των ιστών αλλά και των οργάνων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αναστέλλονται λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση, παράγονται μεγάλα ποσά προφλεγμονοδών μορίων και προωθείται ένας φαινότυπος που σχετίζεται με την γήρανση (SASP). Βασικά χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων του οργανισμού είναι το αυξημένο τους μέγεθος, η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα του μορίου (SA-β-GAL) αλλά και διαρκής ανάπτυξη του SASP φαινοτύπου λόγω αυξημένης έκφρασης του NF-kB (Childs, Durik, Baker, & Van Deursen, 2015).

Με βασικό κριτήριο την ανθρώπινη υγεία, τα γηρασμένα κύτταρα του οργανισμού μπορούν να κατανεμηθούν σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα κύτταρα που προέρχονται από φυσιολογικό γήρας του οργανισμού, στην δεύτερη ανήκουν αυτά που προέρχονται από ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις ενώ στην τρίτη αυτά από θεραπευτικές μεθόδους (Childs et al., 2015). Στο φυσιολογικό γήρας του οργανισμού, η δυσλειτουργία των ιστών κάνει την εμφάνιση της σε όλο τον πληθυσμό σε αντίθεση με τις ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις που εμφανίζονται σε ένα

μέρος του πληθυσμού. Επίσης, στα ηλικιοεξαρτώμενα νοσήματα η γήρανση εμφανίζεται αυστηρά σε ένα ή μερικά μόλις όργανα και ο βαθμός της συσσώρευσης των γηρασμένων κυττάρων είναι πολύ μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν της φυσιολογικής γήρανσης (Childs et al., 2015).

Οι ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις κάνουν την εμφάνιση τους σε μη λειτουργικούς ιστούς που έχουν προηγουμένως δεχτεί επιρροή από διαδικασίες που σχετίζονται με τη γήρανση, σε ιστούς που έχουν συσσωρευτεί γηρασμένα κύτταρα αλλά και σε σημεία ιστού που έχουν υποστεί τραυματισμό (Van Deursen, 2014). Λόγω γήρανσης η αντοχή των ιστών έναντι ασθενειών μειώνεται όλο και περισσότερο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της πρόκλησης στρες αλλά και της δυσλειτουργίας μεσεγχυματικών κυττάρων έπειτα από την παρέμβαση του φαινοτύπου SASP. Καθώς εξελίσσεται η νόσος ο αριθμός των γηρασμένων κυττάρων αυξάνεται ολοένα και περισσότερο στα παθολογικά σημεία (Childs et al., 2015). Τέλος, τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να εντοπισθούν σε ιστούς ασθενών με ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις όπως λόγω χάρη νόσος Alzheimer, η οστεοαρθρίτιδα κ.α. (Van Deursen, 2014).



Εικόνα 1.11: Μονοπάτι εμπλοκής του p53 στην κυτταρική γήρανση (Iannello & Raulet, 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

DDR ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

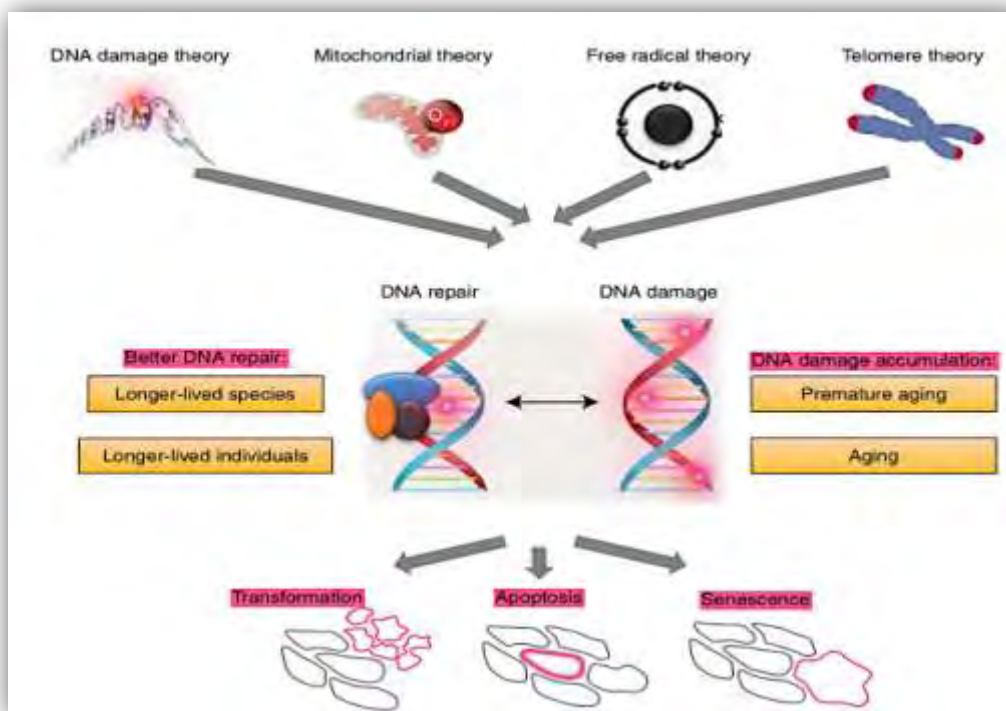
2.1 Γήρας και κεντρικό νευρικό σύστημα

Το μονοπάτι της γήρανσης ορίζεται ως μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία απαρτίζεται και διεκπεραιώνεται από ποικίλες βιολογικές διεργασίες. Στο επίπεδο των οργανισμών, η γήρανση χαρακτηρίζεται από ανικανότητα διατήρησης ενός σταθερού, υγιούς εσωτερικού περιβάλλοντος, δυσλειτουργικότητα και είναι επιρρεπής στην εκδήλωση ασθενειών. Γενικότερα, μονοπάτια κυτταρικά και μη ασκούν επιρροή στο μηχανισμό της γήρανσης. Για παράδειγμα, στο επίπεδο των ιστών, μπορεί να εμπλακούν χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις οι οποίες με τη σειρά τους θα οδηγήσουν στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών κ.α. (Lidzbarsky, Gutman, Shekhidem, Sharvit, & Atzmon, 2018).

Η γήρανση αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη νευροεκφυλισμού. Κύρια αιτία που οδηγεί στη γήρανση είναι η αστάθεια του γονιδιώματος που οφείλεται σε συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό (Niccoli & Partridge, 2012). Η επικράτεια του φαινομένου αυτού στο ΚΝΣ οδηγεί σε χαμηλή ικανότητα αποκατάστασης των βλαβών του DNA σε μετα-μεταθετικό ιστό του εγκεφάλου αλλά και στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών συνδρόμων. Γενικότερα, σε περιπτώσεις ανικανότητας επιδιόρθωσης των γενετικών βλαβών, το κύτταρο οδηγείται σε καταστάσεις όπως η γενετική αστάθεια και η επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε κυτταρική γήρανση ή κυτταρικό θάνατο, τα οποία χαρακτηρίζονται ως οι βασικοί κυτταρικοί φαινότυποι που σχετίζονται με τη γήρανση (Niccoli & Partridge, 2012).

Υστερα από αρκετές μελέτες, διατυπώθηκαν τέσσερις βασικές θεωρίες που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση. Η πρώτη σε σειρά, θεωρία βλάβης/επιδιόρθωσης του DNA, ισχυρίζεται ότι γενετικές βλάβες όπως η θραύση της διπλής έλικας και η τροποποίηση των βάσεων είναι βλάβες άμεσα σχετιζόμενες με το γήρας και την γενετική αστάθεια. Δεύτερη θεωρία είναι αυτή της γήρανσης που σχετίζεται με τα τελομερή, κατά την οποία η κυτταρική γήρανση προκαλείται από τη διάβρωση ή συντήρηση του εισαγωγέα των τελομερών και οδηγεί σε έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο μετά από έναν συγκεκριμένο αριθμό κύκλων. Οι

δυο επόμενες θεωρίες σχετίζονται με την λειτουργία των μιτοχονδρίων και τις ελεύθερες ρίζες. Αυτές αναφέρουν ότι μέσω της συσσώρευσης γενετικών βλαβών τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο μιτοχονδριακό γενετικό υλικό, το μιτοχόνδριο υπολειτουργεί και συνθέτει αυξημένες ποσότητες ROS που οδηγούν στην εμφάνιση παθολογικών φαινοτύπων (Maynard, Fang, Scheibye-Knudsen, Croteau, & Bohr, 2015).

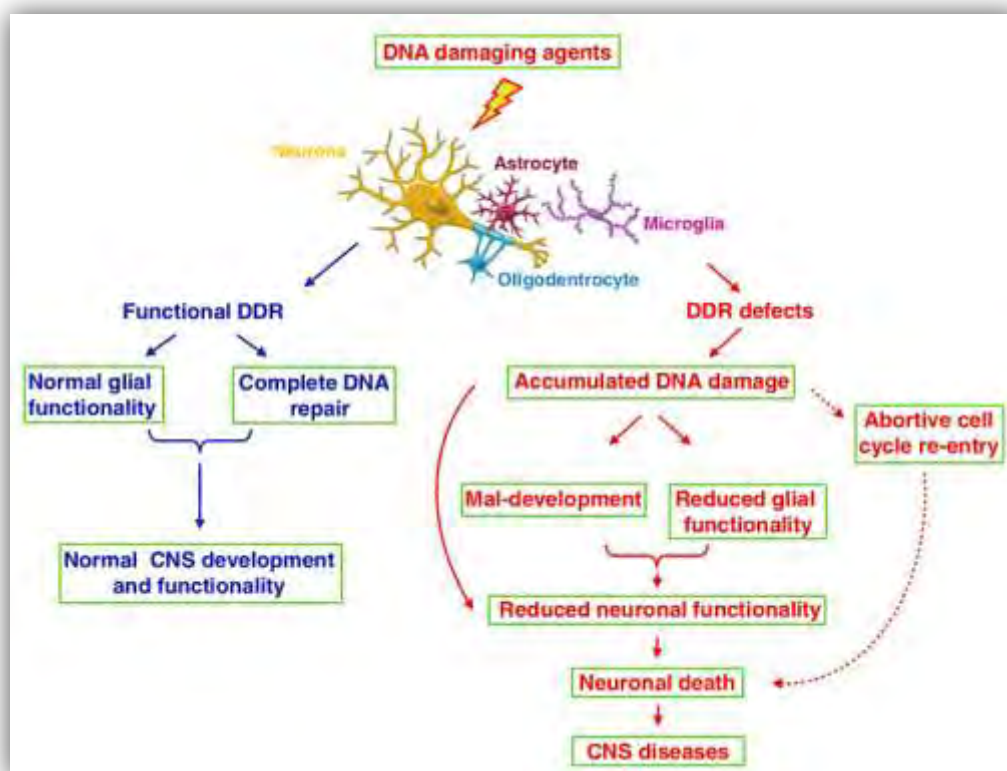


Εικόνα 2.1 : Οι τέσσερις βασικές θεωρίες της γήρανσης. Κάθε μια από αυτές έχει σαν βασικό περιεχόμενο δυο εναλλακτικές, την γενετική επιδιόρθωση ή την συσσώρευση γενετικών βλαβών (Maynard et al., 2015).

Στον ανθρώπινο οργανισμό, γεγονότα όπως η πρόωγη γήρανση αλλά και ο πρόωρος κυτταρικό θάνατος είναι δυο από τα βασικότερα στοιχεία που επεξηγούν την εμφάνιση σπανίων κληρονομικών διαταραχών που έχουν άμεση σύνδεση με την ελαττωματική γενετική επιδιόρθωση και την πρόκληση γενετικών βλαβών στο νευρικό σύστημα (Niccoli & Partridge, 2012). Γενικότερα, οι νευρώνες διαθέτουν ως βασική αναγκαιότητα την υψηλή κατανάλωση οξυγόνου όπου σχετίζεται με την ορθή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Στην κατηγορία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών παρατηρείται ολοένα και μεγαλύτερος θάνατος των νευρώνων αλλά και απώλεια δομών του εγκεφάλου. Παρόλο που ποικίλοι παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την

παθοφυσιολογία των νοσημάτων αυτών, το γήρας παραμένει ο πιο επικίνδυνος από αυτούς (Niccoli & Partridge, 2012).

Οι ώριμοι νευρώνες διαθέτουν χαρακτηριστικά όπως αυξημένους δείκτες μεταγραφής και μετάφρασης που σχετίζονται με εξίσου αυξημένους δείκτες μεταβολικής και μιτοχονδριακής δραστηριότητας. Λόγο του αρκετά μεγάλου μεγέθους του εγκεφάλου, το ποσοστό οξυγόνου που απαιτείται είναι αρκετά μεγάλο συγκριτικά με άλλα όργανα (Niccoli & Partridge, 2012). Έτσι, ο συνδυασμός της αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας με την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου οδηγεί στην διαμόρφωση ενός αρκετά πιεστικού περιβάλλοντος για τους νευρώνες και στην παραγωγή επιβλαβών παραπροϊόντων όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και οι προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες. Σαν αποτέλεσμα, τα υπέρογκα ποσά ROS που απελευθερώνονται, αναστέλλουν την ομοιόσταση της λειτουργίας των νευρώνων αλλά και των μιτοχονδρίων (Barzilai, 2010).



Εικόνα 2.2 : Επίδραση λειτουργικού και μη DDR μηχανισμού στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στην πρώτη περίπτωση, η φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και των νευρώνων συνεπάγει την λειτουργική δράση του DDR μηχανισμού σε ενδεχόμενο συσσώρευσης γενετικών βλαβών και κατ' επέκταση την εξασφάλιση φυσιολογικής ανάπτυξης και λειτουργίας. Αντίθετα, στην περίπτωση συσσώρευσης

γενετικών βλαβών σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης των νευρώνων, ο ελαττωματικός DDR μηχανισμός οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη συσσώρευση βλαβών, μη ολοκλήρωση της διαμόρφωσης και μειωμένη λειτουργικότητα των γαγγλίων αλλά και στην πρόκληση σοβαρών ασθενειών του ΚΝΣ (Barzilai, 2010).

Τυχόν ελαττώματα στο μηχανισμό (DDR) μπορεί να αποτελέσουν λόγο νευροεκφυλισμού των νευρώνων και κατ'επέκταση να υπάρξουν η αιτία για την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων. Γενικότερα, οι νευρώνες των ενήλικων ατόμων είναι πλήρως διαφοροποιημένοι και εντοπίζονται στην φάση G0 του κυτταρικού κύκλου σε κατάσταση μη πολλαπλασιασμού (Katsel, Tan, Fam, Purohit, & Haroutunian, 2013). Με την πάροδο των χρόνων όμως οι νευρώνες συγκεντρώνουν όλο και περισσότερες γενετικές βλάβες. Έτσι, σε πρώτη φάση, ενώ εκφράζονται γονίδια τα οποία είναι απαραίτητα για την λειτουργία των νευρώνων τελικά επέρχεται η επανείσοδος των νευρώνων στον κυτταρικό κύκλο. Σαν αποτέλεσμα, οι νευρώνες οδηγούνται σε καταστάσεις όπως η απόπτωση, η κυτταρική γήρανση αλλά και ο νευροεκφυλισμός (Barzilai, 2007).

Στην περίπτωση της απόπτωσης, η επανείσοδος των νευρώνων στον κυτταρικό κύκλο οδηγεί στον θάνατο τους. Όμως, λόγω επίμονης επέμβασης του μηχανισμού DDR, επέρχεται η παύση του κυτταρικού κύκλου και τελικά η επιβίωση των νευρώνων. Έτσι, οι νευρώνες αυτοί εκδηλώνουν τα χαρακτηριστικά της γήρανσης όπως μορφολογικές αλλαγές, μεταβολική και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, προφλεγμονώδες περιβάλλον κ.α. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του DDR κατά την κυτταρική γήρανση είναι η εκδήλωση του φαινοτύπου SASP. Ρόλος του είναι η συνεχής απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών οδηγώντας στη συνεχή επαγρύπνηση του DDR και διατήρηση της γήρανσης (Katsel et al., 2013).

Παραδείγματα βιοδεικτών του DDR μονοπατιού που συμμετέχουν στην επανείσοδο των νευρικών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και που κάνουν την εμφάνιση τους σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η AD είναι η Cdk5, το p53, το BRCA1 και η ATM (Katsel et al., 2013). Ακόμα, κάποια επιπλέον γεγονότα που σχετίζονται με τη κυτταρική γήρανση και εμπλέκονται στις νευροεκφυλιστικές νόσους είναι η αυτοφαγία και η σμίκρυνση των τελομερών όπου βρέθηκε ότι κατέχουν προστατευτικό ρόλο (Niccoli & Partridge, 2012).

Συνοπτικά, μέσω της συσσώρευσης και μη επιδιόρθωσης γενετικών βλαβών στους ανθρώπινους νευρώνες, κάνουν την εμφάνιση τους σοβαρά νευροεκφυλιστικά νοσήματα που σχετίζονται με τη γήρανση. Πρώτος και κυρίως λόγος για την εκδήλωση συνδρόμων του ΚΝΣ είναι το γεγονός ότι οι νευρώνες εκδηλώνουν αυξημένη οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω των μιτοχονδρίων και σαν αποτέλεσμα οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες καταστρέφουν το πυρηνικό αλλά και το μιτοχονδριακό γενετικό υλικό (Jackson & Bartek, 2010). Βασικός παράγοντας που επιτρέπει τα παραπάνω και οδηγεί σε δυσλειτουργία και εκφυλισμό των νευρώνων είναι η ελαττωματική δραστηριότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών όπως λόγου χάρη ο μηχανισμός BER. Ο δεύτερος λόγος για την δημιουργία ενός ευάλωτου νευρικού συστήματος σε τυχόν βλάβες είναι η περιορισμένη ικανότητα αντικατάστασης των νευρικών κυττάρων στην ενήλικη ζωή τους οδηγώντας έτσι στην δημιουργία κατεστραμμένων και διαφοροποιημένων νευρώνων (Jackson & Bartek, 2010).

2.2 Νευροεκφυλιστικά σύνδρομα λόγω βλαβών των επιδιορθωτικών μηχανισμών

Η ορθή λειτουργία του νευρικού συστήματος εξαρτάται σε αρκετά μεγάλο βαθμό από την άθικτη λειτουργικότητα του μηχανισμού DDR. Όμως, παράγοντες όπως το γενοτοξικό στρες, η απορρύθμιση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, η σύμπτυξη των τελομερών και η πρόκληση γενετικών βλαβών έχουν συσχετισθεί με ηλικιοεξαρτώμενες ασθένειες νευροεκφυλιστικής φύσεως. Επίσης, η ανενεργότητα βασικών κλειδιών που θεωρούνται άκρως απαραίτητα για την δράση του μηχανισμού DDR, όπως η ATM, σε περιπτώσεις γενετικής ασθένειας οδηγεί σε ανικανότητα επιδιόρθωσης λαθών αλλά και σε νευροεκφυλισμό (Maynard et al., 2015).

Ορισμένες ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των συνδρόμων που οφείλονται σε πρόωρη γήρανση αλλά και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων είναι αποτέλεσμα μη επιδιόρθωσης λαθών στο DNA. Σε αρκετές περιπτώσεις, η ανικανότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών να αποκαταστήσουν βλάβες στο γενετικό υλικό είτε λόγω απουσίας μιας απαραίτητης πρωτεΐνης είτε λόγω δυσλειτουργίας ενός συμπλόκου είναι η αφορμή για την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών, ηλικιοεξαρτώμενων συνδρόμων (Madabhushi, Pan, & Tsai, 2014).

2.2.1 Ataxia-Telangiectasia (AT)

Η πρωτεϊνική κινάση ATM παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην διαφύλαξη και σταθεροποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος καθώς συμμετέχει στον μηχανισμό απόκρισης του κυττάρου σε πιθανές βλάβες. Ανήκει στην οικογένεια των PIKKs και δρα φωσφορυλιώνοντας πρωτεΐνες-υποστρώματα μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων έπειτα από πρόκληση κάποιας γενετικής απειλής. Επίσης, κατέχει ρόλο βασικού ρυθμιστή των ελεύθερων ριζών (ROS), στην επιδιόρθωση των dsbreaks, εξασφαλίζει την μιτοχονδριακή ομοιόσταση και συμμετέχει στην ρύθμιση της αυτοφαγίας και γενικότερα της κυτταρικής επιβίωσης (Maréchal & Zou, 2013).

Ωστόσο, σε περιπτώσεις μετάλλαξης του γονιδίου της, το οποίο ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 11, προκύπτει ανάπτυξη σπανίων αυτοσωμικών, υπολειπόμενων γενετικών συνδρόμων με το πιο σοβαρό αυτό της Ataxia-Telangiectasia (AT). Η αποτυχία ενεργοποίησης της ATM έναντι dsbreaks οδηγεί τόσο σε αναστολή της επιδιόρθωσης όσο σε αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων. Σαν συνέπεια, τα κατεστραμμένα κύτταρα ξεφεύγουν της απόπτωσης και παραμένουν στον ώριμο εγκέφαλο οδηγώντας σε νευροεκφυλισμό αφού αργότερα υποκύπτουν στη βλάβη και πεθαίνουν (Jeppesen, Bohr, & Stevnsner, 2011). Τα σύνδρομα αυτά, χαρακτηρίζονται από νευροεκφυλισμό, συσσώρευση ROS και dsbreaks, πρόωρη γήρανση, προβλήματα στην άμυνα του οργανισμού και αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης λεμφώματος, λευχαιμίας, καρκίνου του μαστού αλλά και υπερευαίσθησία σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Stagni, Cirotti, & Barilà, 2018).

Η Ataxia-Telangiectasia είναι μια αρκετά σπάνια νευροεκφυλιστική νόσος με τη συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου στις ΗΠΑ να κυμαίνεται περίπου 1 στις 100.000 γεννήσεις. Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται περισσότερο για την αποσιώπηση και διαταραχή της σύνθεσης της ATM είναι μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου ενώ σε σπανιότερες περιπτώσεις ελλείματα ή προσθήκες βάσεων οι οποίες επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα της ATM. Από τη στιγμή λοιπόν που οι ασθενείς με Ataxia-Telangiectasia υστερούν σε λειτουργικότητα της ATM, είναι υπερευαίσθητοι σε παράγοντες που τείνουν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA και εμφανίζουν προδιάθεση ανάπτυξης καρκίνου εκδηλώνοντας αυξημένες τιμές AFP (Reynolds & Stewart, 2013).

Παρόλα αυτά, το βασικότερο κλινικό χαρακτηριστικό της AT είναι η πρόκληση παρεγκεφαλιδικής νευροεκφύλισης που οδηγεί σε αταξία και μειωμένο

συντονισμό της κίνησης, δυσσυνεργία. Σε κυτταρικό επίπεδο, παρατηρείται σοβαρή απώλεια των Purkinje και κοκκιωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας. Για αυτόν ακριβώς το λόγο, από τα πρώτα στάδια της ζωής τους, περίπου στην ηλικία των 6 με 18 ετών, η μετακίνηση τους βασίζεται σε αναπηρικά αμαξίδια (Marinoglou, 2012). Οι ασθενείς με AT, πέρα από προβλήματα στην παρεγκεφαλίδα, εκδηλώνουν νευροεκφυλιστικές βλάβες και σε άλλα σημεία του ΚΝΣ. Τέτοιου είδους βλάβες είναι η κακή ισορροπία και δυσκολία στην ομιλία, δυσαρθρία, οι ευρυαγγείες κ.α (Reynolds & Stewart, 2013).

Γενικότερα, η Ataxia-Telangiectasia κάνει την εμφάνιση της σε περιπτώσεις αδυναμίας επιδιόρθωσης των θραύσεων της διπλής έλικας του DNA. Ωστόσο, βρέθηκαν δυο παρόμοια νευροεκφυλιστικά σύνδρομα με χαρακτηριστικό την αταξία της παρεγκεφαλίδας σε περιπτώσεις αδυναμίας αποκατάστασης της μια μόνο θραύσης. Στο νευρικό σύστημα, τα ssbreaks διαθέτουν τριπλάσια συχνότητα εμφάνισης σε σχέση με τα dsbreaks και η μη αποκατάστασή τους μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική απόπτωση (Reynolds & Stewart, 2013).

Το ένα από αυτά, ονομάζεται Ataxia-oculomotor apraxia-1 (AOA1) και είναι ένα αυτοσωμικό νευροεκφυλιστικό σύνδρομο που εκδηλώνεται περίπου στην ηλικία των 6 ετών και σχετίζεται με αυξημένη ατροφία της παρεγκεφαλίδας, απραξία, υπερχοληστερολαιμία και υποαλβουμινεμία. Επίσης, τα κύτταρα του AOA1 είναι αρκετά ευαίσθητα σε παράγοντες που οφείλονται για την δημιουργία των ssbreaks όπως ROS και H₂O₂ (Jeppesen et al., 2011). Επιπροσθέτως, η AOA1 έχει κάποια επιπλέον, κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με την AT όπως η ηλικία, η αταξία και η μεγάλη απώλεια των Purkinje κυττάρων. Αντίθετα, φαινότυποι σχετιζόμενοι με αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο ή ραδιοευαισθησία δεν παρατηρούνται στο AOA1. Ο λόγος ύπαρξης του συνδρόμου είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης (APTX) το οποίο συμμετέχει στην επεξεργασία των άκρων του DNA ύστερα από αποτυχημένες προσπάθειες των λιγασών να επιλύσουν τυχόν ssbreaks (Madabhushi et al., 2014).

Το δεύτερο σε σειρά σύνδρομο ονομάζεται Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy (SCAN1) και είναι ένα ιδιαίτερα σπάνιο αυτοσωμικό, νευροεκφυλιστικό νόσημα το οποίο σχετίζεται με περιφερειακή νευροπάθεια και αυξημένη ατροφία της παρεγκεφαλίδας. Η ηλικία εκδήλωσης των πρώτων κλινικών χαρακτηριστικών του συνδρόμου είναι στην ηλικία των 15 χρόνων. Όπως το AOA1, έτσι κι αυτό δεν παρουσιάζει αστάθεια του γονιδιώματος αλλά ούτε προδιάθεση για ανάπτυξη

καρκίνου (Jeppesen et al., 2011). Αντίθετα όμως με τους ασθενείς με AOA1, ασθενείς με SCAN1 δεν εμφανίζουν καμία γνωστική δυσλειτουργία καμία οφθαλμοκινητική απραξία αλλά ούτε και ηπιότερη υπερχοληστερολαιμία και υποαλβουμινεμία. Η βασική αιτία πρόκλησης του συνδρόμου αυτού είναι μετάλλαξη ενός γονιδίου το οποίο έχει σαν λειτουργία την κωδικοποίηση μιας φωσφοδιεστεράσης (TDP1). Η TDP1 έχει σαν λειτουργία την υδρόλυση μιας σύνδεσης φωσφοτυρολάσης στο 3' άκρο του DNA που έχει υποστεί ssbreak ή dsbreak (Madabhushi et al., 2014).

Τέλος, εκτός από την AT που ανήκει στα σύνδρομα που οφείλονται σε dsbreak, ακόμη ανιχνεύτηκε το αρκετά σπάνιο σύνδρομο Ataxia telangiectasia-Like disorder (A-TLD) που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο σύμπλοκο MRN. Πιο συγκεκριμένα, ο ακριβής λόγος εμφάνισης του είναι μια υπομορφική μετάλλαξη του γονιδίου hMRE11. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα των ασθενών με A-TLD είναι υπερευαίσθητα στην ιονίζουσα ακτινοβολία και αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου σε συμβάν βλάβης. Όσον αφορά τα νευρολογικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, τα κυριότερα είναι η αυξημένη αταξία της παρεγκεφαλίδας, η απραξία και η δυσαρθρία με βαθμό σοβαρότητας μικρότερο από την AT (Reynolds & Stewart, 2013).

2.2.2 Xeroderma pigmentosum (XP)

Ένα ακόμη σύνδρομο που οφείλεται σε διαταραχή της λειτουργίας του επιδιορθωτικού μηχανισμού NER είναι το Xeroderma pigmentosum. Πρόκειται για ένα σπάνιο σε συχνότητα εμφάνισης, αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα που χαρακτηρίζεται από διαταραχές στην επιδιόρθωση του γενετικού υλικού. Τόσο το δέρμα όσο τα κύτταρα του αίματος εμφανίζουν υπερευαίσθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία σε ασθενείς με XP. Επειδή όμως η επιβλαβής αυτή ακτινοβολία δεν μπορεί να φτάσει έως το νευρικό σύστημα, ο λόγος θανάτου των ασθενών με XP είναι η αδυναμία επιδιόρθωσης βλαβών που έχουν προκληθεί από μεταβολίτες (Coppedè & Migliore, 2010).

Ειδικότερα, ασθενείς που εκδηλώνουν παραλλαγμένο τύπο XP εντοπίζονται με ελαττωματικό το μηχανισμό της μετάφρασης λόγω μη ενεργοποίησης του γονιδίου POLH. Ακόμα, το συγκεκριμένο σύνδρομο διακρίνεται σε 3 βασικές κατηγορίες έχοντας σαν κριτήριο διαχωρισμού το γονίδιο το οποίο μεταλλάσσεται. Οι ασθενείς

λοιπόν ταξινομούνται στις κατηγορίες XP-A, XP-G, X-PV στις οποίες το γονίδιο που μεταλλάσσεται είναι το XP που συμμετέχει στο μηχανισμό NER. Με αυτό το τρόπο, εφόσον είναι αδύνατη η επιδιόρθωση των γενετικών βλαβών και τροποποιήσεων που προκαλούνται κυρίως από ακτινοβολία UV οι επιπτώσεις είναι ιδιαίτερα σοβαρές (Santiago et al., 2015).

Λόγω υπερευαισθησίας στην υπεριώδη ακτινοβολία οι ασθενείς με XP εμφανίζουν νευρολογικές διαταραχές, παραμορφώσεις του δέρματος όπως γήρας, υποσιτισμό, φακίδες κ.α. αλλά και ανωμαλίες στους οφθαλμούς όπως ερεθισμό, καταρράκτη και ατροφία των βλεφάρων. Ακόμα, ένα επιπρόσθετο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου του δέρματος. Υπολογίζεται ότι η μέση ηλικία εμφάνισης του καρκίνου του δέρματος είναι γύρω στα 8 έτη δηλαδή 50 με 60 έτη νωρίτερα σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Πάνω από το 90% των καρκινωμάτων εντοπίζονται σε σημεία του σώματος που εκτίονται στον ήλιο με την μεγαλύτερη συχνότητα όπως πρόσωπο, λαιμός και κεφάλι (Duruoy & Sarasin, 2015).



Εικόνα 2.3 : Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ασθενών με XP σε πρόσωπο και οφθαλμούς (Santiago et al., 2015).

2.2.3 Nijmegen breakage syndrome (NBS)

Το σύνδρομο Nijmegen είναι ένα ιδιαίτερα σπάνιο νόσημα που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η βασική αιτία πρόκλησης του είναι η υπομορφική μετάλλαξη στο γονίδιο NBS1 το οποίο αποτελεί βασικό συστατικό του συμπλόκου MRN μαζί με τα γονίδια Mre11 και Rad50. Ρόλος τους είναι κυρίως η ανίχνευση και αποκατάσταση διπλών θραύσεων της διπλής έλικας καθώς επίσης η ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αν αυτό κριθεί

απαραίτητο (Barzilai, 2010). Στην περίπτωση πλήρους απώλειας του γονιδίου NBS1 οι επιπτώσεις κυμαίνονται από την μη λειτουργία των γονιδίων Mre11 και Rad50 έως την κατάληξη του εμβρύου.

Ενώ σαν νόσημα εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με σύνδρομα όπως το AT και το ATLD έχουν βρεθεί και ανομοιότητες μεταξύ τους. Μπορεί λοιπόν τα νευρολογικά συμπτώματα να είναι σχεδόν ίδια σε αυτά τα τρία σύνδρομα όμως στο σύνδρομο NBS οι ασθενείς χαρακτηρίζονται κυρίως από μικροκεφαλία (Jeppesen et al., 2011). Κατά την βρεφική ηλικία, η περιφέρεια του κεφαλιού κυμαίνεται μεταξύ των 26.5-36 cm χωρίς να σημαίνει όμως ότι όλα τα έμβρυα εμφανίζουν μικροκεφαλία. Η εκδήλωση του συμπτώματος αυτού σε συνδυασμό με το κοντό ανάστημα μπορεί να γίνει και στους μετέπειτα, αρχικούς χρόνους της ζωής τους (Group, 2000). Επίσης, κάποια επιπρόσθετα κλινικά συμπτώματα των ασθενών είναι η αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου, η πεσμένη άμυνα του οργανισμού, η αυξημένη ευαισθησία στην ιονίζουσα ακτινοβολία και οι κρίσεις επιληψίας (Reynolds & Stewart, 2013).

2.2.4 Trichothiodystrophy (TTD)

Η τριχοθειοδυστροφία, όπως τα σύνδρομα Xeroderma pigmentosum και Cockayne, είναι ένα ηλικιοεξαρτώμενο νόσημα που οφείλει την πρόκληση της σε βλάβες μερικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον επιδιορθωτικό μηχανισμό NER. Σαν αποτέλεσμα, ασθενείς με τη νόσο TTD παρουσιάζουν διαταραχές του νευρικού συστήματος, νευροεκφυλισμό καθώς επίσης πρόωρη γήρανση. Σε γενικότερα πλαίσια, η συγκεκριμένη νόσος κάνει σπάνιες εμφανίσεις και ο τρόπος κληρονομικότητας είναι αυτοσωμικός υπολειπόμενος (Coppedè & Migliore, 2010).

Ένα σύνολο από τα βασικότερα κλινικά χαρακτηριστικά είναι αρκετά εύθραυστα και ευαίσθητα μαλλιά λόγω έλλειψης θείου, νευρολογικές διαταραχές, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, κοντό ανάστημα, αυξημένη ευαισθησία σε πιθανές λοιμώξεις, επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη, μη λειτουργικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και αυξημένη φωτοευαισθησία. Το φάσμα των κλινικών χαρακτηριστικών κυμαίνεται από ήπιο φαινότυπο όπου περιλαμβάνει μόνο διαταραχές που σχετίζονται με την ευαισθησία των τριχών έως την πιο σοβαρή εκδοχή της νόσου που περιλαμβάνει αυξημένη θνησιμότητα της νόσου σε μικρή ηλικία και διαταραχές στην ανάπτυξη (Coppedè & Migliore, 2010).

Ο διαχωρισμός των ασθενών με TTD γίνεται μεταξύ δυο βασικών κατηγοριών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ασθενείς που δεν εκδηλώνουν φωτοευαισθησία και συνεπώς δεν εκδηλώνουν ούτε διαταραχές των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Αντίθετα, στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν ασθενείς που εμφανίζουν υπερευαισθησία και κατ'επέκταση δυσλειτουργία του επιδιορθωτικού μονοπατιού NER. Ακόμα, η δεύτερη κατηγορία χωρίζεται σε τρεις υποκατηγορίες όπου οι ασθενείς εμφανίζουν μετάλλαξη είτε στο γονίδιο XPD είτε στο XPB είτε στο TTD-A. Η συχνότερη μετάλλαξη είναι αυτή του γονιδίου XPD που αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα TFIIH ενώ η πιο σπάνια είναι αυτή του γονιδίου XPB (Coppedè & Migliore, 2010).

2.3 Σύνδρομο προγηρίας

2.3.1 Cockayne syndrome (CS)

Το σύνδρομο Cockayne είναι ένα σχετικά σπάνιο, ηλικιοεξαρτώμενο νόσημα με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονόμησης που ανήκει στην κατηγορία των συνδρόμων προγηρίας. Διακρίνεται σε δυο βασικές κατηγορίες βάση του εμπλεκόμενου γονιδίου που μεταλλάσσεται και τελικά οδηγεί στην εκδήλωση του συνδρόμου. Πρώτη κατηγορία είναι η A η οποία οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου ERCC8 που συμμετέχει στον επιδιορθωτικό μηχανισμό TC-NER και τελικά κωδικοποιεί την υπεύθυνη για το σύνδρομο πρωτεΐνη CSA (Pascucci et al., 2018). Αντίθετα, η δεύτερη κατηγορία, B, προκύπτει ύστερα από μετάλλαξη του γονιδίου ERCC6 που εξίσου εμφανίζεται στον μηχανισμό TC-NER και με τη σειρά του κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CSB. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η CSB διεγείρει τον μηχανισμό επιδιόρθωσης HR ενώ αντίθετα καταστέλλει τον NHEJ. Ακόμα, τα κύτταρα Cockayne εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία σε dsbreaks καθώς υπολειτουργούν σε περιπτώσεις όπου είναι αναγκαία η σηματοδότηση ή η επιδιόρθωση (Pascucci et al., 2018).

Γενικότερα, η CSA λειτουργεί ως βασική υπομονάδα της ουβικουιτίνης λιγάσης E3 ενώ η CSB λειτουργεί σαν υπόστρωμα της λιγάσης. Η ενεργοποίηση της CSB πραγματοποιείται έπειτα από πρόσδεση της RNA πολυμεράσης λόγω ύπαρξης βλάβης και αμέσως επάγει την επιστράτευση όλων των απαραίτητων παραγόντων επιδιόρθωσης συμπεριλαμβανομένη και την CSA. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία

της επιδιόρθωσης, η CSB αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα ενώ ακολουθεί με την σειρά της η άμεση ουβικουϊτινιλίωση της CSA (Coppedè & Migliore, 2010).

Εκτός από τις δυο παραπάνω κατηγορίες, το σύνδρομο Cockayne χωρίζεται σε ακόμη τρεις υποκατηγορίες βάσει της εμφάνισης και της έκτασης της νόσου. Αρχικά, στην υποκατηγορία τύπου 1 ανήκουν ασθενείς που χαρακτηρίζονται από μέτρια συμπτωματολογία, η υποκατηγορία 2 η οποία περιέχει ασθενείς με αρκετά σοβαρό κλινικό φαινότυπο και η υποκατηγορία 3 η οποία χαρακτηρίζεται από πιο ήπια συμπτώματα εμφάνισης. Γενικότερα, οι πιο σοβαρή μορφή του συνδρόμου είναι αυτή που οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου CSB, άρα υποκατηγορία 2, με ποσοστό περίπου εκδήλωσης 56%. Αντίθετα, η μετάλλαξη του γονιδίου CSA σχετίζεται με την υποκατηγορία 1 όπου η νόσος είναι πιο ήπια αλλά τα συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται σε νεαρή ηλικία (Iyama & Wilson, 2016).

Όσον αφορά τα συμπτώματα εμφάνισης του συνδρόμου Cockayne, χαρακτηρίζεται από προοδευτικό νευροεκφυλισμό με εμφάνιση κυρίως σε παιδική ηλικία. Κάποια από τα βασικότερα νευρολογικά συμπτώματα είναι η απομυελίνωση του εγκεφαλικού και παρεγκεφαλικού φλοιού, η απώλεια νευρώνων, η ασβεστοποίηση των βασικών γαγγλίων του εγκεφάλου, η μείωση της νευρικής αγωγιμότητας και μερική απώλεια ακοής και όρασης. Ακόμη, παρατηρείται απώλεια των Purkinje κυττάρων σε μεγάλο βαθμό, νανισμός, μικροκεφαλία, προβλήματα στην ανάπτυξη μετά την γέννηση και πιο σπάνια καταρράκτης και φωτοευαισθησία (Karikkineth, Scheibye-Knudsen, Fivenson, Croteau, & Bohr, 2017). Το προσδόκιμο ζωής των ασθενών φτάνει περίπου τα δωδεκάμισι έτη και ενώ τα περισσότερα χαρακτηριστικά της νόσου σχετίζονται με αυτά που θα εμφανιζόταν σε κανονική ηλικία, υποστηρίζεται ότι τα σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από πρόωρη γήρανση (Jeppesen et al., 2011).



Εικόνα 2.4 : Απεικόνιση της προοδευτικής μείωσης του υποδόριου λίπους του προσώπου σε δυο διαφορετικά παιδιά σε συνάρτηση με το χρόνο. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία <βυθισμένων> ματιών και η δημιουργία μακρόστενου προσώπου (Karikkineth et al., 2017).

Τις περισσότερες φορές, παρόλο που τα άτομα με το συγκεκριμένο σύνδρομο εμφανίζουν ολοκληρωμένη επισκευή του γονιδιώματος τους, υπάρχει μια μικρή πιθανότητα τα κύτταρα Cockayne να πεθαίνουν πρόωρα. Ο δραματικός αυτός φαινότυπος οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα ενδογενούς βλάβης που αναστέλλουν λειτουργίες όπως η μεταγραφή και η επιδιόρθωση. Έτσι, ο αποκλεισμός κυττάρων με μικρού βαθμού βλάβης μπορεί από την μια πλευρά να προστατεύει τον οργανισμό από την εμφάνιση καρκίνου αλλά από την άλλη προωθούν το πρόωρο γήρας του οργανισμού. Τα παραπάνω αποτελούν μια καλή επεξήγηση του γεγονότος ότι ποτέ δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη καρκίνου σε άτομο με σύνδρομο Cockayne και ότι το συγκεκριμένο σύνδρομο είναι ηλικιοεξαρτώμενο (Hoeijmakers, 2009).

2.3.2 Hitchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS)

Γενικότερα, κοινός παρανομαστής των συνδρόμων που χαρακτηρίζονται από πρόωρη γήρανση είναι η συσσώρευση γενετικών βλαβών λόγω δυσλειτουργίας των επιδιορθωτικών μηχανισμών αλλά και η εκδήλωση πρόωρου φαινότυπου γήρανσης. Ένα τέτοιο σύνδρομο είναι και το Hitchinson-Gilford progeria syndrome, μια από τις 11 σε σύνολο λαμινοπάθειες. Σε αντίθεση με την πλειονότητα των ηλικιοεξαρτώμενων νοσημάτων, η εμφάνιση του HGPS δεν οφείλεται ούτε σε μετάλλαξη γονιδίου που εμπλέκεται στις διεργασίες του μεταβολισμού του DNA ούτε σε μονοπάτια επιδιόρθωσης. Αντίθετα, είναι ένα νόσημα που εκδηλώνεται ύστερα από μετάλλαξη και τροποποίηση της προγερίνης όπου πρόκειται για μια πρωτεΐνη λαμίνη Α που είναι υπεύθυνη για το γήρας των HGPS κυττάρων (Musich & Zou, 2011).

Πρόκειται λοιπόν για συστατικό πρωτεΐνης ενδιάμεσου νήματος της πυρηνικής μεμβράνης που έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ιστόνη H2X. Παρόλο που η λαμίνη Α δεν συμμετέχει άμεσα στο μεταβολισμό και την επιδιόρθωση του DNA, στα κύτταρα ασθενών με HGPS ανιχνεύονται και συσσωρεύονται dsbreaks λόγω υπερευαισθησίας στην ιονίζουσα και υπεριώδη

ακτινοβολία (Musich & Zou, 2011). Επίσης, η προγερίνη οδηγεί σε αναδιοργάνωση της χρωματίνης, αστάθεια του γονιδιώματος όπου αυτό συνεπάγεται την δημιουργία διπλών θραύσεων της διπλής έλικας αλλά και την διεξαγωγή μη φυσιολογικού DDR μηχανισμού. Συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα, βρέθηκε ότι τα HGPS κύτταρα έχουν αυξημένα επίπεδα της ιστόνης γ H2AX, διαρκή φωσφορυλίωση των Chk1, Chk2 και p53, αλλά και επίμονη ενεργοποίηση των ATM και ATR που οδηγεί σε αναστολή της λειτουργίας των επιδιορθωτικών τους μηχανισμών (Musich & Zou, 2011).

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της νόσου κάνουν την εμφάνιση τους σε άτομα ηλικίας 12-16 έτη με μέση ηλικία τα 13,4 έτη στο νευρικό σύστημα, στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό σύστημα κ.α. Μια σειρά από τα συνηθέστερα είναι η αλωπεκία, προβλήματα στην ανάπτυξη, κοντό ανάστημα, σκληρό δέρμα, δυσλειτουργίες στην σωστή ανάπτυξη των οστών, αρκετά χαμηλό σωματικό λίπος, προβλήματα στην ακοή, και δυσλειτουργία του νευρικού συστήματος. Κάποια επιπρόσθετα, πρόσφατα, ευρήματα είναι ο παρατεταμένος χρόνος προθρομβίνης, αρκετά αυξημένες τιμές φωσφόρου και αιμοπεταλίων, η δυσκολία συντονισμού της κίνησης κλπ. (Merideth et al., 2008)



Εικόνα 2.5 : Κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Hitchinson-Gilford progeria (HGPS) (Merideth et al., 2008).

2.3.3 Werner syndrome (WS)

Το σύνδρομο Werner ανήκει εξίσου στα σύνδρομα προγηρίας και είναι ένα σπάνιο αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα που χαρακτηρίζεται από πρόωρο γήρας και γενετική αστάθεια. Όσον αφορά τα WS κύτταρα, ανιχνεύονται χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, σύμπτυξη των τελομερών και είναι υπερευαίσθητα σε παράγοντες που απειλούν το γενετικό υλικό. Γενικότερα, το συγκεκριμένο σύνδρομο μιμείται αρκετά χαρακτηριστικά με αυτά της φυσιολογικής γήρανσης του οργανισμού όπως ρυτίδες στο πρόσωπο, γκρίζα μαλλιά, αλωπεκία, διαβήτη, οστεοπόρωση, νευροεκφυλισμό κ.α. (Jeppesen et al., 2011). Τα συμπτώματα της νόσου δεν είναι εμφανή έως και την δεύτερη δεκαετία του οργανισμού ώπου να αναπτύξουν τελικά ενδείξεις και παθολογία που να υποδηλώνει το νόσημα. Επιπλέον, το σύνδρομο προδιαθέτει την εμφάνιση μη επιθηλιακού καρκίνου όπως σάρκωμα και τις περισσότερες φορές αιτία θανάτου αποτελεί είτε η ογκογένεση είτε η αρτηριοσκλήρυνση περίπου στα 40 έτη (Coppedè & Migliore, 2010).

Η αιτία ύπαρξης του συνδρόμου αυτού είναι μετάλλαξη στο γονίδιο WRN το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη WRN που ανήκει στην οικογένεια των RecQ DNA ελικασών. Πρόκειται για μια πυρηνική πρωτεΐνη που διαθέτει χαρακτηριστικά ΑΤΡάσης, ελικάσης και εξωνουκλεάσης και αποσκοπεί στην διατήρηση της γενετικής σταθερότητας. Ακόμα, σαν βασικός φροντιστής του γονιδιώματος εμπλέκεται επίσης σε μεταβολικά μονοπάτια, στη διατήρηση των τελομερών, στην επιδιόρθωση, απόπτωση του γενετικού υλικού κλπ. Σχετικά με την συμμετοχή της στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, έχει ανιχνευτεί στο BER όπου αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες όπως η PARP, στο μηχανισμό NHEJ όπου έρχεται σε επαφή με τα ετεροδιμερή Ku70 και Ku80 αλλά και την καταλυτική υπομονάδα DNA-PKcs, στο HR όπου αλληλεπιδρά με το BRC1 κ.α. (Jeppesen et al., 2011).

2.4 Νευροεκφυλιστικά σύνδρομα και DDR

Τα τέσσερα κυριότερα νοσήματα του νευρικού συστήματος που σχετίζονται με το μη λειτουργικό μηχανισμό DDR, σε συνδυασμό φυσικά με άλλους παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες και η γήρανση, είναι η νόσος Alzheimer (AD), η νόσος Parkinson (PD), η νόσος Huntington (HD) και η νόσος Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Η σωστή λειτουργία του DDR κρίνεται απαραίτητη όχι μόνο για την

φυσιολογική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αλλά και την εξασφάλιση της γενετικής σταθερότητας που είναι εξίσου σημαντική για τη φυσιολογική γήρανση του οργανισμού (Barzilai, 2007). Με βασικότερο κριτήριο την κλινική διάγνωση της άνοιας στον ενήλικο πληθυσμό, η πιο συχνά εμφανιζόμενη νόσος είναι η Alzheimer (AD). Στην κύρια συμπτωματολογία της νόσου περιέχονται η προοδευτική απώλεια μνήμης καθώς επίσης σοβαρή απώλεια των γνωστικών ικανοτήτων που επηρεάζει με πολύ αρνητικό τρόπο την καθημερινότητα των ατόμων αυτών (Coppedè & Migliore, 2010).

Η αιτία εμφάνισης της νόσου είναι η αυξημένη εξωκυτταρική συσσώρευση του Αβ αμυλοειδούς που οδηγεί στον σχηματισμό των γεροντικών πλακών και η ενδοκυτταρική συσσώρευση νευροϊνιδιακών πλεγμάτων ύστερα από υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Το Αβ πεπτίδιο συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και αναστέλλει τη λειτουργία ενζύμων που έχουν σαν ιδιότητα τη μεταφορά ηλεκτρονίων, προκαλεί υπερασβεστοποίηση και αυξάνει το H₂O₂ στον εγκέφαλο προκαλώντας την παραγωγή οξειδωτικού στρες (Jeppesen et al., 2011). Ακόμα, η σταδιακή αύξηση του Αβ πεπτιδίου μπορεί να έχει σαν συνέπεια την πρόκληση νευροτοξικότητας αλλά και απόπτωση των νευρικών κυττάρων (Kwiatkowski et al., 2016).

Ωστόσο, η συγκεκριμένη νόσος μπορεί να χαρακτηριστεί και ως πολυπαραγοντική καθώς στην πρόκληση της εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία, το περιβάλλον, επιγενετικοί παράγοντες, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων κ.α. (Simpson et al., 2015). Τις περισσότερες φορές, η νόσος είναι σποραδική (90-95%), όμως υπάρχει και ένα μικρότερο ποσοστό (5-10%) όπου η νόσος έχει οικογενής προέλευση ως συνέπεια μεταλλάξεων στα γονίδια APP, PSEN1, PSEN2 που συνεπάγον την αυξημένη εναπόθεση του Αβ αμυλοειδούς (Coppedè & Migliore, 2010).

Επίσης, η γενετική επιδιόρθωση της νόσου Alzheimer διαθέτει μια αρκετά πολύπλοκη αλληλεπίδραση με τις βλάβες που οφείλονται στην παρουσία του οξειδωτικού στρες που με την σειρά του παράγει ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες. Πρόκειται για ένα χαρακτηριστικό εγκεφαλικής γήρανσης που έχει σαν αποτέλεσμα την οξειδωτική τροποποίηση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Σε γενικά πλαίσια, οι οξειδωτικές βλάβες στο γενετικό υλικό αποτελούν ένα από τα νωρίτερα συμβάντα που οδηγούν στην παθογένεση της νόσου. Εκτός από την συσσώρευση του

Αβ πεπτιδίου, οι ασθένειες με Alzheimer εμφανίζουν έλλειψη μυελίνης που σχετίζεται με υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες (Jeppesen et al., 2011).

Η ορθή λειτουργία του μηχανισμού DDR είναι άκρως απαραίτητη όχι μόνο για την σωστή λειτουργία κάθε κυττάρου στον οργανισμό αλλά και για την ορθή λειτουργία των νευρώνων που χαρακτηρίζονται από μακροζωία αλλά και αυξημένη μεταμιτωτική ενεργότητα. Η συμμετοχή του παραπάνω μηχανισμού είναι παρούσα σε όλα τα στάδια των νευρικών κυττάρων, καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους, συντονίζοντας πολλές κυτταρικές διεργασίες (Barzilai, 2007). Ωστόσο, μεταλλάξεις στα γονίδια του DDR σχετίζονται με σύνδρομα προγηρίας που παρουσιάζουν σοβαρά συμπτώματα σχετιζόμενα με το γήρας συμπεριλαμβανομένων αυτών που χαρακτηρίζονται από νευροεκφυλιστικούς φαινοτύπους (Shackelford, 2006).

Στα πρώιμα στάδια της νόσου Alzheimer, στην φάση της ήπιας γνωστικής εξασθένησης, είναι εμφανής τόσο ο ατελής μηχανισμός DDR όσο και η δυσλειτουργικότητα των βασικών περιεχομένων του. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι κάνουν την εμφάνιση τους θραύσεις στο γενετικό υλικό που απειλούν την επιβίωση των κυττάρων. Έτσι, βρέθηκε ότι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο MRN (Rad50, Mre11, Nbs1) που είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και επιδιόρθωση βλαβών υπολειτουργεί στους νευρώνες λόγω μειωμένης έκφρασης των πρωτεϊνών που το αποτελούν. Ως αποτέλεσμα, οι βλάβες δεν αποκαθίστανται και προκαλείται παθογένεση της νόσου Alzheimer (Barzilai, 2007). Επίσης, βρέθηκε ότι οι Cdks, που ενεργοποιούνται από την φωσφατάση Cdc25, απουσιάζουν από τους διαφοροποιημένους νευρώνες κι έτσι χάνεται η σωστή ροή του κυτταρικού κύκλου. Ακόμα, ένας από τους κυριότερους ρυθμιστές του DDR, το p53, ανιχνεύτηκε σε αρκετά υψηλά επίπεδα στο νευρικό ιστό ατόμων με Alzheimer επιφέροντας την καταστροφή των νευρώνων (Barzilai, 2007).

Ένας ακόμη παράγοντας που είναι υπεύθυνος για το αυξημένο ποσοστό βλαβών στον οργανισμό ασθενών με Alzheimer είναι η ανεπαρκής δράση του επιδιορθωτικού μηχανισμού BER. Γενικότερα, ο μηχανισμός BER είναι από τα πιο σημαντικά επιδιορθωτικά μονοπάτια καθώς σαν βασική δράση έχει την απομάκρυνση βλαβών που έχουν προκληθεί από οξειδωτικό στρες (Kwiatkowski et al., 2016). Έτσι λοιπόν, βρέθηκε ότι λόγω της ύπαρξης πολυμορφισμών σε πρωτεΐνες που κωδικοποιούν το μονοπάτι BER προκαλείται αύξηση του αριθμού των γενετικών βλαβών και επιπροσθέτως η συσσώρευση των βλαβών αυτών μπορεί να αποτελέσει την αιτιοπαθολογία της νόσου Alzheimer. Κάποια παραδείγματα γονιδίων που

υπόκεινται στην επιρροή των πολυμορφισμών είναι τα OGG1, APEX1, PARP1, LIG1, XRCC1 κ.α. Σύμφωνα λοιπόν με πρόσφατες έρευνες βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη επιρροή ασκείται στα γονίδια OGG1 και XRCC1 (Kwiatkowski et al., 2016).

Εκτός από τον μηχανισμό BER, ένας ακόμη επιδιορθωτικός μηχανισμός που ανιχνεύτηκε ότι παίζει ρόλο στην εκδήλωση της νόσου Alzheimer είναι ο NHEJ. Ευρύτερα, οι νευρώνες που απαρτίζουν το νευρικό σύστημα χρησιμοποιούν τον παραπάνω μηχανισμό προκειμένου να αποκαταστήσουν θραύσεις της διπλής έλικας. Βασικά συστατικά του μηχανισμού αυτού είναι η πρωτεΐνη κινάση DNA-PK καθώς επίσης το ετεροδιμερές Ku70 ή Ku80 (Shackelford, 2006). Έπειτα από αρκετές μελέτες, βρέθηκε ότι σε ασθενείς με Alzheimer ο παραπάνω μηχανισμός αλλά και τα απαραίτητα συστατικά για την ομαλή λειτουργία του εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα. Παρόλα αυτά όμως, ακόμη και σε εγκεφάλους με φυσιολογική γήρανση τα παραπάνω εμφανίζουν εξίσου μειωμένη δράση θέτοντας ερωτηματικά για την αλληλεπίδραση Alzheimer και NHEJ (Kanungo, 2017).

Επιπλέον, στη νόσο Alzheimer παρατηρήθηκε ότι διαφοροποιημένοι νευρώνες, λόγω συσσώρευσης γενετικών βλαβών, προσπαθούν να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο παρόλο που αυτό είναι εντελώς αδύνατο. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με μελέτες σε νευρώνες ασθενών με Alzheimer και άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους βρέθηκε έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο όπως κινάσες, φωσφατάσες κ.α. υποδηλώνοντας έτσι την επανείσοδο των νευρώνων στον κυτταρικό κύκλο (Shackelford, 2006). Ένα ακόμα εύρημα που επιβεβαιώνει τα παραπάνω είναι η αυξημένη έκφραση της κινάσης ATM αλλά και των υποστρωμάτων της αλλά και η έκφραση της πρωτεΐνης MCM2 που υποδηλώνει την ενεργή αντιγραφή κατά την εξέλιξη της νόσου Alzheimer (Katsel et al., 2013).

Όσον αφορά το πως επιδρούν οι επιγενετικές τροποποιήσεις στην νόσο του Alzheimer, αποδείχθηκε ότι αρκετά σημαντικό ρόλο παίζει η μεθυλίωση των CpG νησίδων στους εκκινητές συγκεκριμένων γονιδίων. Κατά την εγκεφαλική λοιπόν ανάπτυξη, η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες έχει σαν αποτέλεσμα την μεθυλίωση των εκκινητών σε γονίδια που σχετίζονται με το Alzheimer όπως λόγου χάρη το γονίδιο APP. Λόγο αυτού, στην μετέπειτα διάρκεια της ζωής τους τα άτομα αυτά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα APP και Αβ πεπτιδίου. Έτσι λοιπόν, ενώ τα αυξημένα επίπεδα Αβ οδηγούν σε αυξημένο οξειδωτικό στρες, τα σχετιζόμενα με τη

νόσο γονίδια είτε θα υπερεκφράζονται είτε θα υποεκφράζονται καθορίζοντας αντίστοιχα την υπερμεθυλίωση ή υπομεθυλίωση τους (Corpedè & Migliore, 2010).

Πέρα από τη νόσο Alzheimer, η δεύτερη σε σοβαρότητα νευροεκφυλιστική νόσος όπου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ο μηχανισμός DDR είναι η νόσος Parkinson (PD). Συχνότερα, προσβάλλει άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών και εκδηλώνεται με συμπτώματα όπως τρεμούλιασμα, αστάθεια, βραδυκινησία, ακαμψία των μυών και παρατηρείται αυξημένη απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (Corpedè & Migliore, 2010). Κάποια από τα αίτια απώλειας των νευρώνων είναι τα αυξημένα επίπεδα ROS αλλά και η δημιουργία των σωματίων Lewy τα οποία προκύπτουν από μεγάλα συσσωματώματα α-συνουκλεάσης. Όπως στη νόσο Alzheimer έτσι και στη νόσο Parkinson παρεμβάλλεται το οξειδωτικό στρες το οποίο είναι υπεύθυνο για ελλείμματα στο μόριο του DNA αλλά και στο μιτοχονδριακό DNA σε συγκεκριμένα εγκεφαλικά τμήματα (Jeppesen et al., 2011).

Πιθανές βλάβες στο γενετικό υλικό μπορούν να επιφέρουν ανωμαλίες στους νευρώνες σε περιπτώσεις αδυναμίας επιδιόρθωσης και κατ'επέκταση να οδηγήσουν σε κυτταρική γήρανση. Η φωσφορυλίωση της α-συνουκλεάσης συσχετίζεται με την μειωμένη ικανότητα γενετικής επιδιόρθωσης αλλά και την βασική παθογένεια του PD. Αυτό που παρέμενε αναπάντητο ήταν αν το στρες που προέρχεται από την α-συνουκλεάση ενεργοποιεί ή όχι το μηχανισμό DDR σε περιπτώσεις βλάβης (Milanese et al., 2018). Για την επίλυση του ερωτήματος αυτού, χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα συνουκλεϊνοπάθειας όπου στους ντοπαμινεργικούς τους νευρώνες βρέθηκε αυξημένη έκφραση των τριών βασικών δεικτών ενεργοποίησης του DDR- γH2AX, 53BP1, ATM. Βέβαια, η επιρροή της α-συνουκλεάσης στους βασικούς δείκτες εξαρτάται από την παραγωγή ROS αλλά και από την λειτουργία των μιτοχονδρίων. Έτσι, παρατηρήθηκε μια σχέση σύνδεσης μεταξύ της α-συνουκλεάσης, του μηχανισμού DDR, της μιτοχονδριακής λειτουργίας αλλά και της παραγωγής ROS (Milanese et al., 2018).

Άλλοι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για το ρίσκο εμφάνισης της νόσου είναι ο ατελής μηχανισμός DDR σε συνδυασμό με το γήρας. Βρέθηκε λοιπόν ότι στα περιφερικά κύτταρα ασθενών με PD ο επιδιορθωτικός μηχανισμός NER υπολειτουργεί λόγω αυξημένης ευαισθησίας των κυττάρων σε ακτινοβολία χ αλλά και οξειδωτικό στρες. Προηγουμένως, μέσω της χρήσης μοντέλων ζώων που εμφάνιζαν αποσιώπηση στο γονίδιο *Erc1* αλλά και ελαττωματικό μηχανισμό NER επιβεβαιώθηκε ο τυπικός φαινότυπος PD. Ακόμα, σύμφωνα με πιο πρόσφατες

μελέτες βρέθηκε ότι εκτός από το μηχανισμό NER, ο μηχανισμός BER δυσλειτουργεί εξίσου στη συγκεκριμένη νόσο (Sepe et al., 2016). Έτσι, απεδείχθη ότι η γενετική αστάθεια αλλά και η ανεπαρκής γενετική επιδιόρθωση που σχετίζεται με τη γήρανση μπορεί να αποτελέσει γενετικό τροποποιητή που προδιαθέτει την νόσο PD (Sepe et al., 2016).

Στις γενετικές μορφές του PD έχουν συνδεθεί επίσης μεταλλάξεις που λαμβάνουν μέρος στην κινάση PINK1 και παρεμποδίζουν την δράση της. Πρόκειται για ένα μόριο που προέρχεται από την ουβικουιτινλίωση της φωσφατάσης PTEN που με τη σειρά της συμμετέχει στην εξασφάλιση της επιβίωσης των κυττάρων μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η κινάση PINK1 έχει σαν ρόλο την διατήρηση της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων, την αναστολή της παραγωγής οξειδωτικού στρες από τα μιτοχόνδρια κ.α. ενώ η αναστολή της δράσης της οδηγεί σε απόπτωση των νευρώνων (Ogino et al., 2016). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το PTEN παίζει διακριτικό ρόλο στο DDR και μπορεί να αλληλεπιδράσει με το μονοπάτι των Chk. Συγκεκριμένα, συμμετέχει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης ATM. Όμως, αποσιώπηση αυτού από τυχόν μεταλλάξεις οδηγεί στον ανταγωνισμό του με την ATM κινάση και μείωση της φωσφορυλίωσης των βασικών υποστρωμάτων της ATM-H2AX, p53 και Chk συμβάλλοντας έτσι στην παθοφυσιολογία της νόσου PD (Ogino et al., 2016).

Κάποια άλλα πιθανά εμπλεκόμενα γονίδια είναι η α-συνουκλεάση, το parkin, το DJ-1, το PINK1 κ.α. Μεταξύ αυτών, το γονίδιο με την πιο μεγάλη συχνότητα κληρονόμησης είναι το parkin. Πρόκειται για μια E3 ουβικουιτίνη λιγάση όπου επιδρά πάνω σε ποικίλα υποστρώματα συμμετέχοντας έτσι στις βιολογικές διεργασίες της ουβικουιτινλίωσης και της αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα. Για να προκληθεί λοιπόν η νόσος βασική προϋπόθεση είναι η παρκίνη να υποστεί μετάλλαξη. Έτσι, η παρκίνη χάνει την ικανότητα επιδιόρθωσης σε βλάβες στο γενετικό υλικό και εμφανίζεται η νόσος (Coppedè & Migliore, 2010). Συμπερασματικά, η παρκίνη είναι ένα γονίδιο άκρως απαραίτητο για την επαγωγή της επιδιόρθωσης τυχόν γενετικών βλαβών και δρα προστατεύοντας από γενοτοξικούς παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες και η βλαβερή ακτινοβολία.

Ένα ακόμα σύνδρομο του νευρικού συστήματος με νευροεκφυλιστικό χαρακτήρα είναι η νόσος Huntington (HD). Ο τύπος κληρονόμησης είναι αυτοσωμικός επικρατής και προέρχεται ύστερα από διαδοχικές τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις της τριπλέτας CAG στο εξόνιο 1 του γονιδίου που κωδικοποιεί την

χαντικτίνη και εδράζεται στο χρωμόσωμα 4 (Coppedè & Migliore, 2010). Ευθύνη για τις τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις φέρει το οξειδωτικό στρες όπου το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται έπειτα από απομάκρυνση οξειδωμένων αλλοιώσεων βάσεων και βασίζεται στον επιδιορθωτικό μηχανισμό BER. Μερικά από τα κλινικά συμπτώματα είναι ψυχιατρικά προβλήματα και διαταραχές στην συμπεριφορά, γνωστικές δυσλειτουργίες ακόμα και θάνατος με την πάροδο 15-20 χρόνων από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου (Coppedè & Migliore, 2010).

Ο ρόλος της χαντικτίνης είναι εξαιρετικά σημαντικός καθώς σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ανιχνεύεται και αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που απαρτίζουν τον μηχανισμό DDR. Συγκεκριμένα, η χαντικτίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στην γενετική επιδιόρθωση και μεταβάλλει την δραστηριότητα της ανάλογα με τα κυτταρικά επίπεδα ROS (Coppedè & Migliore, 2010). Επίσης βρέθηκε ότι η κινάση ATM είναι πλούσια σε χαντικτίνη, η οποία εξαρτάται από την δραστηριότητα της κινάσης και σηματοδοτεί την κινητοποίηση των πρωτεϊνών του DDR για την αποκατάσταση θραύσεων της διπλής έλικας του DNA. Τυχόν απορρύθμιση των λειτουργιών της ATM αλλά και της χαντικτίνης στον πυρήνα των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε ατελής επιδιορθωτικούς μηχανισμούς στους ασθενείς με τη νόσο Huntington (Maiuri et al., 2016).

Ακόμα, η χαντικτίνη συμμετέχει στην διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης, στην μεταφορά των πρωτεϊνών, στην μετασυναπτική σηματοδότηση, στη ρύθμιση της μεταγραφής κ.α. Οποιαδήποτε λοιπόν πιθανή μετάλλαξη που μπορεί να οδηγήσει στην απουσία της λειτουργικότητας της και στην μετατροπή της απόδοση της σε τοξική συνεπάγει την διαταραχή της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης και σηματοδότησης και τελικά επέρχεται ο νευροεκφυλισμός (Coppedè & Migliore, 2010). Ακόμη, ο αριθμός των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων είναι αυτός που θα καθορίσει τη σοβαρότητα και την ηλικία εμφάνισης της νόσου, δηλαδή όσο πιο αυξημένος ο αριθμός των επαναλήψεων τόσο πιο επικίνδυνη η παθοφυσιολογία της νόσου και τόσο πιο μικρή η ηλικία εμφάνισης της νόσου (Coppedè & Migliore, 2010).

Εξίσου σημαντικοί δείκτες για την ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR στην νόσο Huntington είναι το επίπεδο φωσφορυλίωσης του BRCA1 και της ιστόνης γ-H2AX. Βρέθηκε λοιπόν ότι λόγω επίδρασης βλαβών στο DNA, διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των επιπέδων μη φωσφορυλίωσης και φωσφορυλίωσης του BRCA1 και συνεπάγεται η απορρύθμιση της χωροδυναμικής ιδιότητας της γ-H2AX.

Αυτό οδηγεί στην αποτυχία της ενεργοποίησης του μηχανισμού DDR στην συγκεκριμένη νόσο καθώς το βασικότερο μοριακό συστατικό του μηχανισμού απορρυθμίζεται αδυνατώντας να κινητοποιήσει τους απαραίτητους επιδιορθωτικούς παράγοντες (Jeon et al., 2012).

Τέλος, η νόσος Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) είναι η πιο συνήθης στην ενήλικη ζωή και εκτιμάται ως και η επικινδυνότερη για το νευρικό σύστημα. Ένα από τα πιο κοινά συμπτώματα της νόσου είναι η νέκρωση και ο εκφυλισμός των νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Ο διαχωρισμός της με βάση τον τρόπο κληρονόμησης διακρίνεται σε οικογενής και σποραδική ενώ το υπεύθυνο γονίδιο που προσβάλλεται σε αυτή την περίπτωση είναι το ALS2. Ιδιότητα του γενικότερα είναι η εξασφάλιση για τους νευρώνες ενός υγιούς περιβάλλοντος απαλλαγμένου από οξειδωτικό στρες. Οι ασθενείς με σποραδική μορφή της νόσου εμφανίζουν δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA (Jeppesen et al., 2011).

Ωστόσο, βασική αιτία για την εμφάνιση της νόσου ALS αποτελεί η συνεχής επανάληψη της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας (GGGGCC) στην μη κωδική περιοχή C9orf72. Εξαιτίας αυτού, εμφανίζονται βλάβες στο γενετικό υλικό επηρεάζοντας αρνητικά την γενετική σταθερότητα. Σαν απάντηση, τα κύτταρα ενεργοποιούν το μηχανισμό DDR για να αποκαταστήσει τη βλάβη χωρίς αυτό όμως να είναι πάντοτε εφικτό. Σε μελέτη που διεξήχθη σε νευρώνες ασθενών με ALS που έφεραν την περιοχή C9orf72 ανιχνεύτηκε αυξημένη έκφραση των βασικών δεικτών του μηχανισμού DDR σε περιπτώσεις βλάβης; γ-H2AX, ATM, PARP-1 και 53BP1 οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η μετάλλαξη C9orf72 επάγει το μηχανισμό DDR (Farg, Konopka, Soo, Ito, & Atkin, 2017).

Επίσης, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι στους ασθενείς με ALS που έφεραν τη μετάλλαξη C9orf72 υπήρχε αυξημένη αλληλεπίδραση μεταξύ του συμπλόκου APE1 και NPM1. Η NPM1, γνωστή και ως B23, είναι μια ιστόνη που ενεργοποιείται κατά το μηχανισμό DDR και είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διατήρηση της γενετικής σταθερότητας (Farg et al., 2017). Σε περιπτώσεις θραύσης της διπλής έλικας του DNA, κυρίως λόγω οξειδωτικού στρες, η NPM1 μεταφέρεται στο σημείο βλάβης και επάγει την συσσώρευση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μηχανισμό BER. Ένα παράδειγμα πρωτεΐνης που εμπλέκεται στον επιδιορθωτικό μηχανισμό BER και αλληλεπιδρά η NPM1 είναι η ενδονουκλεάση APE1. Η σπουδαιότητα του συμπλόκου αυτού είναι ότι συμμετέχει σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες όπως η

γενετική επιδιόρθωση, η σταθερότητα του γονιδιώματος κ.α. Επομένως, βάση των παραπάνω, επιβεβαιώνεται για ακόμη μια φορά ότι σε ασθενείς με τη νόσο ALS πραγματοποιείται ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR (Farg et al., 2017).

Τέλος, μια ακόμα πρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό DDR και εντοπίζεται στη νόσο ALS είναι η FUS. Η δράση της στον μηχανισμό DDR επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της με την ιστόνη HDAC1. Ρόλος του συμπλόκου αυτού είναι η κινητοποίηση του DDR μέσω της ανίχνευσης θραύσεων της διπλής έλικας και η επιδιόρθωση τους (W.-Y. Wang et al., 2013). Σε ασθενείς με τη νόσο ALS, ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη FUS οδηγώντας στην ελαττωματική δράση του μηχανισμού DDR και της γενετικής επιδιόρθωσης και στη μειωμένη αλληλεπίδραση αυτής με την HDAC1. Ακόμη, βρέθηκε ότι τυχόν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη FUS είναι υπεύθυνες για την αύξηση των βλαβών στο γενετικό υλικό σε ασθενείς με ALS. Συμπερασματικά, η παθογένεση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η ALS, συνδέεται με την ελαττωματική λειτουργία του μηχανισμού DDR και της γενετικής επιδιόρθωσης που οφείλονται σε μεταλλάξεις πρωτεϊνών όπως η FUS (W.-Y. Wang et al., 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

DDR ΚΑΙ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

3.1 Γήρας και μυοσκελετικό σύστημα

Στον όρο ανθρώπινο γήρας αποδίδεται συνήθως ο χαρακτηρισμός “πολυδιάστατο” καθώς περιλαμβάνει ψυχολογικές, φυσικές αλλά και κοινωνικές τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να αφορούν γενετικές βλάβες ή και αλλαγές σε βιολογικό επίπεδο. Αυτού του είδους αλλαγές μπορεί να αποτελέσουν καθοριστικό ρόλο για ποικίλες λειτουργίες όπως η ευαισθησία του οργανισμού έναντι ασθενειών, η ανθρώπινη ανάπτυξη έως και η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής θεραπειών έναντι σοβαρών παθήσεων (Boots et al., 2013). Ωστόσο, απ’όλα αυτά τα βιολογικά φαινόμενα, το κυριότερο φαινόμενο που αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης της γήρανσης είναι η συσσώρευση βλαβών στο DNA. Έτσι, επηρεάζονται με αρνητικό τρόπο διαδικασίες όπως η δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, η γονιδιακή σταθερότητα αλλά και η διατήρηση των τελομερικών άκρων (Boots et al., 2013).

Επίσης, το γήρας αποτελεί τον βασικό οδηγό θνησιμότητας και νοσηρότητας όπου αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης τόσο νευροεκφυλιστικών ασθενειών όσο και μυοσκελετικών. Μέσω της συσσώρευσης γενετικών βλαβών και διαταραχών στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς προωθείται τόσο η γήρανση του κυττάρου όσο και η κυτταρική απόπτωση. Επιπλέον, αναστέλλεται η σημαντική συνεισφορά του DDR στον οργανισμό που σαν βασικό στόχο έχει την διατήρηση της ομοιόστασης του. Η γήρανση με την σειρά της είναι μια προοδευτική διαδικασία που επηρεάζεται από το χρόνο οδηγώντας έτσι στην διατάραξη της ομοιόστασης, στην αύξηση παθολογικών καταστάσεων για τον οργανισμό και μπορεί να οδηγήσει έως και το θάνατο. Μέσω της αύξησης της ηλικίας, ο οργανισμός μπορεί να εμφανίσει ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις όπως αυτοάνοσες ασθένειες που οφείλονται σε χρόνια φλεγμονή και γήρας του ανοσοποιητικού (Y. Li, Goronzy, & Weyand, 2018).

Το γήρας στο μυοσκελετικό σύστημα επέρχεται και έχει άμεση σχέση με το γήρας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ειδικότερα, το γήρας επηρεάζει το ανοσοποιητικό μειώνοντας την ικανότητα αυτού να ανταπεξέρχεται σε τυχόν μόλυνση και το αποτρέπει από την απόκτηση ανοσολογικής μνήμης. Ακόμα, κατά τη

γήρανση, οι μηχανισμοί φυσικής ανοσίας τείνουν να είναι πιο αποδοτικοί, σε αντίθεση με την επίκτητη ανοσία που χάνει την αποδοτικότητά της. Έτσι λοιπόν, μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας όπως τα ενεργά επίπεδα ιντερλευκινών, η ενεργοποίηση φλεγμονωδών παραγόντων όπως λόγω χάρη η πρωτεΐνη CRP, ευνοούνται με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή φυσικών φονικών κυττάρων (NK) και την ακόμα πιο αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών από δενδριτικά κύτταρα και μονοκύτταρα (Boots et al., 2013). Ως συνέπεια, όλες αυτές οι αλλαγές, συμβάλουν στη δημιουργία ενός προφλεγμονώδους περιβάλλοντος που ευνοεί την ανάπτυξη μυοσκελετικών παθήσεων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση (Boots et al., 2013).

3.2 Μυοσκελετικές παθήσεις και DDR

Η παρουσία του μηχανισμού DDR είναι εξίσου σημαντική για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας του μυοσκελετικού συστήματος. Αρκετές από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό απόκρισης του κυττάρου σε πιθανές βλάβες, όπως η ATM και η ATR, συμμετέχουν τόσο στην αναμόρφωση των οστών όσο στην φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία τους. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτού πραγματοποιείται σε περιπτώσεις όπου το μυοσκελετικό σύστημα και γενικότερα ο οργανισμός απειλούνται από επικίνδυνους παράγοντες όπως το γενοτοξικό στρες, η επικίνδυνη ακτινοβολία, τυχόν θραύσεις στην έλικα του DNA κ.α (Y. Li et al., 2018). Σαν αποτέλεσμα, επέρχεται το γήρας του οργανισμού που με τη σειρά του οδηγεί σε καταστροφή των τελομερών, απόπτωση των κυττάρων, αστάθεια του γονιδιώματος και κατ'επέκταση είναι η βασική αιτία για την εμφάνιση ηλικιοεξαρτώμενων μυοσκελετικών νοσημάτων όπως η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, η Οστεοαρθρίτιδα και η Οστεοπόρωση.

3.2.1 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (RA)

Η συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό αποτελεί κρίσιμο σημείο για την εκδήλωση κυτταρικής γήρανσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βλάβης όπως σωματικές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες μπορούν να καταστούν μοιραίες για την πορεία του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, είναι ικανές να επηρεάσουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες του κυττάρου όπως σηματοδοτικά

μονοπάτια, μονοπάτια επιδιόρθωσης κ.α. και να συνεπάγουν την κυτταρική δυσλειτουργία, το γήρας του κυττάρου ή ακόμα να διαταράξουν την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σαν συνέπεια, οι μεταλλάξεις γονιδίων που συμμετέχουν στο DDR έχουν συσχετισθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό με την εμφάνιση σοβαρών ηλικιοεξαρτώμενων νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Y. Li et al., 2018).

Πρόκειται για ένα αυτοάνοσο, φλεγμονώδες νόσημα του μυοσκελετικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από καταστροφικές φλεγμονές στις αρθρώσεις των χόνδρων και των οστών και έχει άμεση σχέση με το ανοσοποιητικό σύστημα. Λόγω διαρκούς ενεργοποίησης της ανοσιακής απόκρισης τα T λεμφοκύτταρα προωθούν την ενεργοποίηση μονοπατιών που εμπλέκονται στην επαγωγή φλεγμονής, στην αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών και εμφάνισης ασθενειών ώσπου τελικά οδηγούν σε εκτεταμένες αρθρικές φλεγμονές. Ακόμα, τα κύτταρα των ασθενών με RA είναι μεταβολικά επαναπρογραμματισμένα οδηγώντας έτσι σε διαφοροποιήσεις στην λειτουργία τους αλλά και στην διάρκεια ζωής τους (Shao et al., 2009).

Η ηλικία εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται στα 40 με 50 έτη με το ρίσκο εμφάνισης να υπολογίζεται στο <1% ενώ το ποσοστό αυξάνει ακόμα περσοσσότερα και στα δυο φύλα στην ηλικία των 60 ετών και άνω. Συγκριτικά με τα μη προσβεβλημένα άτομα, το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με RA μειώνεται κατά 4 έτη στις γυναίκες, όπου εμφανίζουν τη νόσο σε τριπλάσια συχνότητα, ενώ στους άνδρες παρατηρείται μείωση κατά 2 έτη (Boots et al., 2013). Κάποια από τα πιο κοινά συμπτώματα της νόσου είναι ο πόνος, η ευαισθησία, η ακαμψία στις αρθρώσεις, το οίδημα, η ερυθρότητα κτλπ.

Η εμπλοκή της γήρανσης στο ανοσοποιητικό σύστημα στη συγκεκριμένη νόσο οδηγεί σε ανεπάρκεια της δραστηριότητας των τελομερών αλλά και των επιδιορθωτικών μηχανισμών, συμβάλλοντας έτσι στον εκφυλισμό των T λεμφοκυττάρων και στην αύξηση της συχνότητας των CD28 T λεμφοκυττάρων. Ακόμα, σαν συνέπεια του μη λειτουργικού DDR στην RA παρατηρείται αυξημένη πιθανότητα απόπτωσης και σμίκρυνσης των τελομερών. Γενικότερα, η νόσος RA σε άτομα μεγάλης ηλικίας μπορεί να αντιπροσωπεύσει την επιμονή μιας νόσου που εκδηλώνεται κλινικά σε νεότερη ηλικία (Boots et al., 2013). Τα πρώτα συνήθως συμπτώματα της νόσου στους ηλικιωμένους ξεκινούν με πόνους στους ώμους ενώ η εργαστηριακή διάγνωση μπορεί να επιτευχθεί με την μέτρηση της CRP ή του δείκτη

RF που σαν νούμερο είναι μικρότερο στους ηλικιωμένους συγκριτικά με τους νεότερους (Boots et al., 2013).

Μολονότι τα κύτταρα που έχουν υποστεί το φαινόμενο της γήρανσης χαρακτηρίζονται από επιβράδυνση ή και αναστολή του πολλαπλασιασμού τους παραμένουν λειτουργικά και δραστικά σε μεγάλο βαθμό. Λόγο αυτού τους έχει αποδοθεί ο τίτλος (SASP-senescent-associated secretory phenotype) όπου στην ουσία περιγράφει τον κρίσιμο ρόλο γηρασμένων και διαφοροποιημένων κυττάρων στην επιβολή ενός φλεγμονώδους περιβάλλοντος. Παραδείγματος χάρη, μέσω της έκκρισης προφλεγμονοδών κυτταροκινών όπως TNF-α και IFN-γ τα γερασμένα κύτταρα μπορούν και επηρεάζουν γειτονικά κύτταρα και ιστούς οδηγώντας τα στην φλεγμονή και την πρόκληση αυτοάνοσων παθήσεων (Y. Li et al., 2018).

Κάποια από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των T κυττάρων σε άτομα με RA είναι η συσσώρευση CD4 και CD28 T κυττάρων, η πρόωρη απώλεια τελομερών στα CD4 T κύτταρα, απώλεια της τελομεράσης στα T κύτταρα, μη λειτουργική δράση της ATM, μη λειτουργικοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί, υπερπαραγωγή κυτταροκινών, εμπλοκή γενοτοξικού στρες κ.α. (Weyand, Yang, & Goronzy, 2014).

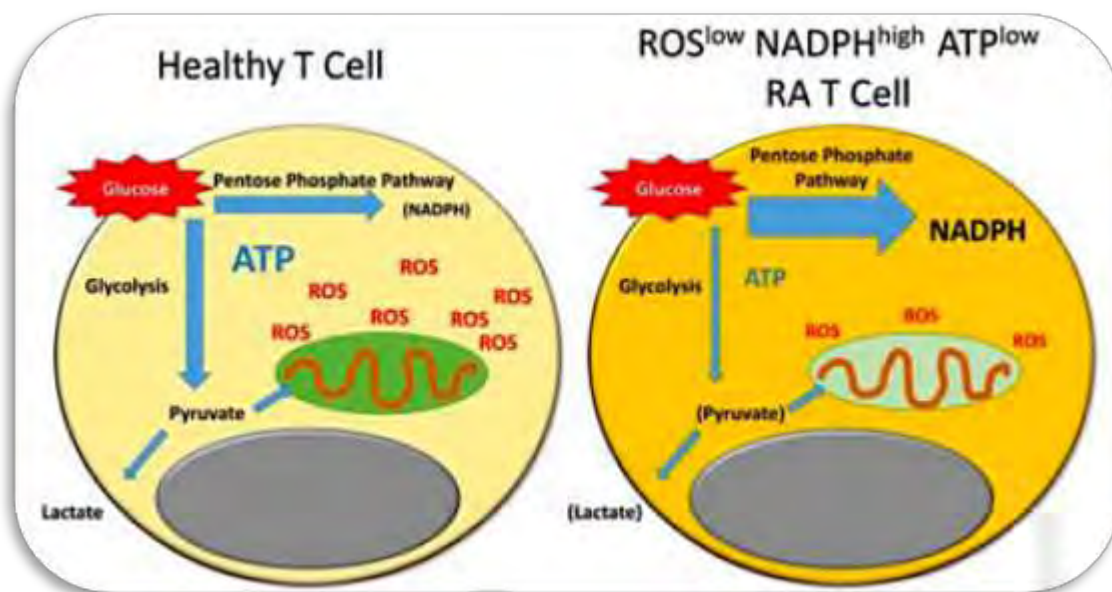
Η σοβαρότητα της νόσου γενικότερα ποικίλει και καθορίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες. Για παράδειγμα, ασθενείς που εμφανίζουν αυξημένες τιμές τόσο του ρευματοειδή παράγοντα όσο και των πρωτεϊνικών αντισωμάτων (ACPAs) έρχονται αντιμέτωποι με αρκετά βαρύ φαινότυπο της νόσου (Firestein, 2014). Επίσης, η ευαισθησία της νόσου καθορίζεται από κάποιους κληρονομικούς παράγοντες που θεωρούνται προκαθορισμένοι. Πρόκειται για τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που σχετίζονται με την RA και μπορούν να εντοπιστούν σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος σε συνδυασμό με αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις γονιδίων που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού. Ο σοβαρότερος με διαφορά γενετικός παράγοντας είναι το γονίδιο ιστοσυμβατότητας HLA-DR που διαθέτει αντιγονοπαρουσιαστικό ρόλο στα T λεμφοκύτταρα (Firestein, 2014).

Οι βλάβες που λαμβάνουν μέρος στο γενετικό υλικό και είναι υπεύθυνες για τη νόσο RA είναι ποικίλες. Πρώτα από όλα, εξωγενείς και ενδογενείς μεταλλαξιόγόνες ουσίες, επικίνδυνη ακτινοβολία, παράγοντες που επάγουν το γήρας, οξειδωτικό στρες κ.α. είναι υπεύθυνες για την πρόκληση θραύσεων της έλικας του γενετικού υλικού (Bhusate, Herbert, Scott, & Perrett, 1992). Δεύτερον, σε ασθενείς με RA ανιχνεύτηκαν σε μεγάλο βαθμό βλάβες 8-oxo-dG, edA και βλάβες που

σχετίζονται με την υπεροξειδωση των λιπιδίων, HedC και είναι υπεύθυνες για την παθογένεση ή τοπική φλεγμονή της νόσου (Ogawa et al., 2013). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, σε δείγματα αίματος ασθενών με RA, ανιχνεύτηκε mtDNA σε συνδυασμό με τη βλάβη 8-oxo-dG και βρέθηκε ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση και εξάρτηση με την παρουσία του RF. Βάση αυτών των ευρημάτων, υπάρχουν υποψίες ότι ενδογενείς νουκλεϊκές ενώσεις συμμετέχουν στην επαγωγή της φλεγμονής δια μέσω ενεργοποίησης της ενεργοποίησης προφλεγμονοδών κυτταροκινών (Hajizadeh, DeGroot, TeKorppele, Tarkowski, & Collins, 2003).

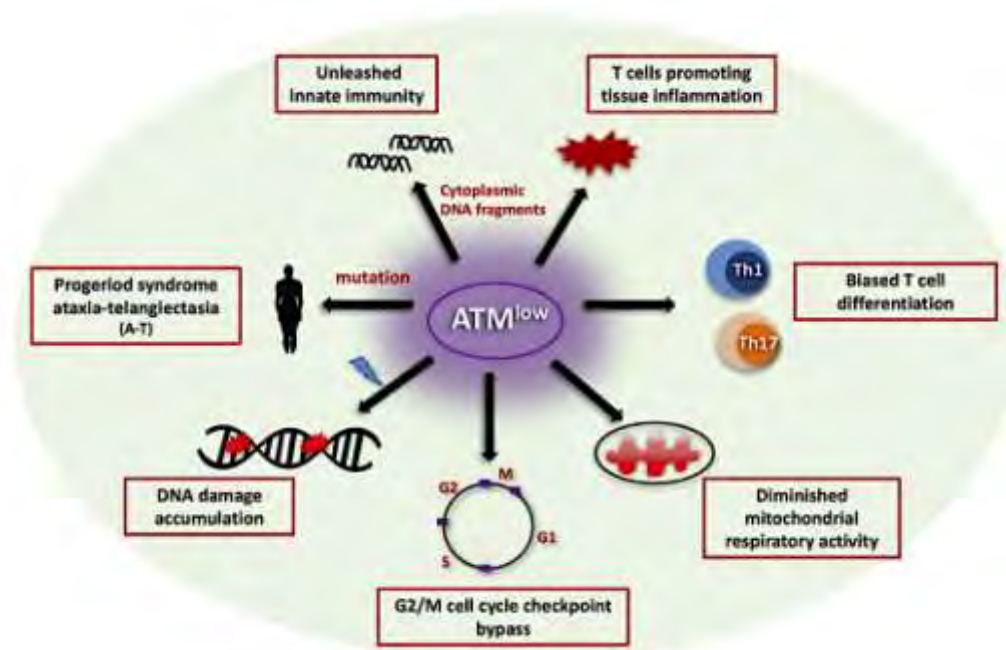
Ακόμα, έχουν βρεθεί αυξημένα ποσά προϊόντων οξειδωσης στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες των ασθενών με RA. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή ROS στον οργανισμό ρυθμίζεται από έναν ειδικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας που σαν ρόλο έχει την διατήρηση ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων. Όμως, ύστερα από έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε άτομα με και χωρίς RA βρέθηκε ότι οι βλάβες, η καταστροφή του γενετικού υλικού και ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός στα άτομα που νοσούν μειώνει την λειτουργικότητα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS στον οργανισμό. Έτσι, τα ROS μπορεί να οδηγήσουν τόσο στην καταστροφή των ιστών όσο στην μετατροπή της νόσου σε χρόνια (Mateen, Moin, Khan, Zafar, & Fatima, 2016).

Συγκριτικά με τα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα, τα T κύτταρα των ασθενών με RA λόγω καταστολής του γλυκολυτικού ενζύμου, φωσφοφρουκτοκινάση, PFKFB3, παράγουν μειωμένα ποσά ATP. Αντίθετα, παράγουν αυξημένα ποσά NADPH λόγω υπερέκφρασης του G6PD που χαρακτηρίζεται ως το ένζυμο που περιορίζει την ταχύτητα του μονοπατιού της φωσφατάσης πεντόζης (PPP). Σαν αποτέλεσμα, η ανισσοροπία μεταξύ ATP και NADPH οδηγεί στην αυξημένη κατανάλωση ROS αλλά και σε πλεόνασμα των μειωτικών στοιχείων (Firestein, 2014). Η μείωση των ROS σχετίζεται άμεσα με την διαφοροποίηση των T κυττάρων στις δεσμευτικές μορφές Th1 και Th17. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της μιτοχονδριακής ιδιότητας και ο σχηματισμός ενός ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος που στοχεύει στη λιπογένεση και στην απόθεση λιπιδίων σε μορφή σταγονιδίων (Weyand, Shen, & Goronzy, 2018).



Εικόνα 3.2 : Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός T κυττάρων στη νόσο RA. Ενώ στα φυσιολογικά T κύτταρα καλύπτονται οι ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου και ρυθμίζεται η μιτοχονδριακή δραστηριότητα και παραγωγή ROS, στα T κύτταρα ασθενών με RA παρατηρείται αυξημένη κατανάλωση ROS και αντικαθιστάτε το ATP από το NADPH (Weyand et al., 2018).

Το φαινόμενο του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού σε κύτταρα ασθενών με RA έχει άμεση σχέση με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του γενετικού υλικού. Αρχικά, η πρωτεΐνη κινάση ATM προκειμένου να ενεργοποιηθεί και να δράσει προϋποθέτει την ενδοκυτταρική παρουσία ROS. Όπως όμως ήδη προαναφέρθηκε, η ποσότητα ROS στο εσωτερικό του κυττάρου έχει απορροφηθεί με αποτέλεσμα τα αποθέματα ROS να είναι ελάχιστα. Έτσι, η δραστηριότητα της ATM μειώνεται χαρακτηριστικά επιτρέποντας στα κύτταρα αυτά να μεταβαίνουν από το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G2/M δίχως κάποιο έλεγχο ενώ παρατηρείται διαφοροποίηση των T κυττάρων σε IFN- γ ή IL-17 (Weyand et al., 2018). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ATM δεν υπόκειται σε μεταλλάξεις ακόμα και αν αναστέλλονται διεργασίες όπως η μεταγραφή ή η φωσφορυλίωση της κινάσης. Αποτέλεσμα των μη λειτουργικών επιδιορθωτικών μηχανισμών είναι η φλεγμονή, η πρόωρη γήρανση ή ακόμα ο κυτταρικός θάνατος (Y. Li et al., 2018).



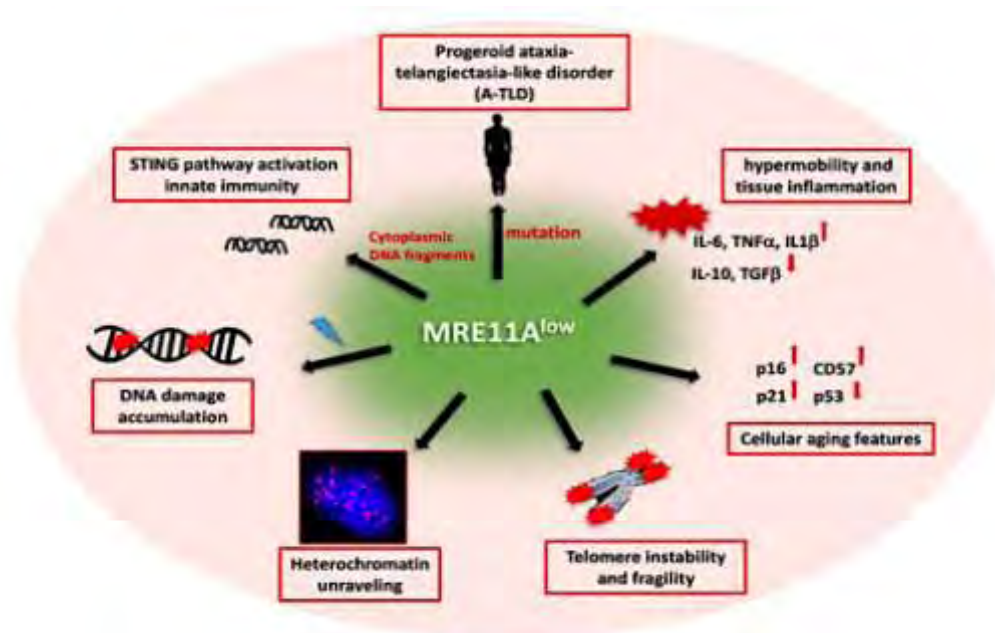
Εικόνα 3.3 : Λειτουργικές δομές που επηρεάζονται από την μειωμένη έκφραση της ATM στην RA (Y. Li et al., 2018).

Η ATM μέσω της ενεργοποίησης της συμβάλει στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση υποστρωμάτων όπως η Chk2, το p53, το BRCA1, το MRE11, το NBS1, το RAD50 κ.α. Έτσι λοιπόν, στην περίπτωση της RA όπου η έκφραση της ATM είναι μειωμένη, παρατηρείται μειωμένη ή μη έκφραση μερικών από τα παραπάνω υποστρώματα με αποτέλεσμα την υπερευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση, το πρόωρο γήρας και την μη αποκατάσταση βλαβών στο DNA ή στα άκρα των τελομερών (Shao et al., 2009). Παραδείγματος χάρη, η έκφραση του p53 και τα περιεχόμενα του συμπλόκου MRN παρουσιάζουν μείωση σε αντίθεση με το γονίδιο BRCA1, το p21 και το p16 που αυξάνεται η έκφραση τους. Με σκοπό την αποφυγή και αντιμετώπιση της κατάστασης αυτής έρευνα έδειξε ότι μόνο η υπερέκφραση της ATM μπορεί να αναστρέψει τις συγκεκριμένες ανωμαλίες (Shao et al., 2009).

Στα κύτταρα RA η μειωμένη έκφραση της ATM βρέθηκε ότι σχετίζεται με αρκετά αυξημένη έκφραση του επιδιορθωτικού ενζύμου DNA-PKcs που συμμετέχει στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και στην διατήρηση των τελομερών αλλά δεν είναι ικανή να καλύψει όλες τις λειτουργίες της ATM (Y. Li et al., 2018). Ακόμα, βρέθηκε ότι συμμετέχει στην κυτταρική απόπτωση, στην επαγωγή της φλεγμονής, εμπλέκεται στην γήρανση του ανοσοποιητικού και σε ανθρώπινες νόσους όπως η RA.

Μια πιθανή εξήγηση για το πως επιτυγχάνει τα παραπάνω είναι αρχικά η ικανότητα σηματοδότησης στο μονοπάτι NF-κΒ και στη συνέχεια η ενεργοποίηση του μορίου προσκόλλησης VCAM και της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF. Επιπλέον, στα T κύτταρα που έχουν ήδη υποστεί πρόωρο γήρας ενεργοποιεί το μόριο JNK οδηγώντας τα προς απόπτωση (Y. Li et al., 2018).

Πέρα από την ATM, στην RA παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα της επιδιορθωτικής πρωτεΐνης MRE11A που αποτελεί δομικό στοιχείο του συμπλόκου MRN και συμμετέχει στην επιδιόρθωση των ssbreaks και dsbreaks. Βρέθηκε λοιπόν ότι προωθεί το γήρας στα T κύτταρα απορρυθμίζοντας μόρια όπως το p21 και το p16, τη δομή της ετεροχρωματίνης και τη φλεγμονή στον αρθρικό ιστό αυξάνοντας την παραγωγή της IL-6 και της TNFα. Όσο εντονότερο γίνεται το φαινόμενο της γήρανσης τόσο μειώνεται η συγκέντρωση της στα κύτταρα. Για την αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης αλλά και της σμίκρυνσης των τελομερών κρίνεται απαραίτητη η υπερέκφραση της MRE11A στα RA T κύτταρα (Ummarino, 2016). Εκτός από την σμίκρυνση των τελομερών στα RA T κύτταρα παρατηρήθηκε επίσης καταστροφή αυτών που οφείλεται στην πρόωρη γήρανση των CD4 T κυττάρων αλλά και στην μειωμένη έκφραση της MRE11A. Η καταστροφή των τελομερών περιλαμβάνει θραύση, παράθεση, σύντηξη είτε πλήρης απώλεια των σημάτων των τελομερών (Y. Li et al., 2016).



Εικόνα 3.4 : Λειτουργικές επιπτώσεις λόγω μειωμένης έκφρασης της MRE11A (Y. Li et al., 2018).

Στη RA λόγω παραγωγής αυξημένων ποσών ROS διαπιστώθηκε συμμετοχή δυο βασικών μορίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης BER, το (OGG1) και το (XRCC1). Το πρώτο ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 3 και είναι υπεύθυνο για την αποκατάσταση της βλάβης 8-OH-Gua αλλά και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού από φλεγμονές ενώ το δεύτερο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 και η αλληλεπίδραση του με το πρώτο συμβάλλει στην ενίσχυση της γλυκοζυτικής του ιδιότητας (Yosunkaya et al., 2012). Λόγο λοιπόν εμφάνισης πολυμορφισμών στα παραπάνω επιδιορθωτικά γονίδια οι βλάβες στο γενετικό υλικό δεν επιδιορθώνονται ευνοώντας στο σχηματισμό φλεγμονώδους περιβάλλοντος. Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι παραδείγματα πολυμορφισμών όπως ο XRCC1-Arg/Gln και ο OGG1 A/G παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη της RA όσο και στην σοβαρότητα της νόσου και διαφέρουν από πληθυσμό σε πληθυσμό (Mohamed, El-Shal, El-Shahawy, & Abdel Galil, 2016).

Μια ακόμα πρωτεΐνη κλειδί που συμμετέχει στο DDR βρέθηκε ότι εμπλέκεται και στην RA. Πρόκειται για την πρωτεΐνη PARP1 που έχει ως κεντρικό ρόλο την επιδιόρθωση και εξασφάλιση της γενετικής σταθερότητας. Βρέθηκε λοιπόν ότι πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο μόριο όπως ο Val762Alam σχετίζονται με την πρόκληση της νόσου (Lee et al., 2012). Ωστόσο οι πολυμορφισμοί αυτοί διαφέρουν και δεν είναι πάντοτε ίδιοι από εθνικότητα σε εθνικότητα καθώς μεταξύ τους εντοπίζεται μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στην εκδήλωση της νόσου είναι μέσω της αλληλεπίδρασης τους με κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην δημιουργία της φλεγμονή (Lee et al., 2012).

Εκτός από την εμπλοκή του περιβάλλοντος και της γενετικής παρεμβάλλεται και το κομμάτι της επιγενετικής αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της νόσου RA. Συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αλλά και στη ρύθμιση της δραστηριότητας του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω μηχανισμών όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, τα microRNAs κ.α. (Glant, Mikecz, & Rauch, 2014). Στην περίπτωση της RA, οι δυο βασικότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί που απαντώνται είναι η ακετυλίωση των ιστονών και η μεθυλίωση του DNA που λειτουργούν επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων μέσω της ρύθμισης της προσβασιμότητας μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Η ακετυλίωση των ιστονών προάγει την μεταγραφή σε αντίθεση με την μεθυλίωση που την αναστέλλει. Γενικότερα, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από μελέτες επάνω στους μηχανισμούς επιγενετικής είναι χρήσιμες για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους (Glant, Mikecz, & Rauch, 2014).

Σύμφωνα λοιπόν με πρόσφατες μελέτες σε αρθρικά κύτταρα ασθενούς με RA βρέθηκε ότι λαμβάνει μέρος υπομεθυλίωση του DNA και πιο συγκεκριμένα στον υποκινητή του γονιδίου CXCL12 όπου υπό φυσιολογικές συνθήκες μεθυλιώνεται. Τα περισσότερα από τα γονίδια που επηρεάζονται συμμετέχουν σε λειτουργίες όπως η φλεγμονή ή ανοσοαπάντηση κ.α. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό εύρημα αποτελεί η μεθυλίωση περιοχών στο κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας όπου σαν αποτέλεσμα αυξάνεται το ρίσκο εμφάνισης της νόσου. Επίσης, στο σημείο των αρθρώσεων η φυσιολογική μετατροπή από HAT σε HDAC αναστρέφεται λόγω ακετυλίωσης των ιστονών με αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων (Klein, Ospelt, & Gay, 2012). Αρκετοί από τους επιγενετικούς μηχανισμούς μπορούν ακόμα να επηρεάσουν την δραστηριότητα της NK-κΒ όπου δεν είναι άλλη από την ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή (Glant et al., 2014).

Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι μεγαλύτερη στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες και αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρέμβαση του επιγενετικού μηχανισμού της μεθυλίωσης του DNA. Σε γενικά πλαίσια πιστεύεται ότι το χρωμόσωμα X παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της RA καθώς σε περιφερικό αίμα από ασθενείς με RA βρέθηκε αρκετά αυξημένη η παρουσία του χρωμοσώματος σε απενεργοποιημένη μορφή. Επιπλέον, έχει ανιχνευτεί ότι ο μηχανισμός της μεθυλίωσης μπορεί και ρυθμίζει το επίπεδο έκφρασης των microRNAs συναρτήσει της παθογένεσης της νόσου. Μέσω λοιπόν αλλαγών που πραγματοποιούνται στο πρότυπο μεθυλίωσης, όπως παραδείγματος χάρη απομεθυλίωση της IL-6 και IL-10, επάγεται μια κατάσταση όπου το mRNA υπερεκφράζεται και ευνοείται η εκδήλωση της νόσου (Yuan, Li, Xu, Jiang, & Zhou, 2014).

Μια ακόμα κατηγορία επιγενετικών μηχανισμών που εμπλέκεται στη RA σε μεταμεταγραφικό επίπεδο είναι τα microRNAs. Τυχόν δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει στην παθογένεση καθώς τα μόρια αυτά κατέχουν ρόλο κλειδί για την πρόοδο της νόσου. Η δράση τους στηρίζεται κυρίως στην αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων είτε μέσω αναστολής της μετάφρασης είτε μέσω αποικοδόμησης του mRNA (Ammari, Jorgensen, & Apparailly, 2013). Άλλες βασικές λειτουργίες που ρυθμίζονται από τη δράση τους είναι η αντιγραφή του γενετικού υλικού, η απόπτωση, η άμυνα του οργανισμού κ.α. Λόγο λοιπόν ότι η νόσος χαρακτηρίζεται τόσο από φλεγμονή του αρθρικού ιστού όσο από βλάβες σε οστά και χόνδρους βρέθηκαν υπεύθυνα microRNAs ξεχωριστά για την κάθε περίπτωση (Glant, Mikecz, & Rauch, 2014).

Στην πρώτη περίπτωση της φλεγμονής, τα microRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζοντας κατά συνέπεια και την πορεία της νόσου. Το πρώτο microRNA που βρέθηκε είναι το miR-155 το οποίο ρυθμίζει τη δράση και την ανάπτυξη των Β κυττάρων, την ανάπτυξη των φλεγμονοδών κυττάρων Th1 και Th17 κ.α. και εκφράζεται σε περιπτώσεις όπως η παρουσία προφλεγμονοδών κυτταροκινών. Έτσι λοιπόν, στις αρθρώσεις ασθενών με RA ανιχνεύθηκαν αυξημένα ποσά miR-155 κυρίως λόγω της ύπαρξης μακροφάγων (Ammari et al., 2013). Το δεύτερο σε σειρά microRNA είναι το miR-146a το οποίο ανιχνεύθηκε σε αυξημένα ποσά σε ασθενείς με RA. Η έκφραση του επάγεται από προφλεγμονώδεις παράγοντες ενώ σαν λειτουργία έχει την απορρύθμιση πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια όπως αυτό της IL-1, TIR, IFN κ.α ενώ κατέχει ακόμα αντιαποπτωτικό ρόλο. Τελευταίο, το miR-223 με προφλεγμονώδη δράση στα Τ κύτταρα όπου ρυθμίζει την παραγωγή IFN- γ που επάγεται από το LPS και τελικά ρυθμίζει την φλεγμονή από το IL-17 (Ammari et al., 2013).

Στη δεύτερη περίπτωση καταστροφής του χόνδρου και των οστών τα microRNAs εμπλέκονται στον σχηματισμό των οστών, σε διεργασίες επαναρρόφησης αλλά και σε διεργασίες όπως η καταστροφή των ιστών σε ασθενείς με RA. Αρχικά, στην συγκεκριμένη περίπτωση, βρέθηκε ότι το miR-155 δρα στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών στοχεύοντας το SOCS1 και τυχόν απώλεια του οδηγεί σε διάβρωση των οστών και όχι σε φλεγμονή (Ammari et al., 2013). Δεύτερον, το miR-146a μέσω της μείωσης της ικανότητας των μυελοειδών προδρόμων να εισέλθουν στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών αναστέλλεται η διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης. Γενικά, η δράση του ρυθμίζει αρνητικά την οστεοκλαστογένεση καθώς μπορεί και ελέγχει το σηματοδοτικό μονοπάτι NF- κ B αλλά και παραγωγή φλεγμονοδών κυτταροκινών. Τέλος, το miR-223 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην οστεοκλαστογένεση στοχεύοντας το NF-1A. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η παρατεταμένη έκφραση του miR-223 προκειμένου να διατηρήσει την καταστολή του NF-1A και να επιτρέψει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Ammari, Jorgensen, & Apparailly, 2013).

3.2.2 Οστεοαρθρίτιδα (OA)

Το γήρας είναι ένα φαινόμενο που μπορεί να επιφέρει ουσιαστικές αλλαγές στη δομή, στη μοριακή σύνθεση και στη μεταβολική ιδιότητα του αρθρικού χόνδρου

προκαλώντας τελικά τη νόσο της οστεοαρθρίτιδας. Γενικότερα, αυτές οι ηλικιοεξαρτώμενες αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν στην μειωμένη αποτελεσματικότητα επιδιόρθωσης του αρθρικού χόνδρου. Το ρίσκο εμφάνισης της ΟΑ αυξάνεται λόγω γήρατος μέσω του συμβιβασμού της διατήρησης του αρθρικού χόνδρου ή μέσω της αποκατάστασης της λειτουργίας του ιστού έπειτα από κάποιο τραυματισμό (Toh et al., 2016). Ακόμα, η κυτταρική γήρανση είναι υπεύθυνη για την παύση της διαίρεσης των κυττάρων επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την λειτουργία και την ομοιότητα του οργανισμού ενώ οι βασικοί τρόποι μεσολάβησης είναι η καταστροφή των τελομερών, η καταστροφή του DNA, το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και η απορρύθμιση της έκφρασης των p53, p21 και p16 (Toh et al., 2016).

Γενικά, η ΟΑ είναι μια αρκετά κοινή και σοβαρή νόσος που είναι δύσκολο να αποτραπεί και χαρακτηρίζεται κυρίως από εκφυλισμό των αρθρικών χονδροκυττάρων. Η εμφάνιση της νόσου αυξάνεται κατά 3 με 4 φορές σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών ενώ η επίπτωση της νόσου αυξάνεται δραματικά από δεκαετία σε δεκαετία. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική νόσο που επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς αλλά και γενετικούς παράγοντες και χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία φαινοτύπων (Toh et al., 2016). Στον εκφυλισμό της νόσου εκτός της γήρανσης συγκαταλέγονται και άλλοι παράγοντες όπως οι διατάραξη των αναβολικών και καταβολικών ιδιοτήτων που παίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του ιστού του αρθρικού χόνδρου. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της ισορροπίας μεταξύ αναβολικών αυξητικών παραγόντων και καταβολικών κυτταροκινών που βασίζονται στην επιγενετική και γενετική ρύθμιση του γονιδιώματος (Rose et al., 2012).

Σύμφωνα με συστηματικές μελέτες που διεξήχθησαν βρέθηκε ότι στην ΟΑ τα χονδροκύτταρα εμφανίζουν πλήρης αποδιοργάνωση της γονιδιακή έκφρασης συγκριτικά με φυσιολογικά κύτταρα και αυτό καταλήγει σε ένα μοντέλο χαοτικής έκφρασης των γονιδίων. Ακόμα βρέθηκε ότι τα χονδροκύτταρα στην ΟΑ παρουσιάζονται με εκφυλισμένο ή γερασμένο φαινότυπο. Αυτό διαπιστώθηκε ύστερα από την ανίχνευση αυξημένων δεικτών όπως για παράδειγμα η β-γαλακτοσιδάση ενώ δείκτες που υποδηλώνουν των κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως το Ki67 ήταν μειωμένοι (Rose et al., 2012). Επίσης, στα ΟΑ χονδροκύτταρα είναι αρκετά έντονο το φαινόμενο της γενετικής καταστροφής που είναι υπεύθυνο για την εμπλοκή του DDR στην συγκεκριμένη νόσο με σκοπό την αποφυγή καταστάσεων όπως το γήρας, η απόπτωση ή ο κυτταρικός θάνατος (Rose et al., 2012).

Εκτός από την ρευματοειδή αρθρίτιδα, τα ROS κάνουν την εμφάνιση τους και στην ΟΑ και πιστεύεται ότι είναι η βασική αιτία γήρανσης και καταστροφής του γενετικού υλικού. Σύμφωνα με πολλαπλές μελέτες, τα επίπεδα ROS που παράγονται σε ποικίλες μορφές από τα χονδροκύτταρα είναι ογκώδη με αποτέλεσμα να μειώνουν την επιβίωση των χονδροκυττάρων. Αυτές οι μορφές μπορεί να είναι νιτρικού οξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, σουπεροξειδίου αλλά και προφλεγμονώδης κυτταροκίνες ή χημειοκίνες. Ως συνέπεια, συνεπάγεται ο αποπολυμερισμός του υαλουρονικού οξέος αλλά και ο θάνατος των χονδροκυττάρων που οδηγούν τελικά στην ΟΑ. Όσο πιο αυξημένα τα επίπεδα ROS τόσο πιο αυξημένες οι βλάβες στο γενετικό υλικό που οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση συνοδευόμενη από γήρανση και εκδήλωση ασθενειών όπως η ΟΑ (Yui et al., 2014). Τα ROS τελικά καταλήγουν στην αστάθεια των τελομερικών άκρων, στην πρόωρη γήρανση, στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αλλά και στην απόπτωση των χονδροκυττάρων. Για την καταπολέμηση των ROS και την προστασία των χονδροκυττάρων βρέθηκε ότι το καλύτερο αντίδοτο είναι η χρήση αντιοξειδωτικών όπως το NAC (Toh et al., 2016).

Ένας επιπλέον παράγοντας που διαδραματίζει σοβαρό ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΑ και συσχετίζεται με το οξειδωτικό στρες είναι το φαινόμενο της φλεγμονής. Η IL-1β είναι μια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που δρα σαν βασικός μεσολαβητής της φλεγμονής σε όλα τα συστήματα του σώματος και παράγεται από διάφορα κύτταρα. Η IL-1β θεωρείται ένας από τους υπεύθυνους παράγοντες που προκαλούν τη φλεγμονή του αρθρικού χόνδρου, αυξάνουν τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεασών (MMPs) ενώ μειώνουν τους αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs). Αυτή ανισορροπία μεταξύ MMPs και TIMPs βρέθηκε ότι είναι πολύ σημαντική για την εξέλιξη της ΟΑ ενώ τελικά δείχνει να οδηγεί στην απόπτωση των χονδροκυττάρων (Sun et al., 2015). Κάποιες επιπρόσθετες προφλεγμονώδη κυτταροκίνες που ανιχνεύονται κατά τη γήρανση και είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων όπως η ΟΑ είναι η CRP, η IL-6 και η TNF-a (Toh et al., 2016).

Με σκοπό την ανίχνευση του τρόπου εμπλοκής των τελομερών στη νόσο διεξήχθησαν πολυάριθμες μελέτες. Βρέθηκε λοιπόν ότι σε εμβρυικά χονδροκύτταρα το μήκος των τελομερών αλλά και η δραστηριότητα της τελομεράσης ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με ατόμων μεγάλης ηλικίας σε αντίθεση με την γήρανση που ήταν μικρότερη (Toh et al., 2016). Βασική αιτία για την τροποποίηση των τελομερών αποτελεί το οξειδωτικό στρες αλλά και η καταστροφή του γενετικού υλικού. Επίσης, η δυσλειτουργία των τελομερών αλλά και της τελομεράσης μπορεί να προκληθεί από

την αναστολή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων ή από την μειωμένη παραγωγή ενέργειας από αυτά (Toh et al., 2016).

Όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων p53, p21 και p16 βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται στα κύτταρα με ΟΑ και αυτό οδηγεί στην αναστολή της δράσης κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες. Το γεγονός αυτό συνοδεύει επίσης η θετική συσχέτιση με την παρουσία της β γαλακτοσιδάσης που σχετίζεται με το γήρας. Ο πιο κατάλληλος δείκτης και μεσολαβητής της κυτταρικής γήρανσης από τα παραπάνω είναι το p16 το οποίο ανιχνεύεται στα χονδροκύτταρα και στα MSCs κατά το μονοπάτι p16-pRB (Toh et al., 2016). Βρέθηκε λοιπόν ότι, σε περίπτωση απενεργοποίησης του συγκεκριμένου γονιδίου τα χονδροκύτταρα και τα MSCs επιστρέφουν στην κανονική τους λειτουργία. Ακόμα, το p16 ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε χονδροκύτταρα που χαρακτηρίζονται από ΟΑ και κυτταρική γήρανση συγκριτικά με αυτά που ανιχνεύονται σε εμβρυϊκούς ιστούς και η έκφραση είναι πολύ μικρότερη (Toh et al., 2016).

Όσον αφορά το μηχανισμό DDR, προκειμένου να γίνει έλεγχος για την συμμετοχή του στην ΟΑ, έγινε σε πρώτη φάση έρευνα για το ρόλο μεμονωμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη νόσο. Στα πρώιμα στάδια της νόσου κάνουν την εμφάνιση τους φλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IL-1β, το NO, ο TNF-α κ.α. Έτσι λοιπόν, λόγω ότι στην ΟΑ είναι πολύ έντονο το φαινόμενο της φλεγμονής, έγινε αναζήτηση σχετικά με την παρουσία ή όχι της πρωτεΐνης PARP1. Γενικότερα, έχει αποδειχθεί ότι τυχόν αναστολή της δράσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μπορεί να καταστείλει την φλεγμονώδη απόκριση (Sun et al., 2015).

Στην περίπτωση της ΟΑ, βρέθηκε ότι μέσω της συσσώρευσης της IL-1β στα χονδροκύτταρα και κατ'επέκταση αύξηση της φλεγμονής η έκφραση και η δραστηριότητα της PARP1 αυξάνεται. Αυτό σαν αποτέλεσμα οδήγησε στην φωσφορυλίωση και πυρηνική μετατόπιση του NF-κB p65 λόγω αύξησης του TNF-α και της έκφρασης του iNOS (Sun et al., 2015). Αντίθετα, η αναστολή της PARP1 μείωσε την φλεγμονώδη απόκριση που επάγεται από την IL-1β μέσω της αναστολής του μονοπατιού IL-1R/NF-κB. Επίσης, η PARP1 έχει την ικανότητα διατήρησης της ισορροπίας μεταξύ MMPs και TIMP-1 συμβάλλοντας στην καταστολή της καταστροφής του χόνδρου. Τέλος, η PARP1 αποτελεί έναν αρκετά χρήσιμο παράγοντα που ελέγχεται για την πιθανή προσφορά της στην θεραπεία της νόσου (Sun et al., 2015).

Ένα ακόμα ένζυμο του μηχανισμού DDR που συμμετέχει στην παθογένεση της ΟΑ μέσω της ρύθμισης της γήρανσης και της απόπτωσης είναι η ενδονουκλεάση ERCC1 που εμπλέκεται στην γενετική επιδιόρθωση. Η έκφραση της στα χονδροκύτταρα είναι μειωμένη αλλά η συναναστροφή της με παράγοντες όπως η IL-1β συμβάλλει στην περιστασιακή αύξηση της. Η αναστολή της οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των μεταλλοπεπτιδίων αλλά και στη μείωση του κολλαγόνου τύπου II (Takayama et al., 2014). Ακόμα, η καταστολή της δράσης της παραπάνω ενδονουκλεάσης οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων αλλά και στην ενίσχυση του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης. Αυτό καθιστά την ERCC1 σαν παράγοντα προστασίας των ανθρώπινων χονδροκυττάρων από το καταβολικό στρες και δίνει ελπίδες για την κατανόηση της παθοφυσιολογία της νόσου αλλά και στον εντοπισμό ενός πιθανού στόχου προς θεραπεία (Takayama et al., 2014).

Το 2014, ερευνητές ανίχνευσαν ένα ακόμη επιδιορθωτικό ένζυμο που εμπλέκεται στην ΟΑ. Πρόκειται για την απουρινική ενδονουκλεάση Apex2 που ανιχνεύεται γενικότερα στον επιδιορθωτικό μηχανισμό BER του DDR και δρα ενάντια των οξειδωτικών βλαβών. Βρέθηκε λοιπόν ότι, σε συνθήκες καταβολικού στρες η έκφραση της Apex2 είναι πολύ πιο αυξημένη σε περιπτώσεις σοβαρούς εκφυλιστικής ΟΑ συγκριτικά με πιο ήπια κατάσταση (Yui et al., 2014). Επιπλέον, ο καταβολικός παράγοντας IL-1β που ανιχνεύεται στη νόσο επάγει την έκφραση της Apex2 στα χονδροκύτταρα ενώ η χρήση μικρών παρεμβαλλομένων RNA κάνει το αντίθετο οδηγώντας στην μειωμένη δραστηριότητα των χονδροκυττάρων (Yui et al., 2014).

Ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου φαίνεται να έχει τελικά σχέση με την έκφραση της Apex2 που μπορεί να προκληθεί από καταβολικούς παράγοντες που σχετίζονται με την ΟΑ ώστε τελικά να καταφέρει να προστατέψει τον αρθρικό χόνδρο από αυτού του είδους απειλές. Έτσι, υπάρχουν ελπίδες που υποδηλώνουν ότι η Apex2 είναι ένας πιθανός προστάτης των χονδροκυττάρων στην ΟΑ από περιστάσεις καταβολικού στρες (Yui et al., 2014).

Στην ΟΑ εκτός από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κάνουν την εμφάνιση τους στατικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που οφείλονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Σε αυτές ανήκουν η μεθυλίωση του DNA, η ακετυλίωση ιστονών, αλλαγές στην δομή της χρωματινής αλλά τα microRNAs. Ο ρόλος της επιγενετικής στην περίπτωση της ΟΑ μπορεί να αξιοποιηθεί για την άντληση

πληροφοριών για την εξέλιξη της νόσου αλλά και την εύρεση πιθανών θεραπευτικών μέσων (Goldring & Marcu, 2012). Αρχικά, στην OA εμπλέκεται η απομεθυλίωση των ιστόνων αλλά και των νησίδων CpG, όπου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να προκαλέσει την έκφραση προφλεγμονοδών κυττάρων. Ακόμα, ύστερα από μελέτες, βρέθηκε ότι η μεθυλίωση του DNA επιδρά σε μια σειρά γονιδίων όπως MMP3, MMP9, IL-1β που κωδικοποιούν ένζυμα που επάγουν τον φαινότυπο της νόσου OA. Γενικότερα, στην OA επιγενετικοί μηχανισμοί όπως η απομεθυλίωση είναι πιο συχνά παρόν συγκριτικά με άλλα φαινόμενα όπως η υπερμεθυλίωση (Goldring & Marcu, 2012).

Επίσης, οι τροποποιήσεις των ιστονών παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στα αναβολικά και καταβολικά φαινόμενα που λαμβάνουν μέρος στα χονδροκύτταρα. Ειδικότερα, η ακετυλίωση των ιστόνων δίνει πρόσβαση σε ρυθμιστικούς παράγοντες σε μεταγραφικά μονοπάτια και προωθεί την γονιδιακή έκφραση σε αντίθεση με την αποακετυλίωση που οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης γονιδίων. Ακόμη, βρέθηκε ότι σε ασθένειες με OA επικρατεί αρκετά αυξημένη έκφραση των HDACs ενώ μειωμένη βρέθηκε η έκφραση της λυσίνης δεακετυλάσης SIRT1 στα χονδροκύτταρα οδηγώντας τα σε απόπτωση αλλά και τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων σε συγκεκριμένα στάδια της OA όπως μείωση της έκφρασης του COL2A1 και αύξηση του COL10A1 (Goldring & Marcu, 2012).

Προκειμένου να ανιχνευτούν γονίδια αλλά και τα σχετικά δίκτυα που παρουσιάζουν συνεργασία στην OA έγινε μελέτη των microRNAs. Αφού λοιπόν έγινε σύγκριση ασθενών και μη βρέθηκαν 16 microRNAs και 76 πρωτεΐνες, με διαφορά στην έκφραση να εμπλέκονται στη συγκεκριμένη νόσο. Συνολικά από τα 16 τα 9 σχετίζονται με θετική ρύθμιση ενώ τα υπόλοιπα 7 με αρνητική ρύθμιση του οστεοαρθρικού χόνδρου. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι κάποια τα microRNAs στην OA συσχετίζονται σε αρκετά μεγάλο βαθμό με τον δείκτη μάζας του σώματος (BMI) (Πιορουλός, Malizos, Οικονομού, & Tsezou, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, microRNAs όπως το mir-22 και mir-103 έχουν θετική συσχέτιση με το BMI σε αντίθεση με το mir-25, το mir-337 και το mir-29 που εκφράζουν αντίστροφη συσχέτιση και υποδηλώνουν την πιθανή εμπλοκή των microRNAs στην παθογένεση της νόσου. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω 5 microRNAs ανιχνεύτηκαν επίσης τα γονίδια στόχοι (BMP7, RETN, LEP, PPARA, ACOX1, ITGA5, LEP) που συνδέουν την OA με την παχυσαρκία. Με βάση τα

παραπάνω ευρήματα, η φλεγμονή και η παχυσαρκία συσχετίζονται με την OA η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από τα microRNAs (Iliopoulos et al., 2008).



Εικόνα 3.5 : Απεικόνιση των 16 microRNAs που συμμετέχουν στην παθογένεση της OA (Iliopoulos et al., 2008).

Η OA βρέθηκε επίσης ότι είναι μια νόσος που σχετίζεται με το μεταβολισμό ύστερα από την εύρεση του miR-33a που συμβάλει στη ρύθμιση της σύνθεσης της χοληστερόλης στα χονδροκύτταρα ασθενών με OA. Τα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συμμετέχουν στη σύνθεση των λιπιδίων ενώ εμφανίζουν μειωμένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης όπως το ABCA1 και το ApoA1. Σαν αποτέλεσμα, στα κύτταρα συσσωρεύεται η χοληστερόλη προκαλώντας την μετατροπή τους σε τοξικά (Kostoroulou, Malizos, Parathanasiou, & Tsezou, 2015). Παρόλα αυτά, το miR-33a αποτελεί έναν από τους βασικούς ρυθμιστές της χοληστερόλης και εντοπίζεται στο γονίδιο SREBP2 που εμφανίζει αυξημένη έκφραση στα OA χονδροκύτταρα και μειώνει τα επίπεδα του ABCA1 και της HDL. Έτσι λοιπόν, βρέθηκε ότι το επίπεδο του miR-33a είναι πολύ πιο αυξημένο στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα λόγω της υπερέκφρασης του γονιδίου SREBP2 (Kostoroulou, Malizos, Parathanasiou, & Tsezou, 2015).

Το 2016 ανιχνεύτηκαν 4 ακόμα microRNAs (mir-199a-5p, mir-199a3p, mir-590-5p, mir-211-5p) το οποία συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της ΟΑ κατά την σκλήρυνση του οστού που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου. Να αναφερθεί επίσης ότι από το 2008 έως το 2016 είχαν ανιχνευτεί από διάφορες ομάδες επιστημόνων και άλλα microRNAs όπως το mir-27a, mir-133a, mir-21-5p κτλ. Συμπερασματικά, τα microRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πιθανοί βιοδείκτες για την διάγνωση και τη θεραπεία της ΟΑ αλλά και σαν σηματοδότες που φανερώνουν τυχόν κυτταρικό εκφυλισμό (Trachana et al., 2018).

3.2.3 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση είναι μια καταστροφική ασθένεια που επιφέρει προβλήματα στην υγεία και χαρακτηρίζεται από συστηματική παθολογία του σκελετού. Πρόκειται για μια πάθηση που εξαρτάται σε αρκετά μεγάλο βαθμό από την ηλικία καθώς ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας έχουν πιο αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν τη νόσο (Kim et al., 2017). Αυτό απεδείχθη έπειτα από βιοψία οστών σε ηλικιωμένους ασθενείς όπου παρατηρήθηκε μείωση της μάζας τόσο του σπονδυλικού όσο του φλοιώδες οστού. Η απώλεια της οστικής μάζας στους ηλικιωμένους με ΟΑ οφείλεται κυρίως στη μείωση του αριθμού των οστεοβλαστών που είναι υπεύθυνοι για την ανοργανοποίηση και σύνθεση της οστικής μοίρας. Επειδή λοιπόν οι οστεοβλάστες είναι μεταμιτωτικά κύτταρα με μικρή διάρκεια ζωής, υπάρχει η άμεση αναγκαιότητα για αντικατάσταση των παλαιών από καινούργια κύτταρα (Kim et al., 2017).

Η διάκριση της συγκεκριμένης πάθησης πραγματοποιείται σε δυο κατηγορίες, την οστεοπόρωση μετά την εμμηνόπαυση και την γεροντική οστεοπόρωση. Η πρώτη μορφή της νόσου είναι πιο συχνή στις γυναίκες και οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι οι στεροειδή ορμόνες δυσλειτουργούν. Αυτό εμφανίζεται λόγω ότι οι η απώλεια των οιστρογόνων στις γυναίκες γίνεται με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό από ότι στους άνδρες αντίστοιχα με την τεστοστερόνη (X. Wang & Li, 2007). Σαν αποτέλεσμα, βελτιώνεται η οστεοκλαστογένεση αλλά και η δραστηριότητα των οστεοκλαστών οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε οστική απώλεια. Η δεύτερη μορφή της πάθησης αντίθετα εμφανίζεται λόγω μειωμένου σχηματισμού των οστών λόγω μειωμένου αριθμού των οστεοκλαστών και κάνει την εμφάνιση της τόσο σε άνδρες όσο σε γυναίκες (X. Wang & Li, 2007).

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από προγόνους μεσεγγυματικής προέλευσης που εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Runx2 και Osterix1(Osx1). Ο μειωμένος αριθμός των οστεοβλαστών λόγω γήρατος στον ανθρώπινο σκελετό ατόμων με ΟΑ έχει αποδοθεί σε αλλαγές των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων, στη μείωση του αριθμού των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων, σε παράγοντες όπως η ελαττωματική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός των προγονικών κυττάρων, στην αυξημένη γήρανση αλλά και επαγωγή της απόπτωσης (X. Wang & Li, 2007). Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι η μείωση του σχηματισμού των οστών συναρτίζει πάντα της ηλικίας μπορεί να αποδοθεί στην μείωση των οστεοπρογονικών κυττάρων αλλά και στην μειωμένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Runx2 και Osterix1(Osx1) λόγω βλαβών στο DNA που ενισχύουν την κυτταρική γήρανση. Η εφαρμογή των βλαβών αυτών οφείλεται κυρίως στην ελαττωματική δράση της τελομεράσης ERCC1 ή του Ku80 (Kim et al., 2017).

Οι βλάβες που εμπλέκονται στην δημιουργία ενός προβληματικού σκελετού εκτός από ενδογενείς μπορεί να προέρχονται και από εξωγενείς πηγές όπως ελεύθερες ρίζες ή επικίνδυνη ακτινοβολία. Στην περίπτωση της οστεοπόρωσης εμπλέκεται ο επιδιορθωτικός μηχανισμός NER που διεκπεραιώνεται κυρίως από την ενδονουκλεάση ERCC1-XPF. Τυχόν απώλεια της δράσης του συστήματος ERCC1-XPF οδηγεί στην εμφάνιση ηλικιοεξαρτώμενων νοσημάτων όπως η οστεοπόρωση και η οστεοπενία ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες εξασφαλίζεται η σωστή ανάπτυξη του σκελετού αλλά και η διατήρηση της ομοιόστασης (Chen et al., 2013).

Λόγω απώλειας της δράσης της ERCC1, συσσωρεύονται ενδογενείς βλάβες στο γενετικό υλικό και αναστέλλεται το μονοπάτι σηματοδότησης NF-kB που τελικά οδηγεί στην εμφάνιση της οστεοπόρωσης λόγω γήρανσης των οστών. Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα που υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζει τον κυτταρικό θάνατο αλλά και την επιβίωση των κυττάρων από παράγοντες όπως η φλεγμονή. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης κινάσης IKK που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει το I-kB οδηγώντας στην απελευθέρωση του NF-kB (Chen et al., 2013). Το NF-kB στη συνέχεια αφού μεταφερθεί στον πυρήνα προκαλεί την έκφραση γονιδίων στόχων που ρυθμίζουν διαδικασίες του κυττάρου όπως η απόπτωση, η αντίδραση του κυττάρου στην φλεγμονή αλλά και το γήρας. Επίσης, κατά την οστεοπόρωση ενεργοποιείται ο υποδοχέας του NF-kB (RANKL) που προκαλεί τη δημιουργία φλεγμονώδους περιβάλλοντος για τα οστά (Chen et al., 2013).

Δυο ακόμη παράγοντες που πιθανόν συσχετίζονται με την οστεοπόρωση και μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες για τη νόσο είναι το Αβ αμυλοειδές και το APP γονίδιο που είναι αρμόδιο για την σύνθεση του Αβ πεπτιδίου. Πιστεύεται λοιπόν ότι, με σκοπό την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών το Αβ πεπτίδιο και το γονίδιο APP συσσωρεύεται μη φυσιολογικά στο οστεοπορωτικό οστό και οδηγεί στην παθογένεση (Cornelius et al., 2014). Μια πιθανή πηγή εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου στα οστά είναι το αίμα, όπου το Αβ αυξάνεται ολοένα και περισσότερο με την αύξηση της ηλικίας. Από την στιγμή λοιπόν που ο οστεοβλάστης μετατρέπεται σε οστεοκύτταρο η μεταφορά του Αβ και του APP στα οστεοκύτταρα μπορεί να αποτελέσει συνέπεια της έκκρισης από τους οστεοβλάστες κατά την διάρκεια των διαδικασιών της διαφοροποίησης των οστών και της γήρανσης. Σαν αποτέλεσμα η συσσώρευση του Αβ στα οστεοκύτταρα μπορεί να αποτελέσει αιτία κυτταρικής απόπτωσης (Cornelius et al., 2014).

Η παρουσία του μηχανισμού DDR είναι ιδιαίτερα σημαντική στην περίπτωση της οστεοπόρωσης καθώς συμμετέχει με ποικίλους τρόπους στην διαμόρφωση των οστών. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού οφείλεται είτε σε ssbreaks είτε σε dsbreaks είτε ακόμα σε άλλες μορφές βλάβης που οδηγούν την κινητοποίηση παραγόντων όπως η κινάσες ATM και ATR (X. Wang & Li, 2007). Αυτές με την σειρά τους ενεργοποιούν άλλους παράγοντες όπως το c-Abl και το p53 που θα οδηγήσουν σε κυτταρικές καταστάσεις όπως η απόπτωση, η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιδιόρθωση κ.α. Ωστόσο τυχόν μεταλλάξεις στα γονίδια που απαρτίζουν το DDR έχουν συνδεθεί με νοσήματα που έχουν συσχετισθεί με αποτυχία στην ανάπτυξη όπως παραδείγματος χάρη η οστεοπόρωση (X. Wang & Li, 2007).

Σε πρώτη φάση, το c-Abl παίζει αρκετά αξιόλογο ρόλο στην διαμόρφωση και τη θετική ρύθμιση των οστών από τη στιγμή που ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα στον υαλώδη χόνδρο των ενηλίκων αλλά και στα οστά νεογέννητων ποντικών. Σε περίπτωση απώλειας του c-Abl, εμφανίζονται χαρακτηριστικά συμπτώματα της οστεοπόρωσης όπως μειωμένη οστική πυκνότητα, μειωμένος σχηματισμός των οστών λόγω μείωσης των οστεοβλαστών, μειωμένη μεταλλική πυκνότητα των οστών αλλά και δημιουργία θειικά φλοιώδη οστών. Ακόμα, στους οστεοβλάστες που απουσιάζει το c-Abl εμφανίζονται διαταραχές που σχετίζονται με την διαφοροποίηση τους λόγω απορρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα osterix αλλά και διαταραχές ως προς την ωρίμανση τους (X. Wang & Li, 2007).

Προκειμένου να ενεργοποιηθεί το c-Abl απαιτείται η προηγουμένως ενεργοποίηση της κινάσης ATM. Γενικότερα και οι δυο αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν θετικά τόσο την διαμόρφωση των οστών όσο την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών όμως η έλλειψη τους μπορεί να οδηγήσει σε οστεοπόρωση. Πιο συγκεκριμένα, σε ποντίκια που χαρακτηρίζονται από έλλειψη της ATM, παρόλο που ο αριθμός των οστεοβλαστών ήταν κανονικός, παρατηρήθηκε μειωμένη οστική μάζα η οποία συνοδευόταν από μειωμένο δείκτη σχηματισμού των οστών αλλά και μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών (X. Wang & Li, 2007). Η ATM έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα osterix που είναι αρμόδιος για την ωρίμανση των οστεοβλαστών. Βάση των παραπάνω αποδεικνύεται ότι η απουσία της ATM οδηγεί στην οστεοπόρωση και κατέχει θετικό ρόλο στην ρύθμιση του osterix (Rasheed, Wang, Niu, Yeh, & Li, 2006).

Εκτός από τους δυο παραπάνω παράγοντες που προαναφέρθηκαν, στην οστεοπόρωση συμμετέχει και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε νεογέννητα βρέθηκε ότι η μη έκφραση του p53 οδηγεί σε ήπιας μορφής σκελετικές διαταραχές όπως το μειωμένο μήκος των εμβρυονικών οστών. Αυτό ωστόσο μπορεί να οφείλεται στην καθυστερημένη ωρίμανση του αρθρικού χόνδρου. Επίσης, σε ποντίκια με έλλειψη του p53 ανιχνεύτηκε αρκετά μεγάλος όγκος των οστών αλλά και αυξημένη μεταλλική πυκνότητα των οστών (X. Wang & Li, 2007). Το γεγονός ότι η απώλεια της έκφρασης του p53 οδηγεί σε αυξημένο ποσοστό σχηματισμού των οστών συνοδεύεται από αυξημένο αριθμό οστεοβλαστών αλλά και αυξημένη διαφοροποίηση αντίστοιχα. Ακόμα, ανιχνεύτηκε ότι το p53 έχει την ικανότητα άμεσης αναστολής της δραστηριότητας του εκκινητή του μεταγραφικού παράγοντα osterix. Βάση των παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το p53 λειτουργεί σαν προστάτης της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών αλλά και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (X. Wang & Li, 2007).

Τέλος, πέρα από την ATM, πολύ σημαντικός είναι και ο ρόλος της κινάσης ATR στην οστεοπόρωση. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ενήλικα ποντίκια με αναστολή της έκφρασης της ATR βρέθηκε ότι εκτός από την διαταραχή της ομοιόστασης των οστών, παρατηρήθηκε φαινότυπος σχετιζόμενος με το γήρας συμπεριλαμβανομένων αυτών της οστεοπόρωσης. Υπομορφικές μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη κινάση ATR έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση του συνδρόμου Seckel που

χαρακτηρίζεται από σοβαρή οστεοπόρωση και αναπτυξιακά προβλήματα (Ruzankina et al., 2007).

Στους παράγοντες που οφείλονται για την αιτιοπαθολογία της οστεοπόρωσης ανήκει και ο τομέας της επιγενετικής μέσω των microRNAs. Η χρησιμότητα τους είναι αρκετά σπουδαία καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πιθανοί βιοδείκτες στην οστεοπόρωση μετά την εμμηνόπαυση. Συνήθως η παραγωγή τους πραγματοποιείται από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας που αποτελούν μια μορφή πρόδρομων οστεοκλαστών και είναι αρμόδια για την οστεοκλαστογένεση (Cao et al., 2014). Γενικότερα, έχουν το miR-21 που απορρυθμίζει τον παράγοντα PCD4 που συμμετέχει στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, το miR-155 που σχετίζεται με την μείωση της δραστηριότητας των οστεοκλαστών, το miR-146a που αποτελεί αναστολέα της οστεοκλαστογένεσης στα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας αλλά και το miR-148a που έχει την άκρως αντίθετη λειτουργία (Cao et al., 2014).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ανιχνεύτηκε ένα ακόμα microRNA, το miR-422a το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο MIR422A και βρέθηκε σε αρκετά υψηλά επίπεδα σε γυναίκες με χαμηλή οστική πυκνότητα (BMD). Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι τα αυξημένα του επίπεδα αναστέλλουν την δράση των ανασταλτικών για την οστεοκλαστογένεση παραγόντων οδηγώντας στην επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης αλλά και στη μείωση της οστικής πυκνότητας λόγω επαναρρόφηση των οστών (Cao et al., 2014). Κάποια πιθανά γονίδια που αποτελούν στόχο για το miR-422a και αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση είναι το CBL που αναστέλλει κυρίως τα αρχικά στάδια της οστεοκλαστογένεσης, το CD226 που ρυθμίζει αρνητικά τον σχηματισμό των οστεοκλαστών αλλά και τα PAG1 και TOB2. Ακόμα, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του miR-422a μπορεί να οδηγήσει στην μειωμένη έκφραση του γονιδίου IGF1 και σαν αποτέλεσμα επέρχεται η οστεοπόρωση και το χαμηλό BMD σε γυναίκες ύστερα από την εμμηνόπαυση (Cao et al., 2014).

Ένα ακόμη microRNA που ανιχνεύτηκε σαν πιθανός βιοδείκτης στα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα για την νόσο της οστεοπόρωσης που κάνει την εμφάνιση της μετά την εμμηνόπαυση είναι το miR-113. Στον ανθρώπινο οργανισμό ανιχνεύονται δυο διαφορετικά είδη miR-113, το miR-133a1 και το miR-133a2. Το συγκεκριμένο microRNA κωδικοποιείται από δυο διαφορετικά γονίδια, το MIR133A1 για το miR-133a1 και το MIR133A2 για το miR-133a2. Βρέθηκε λοιπόν ότι ο ρόλος του miR-113 στα οστά είναι η ρύθμιση της οστεοκλαστογένεσης μέσω της στόχευσης αλλά και ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου Runx2. Επίσης, τρία ακόμα

πιθανά γονίδια που αποτελούν στόχο του miR-113 και οδηγούν τελικά στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης είναι το CXCL11, CXCR3 και το SLC39A1 (Y. Wang et al., 2012).

Τέλος, έπειτα από μακροχρόνια έρευνα για πιθανώς εμπλεκόμενα microRNAs στην οστεοπόρωση που εκδηλώνεται μετά την εμμηνόπαυση ανιχνεύτηκε ένα επιπρόσθετο microRNA, το miR-210. Βρέθηκε λοιπόν ότι η έκφραση του miR-210 είναι αρκετά αυξημένη σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών και σαν αποτέλεσμα επάγει την έκφραση του παράγοντα VEGF. Επίσης, η έκφραση του miR-210 αναστέλλει την έκφραση του PPAR γ ενώ αντίθετα ενισχύει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα osterix οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι επάγεται η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (X.-D. Liu, Cai, Liu, Zhang, & Yang, 2015).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, δίχως τον εξισορροπημένο και ορθά εκτελεσμένο μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες του γενετικού υλικού (DDR) θα ήταν ανύπαρκτες οι βασικότερες έννοιες για την επιβίωση του κυττάρου όπως γενετική σταθερότητα, σωστή επιδιόρθωση και πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού, αναλλοίωτη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας κ.α. Παράγοντες όπως το γήρας, οι μεταλλάξεις στο DNA, οι περιβαλλοντικές επιρροές, οι καθημερινές συνήθειες κ.α. είναι ικανοί να διαταράξουν την ισορροπία αυτού του μηχανισμού και να επιφέρουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών, χρωμοσωμικών ασταθειών και κατ'επέκταση να οδηγήσουν στην κυτταρική γήρανση.

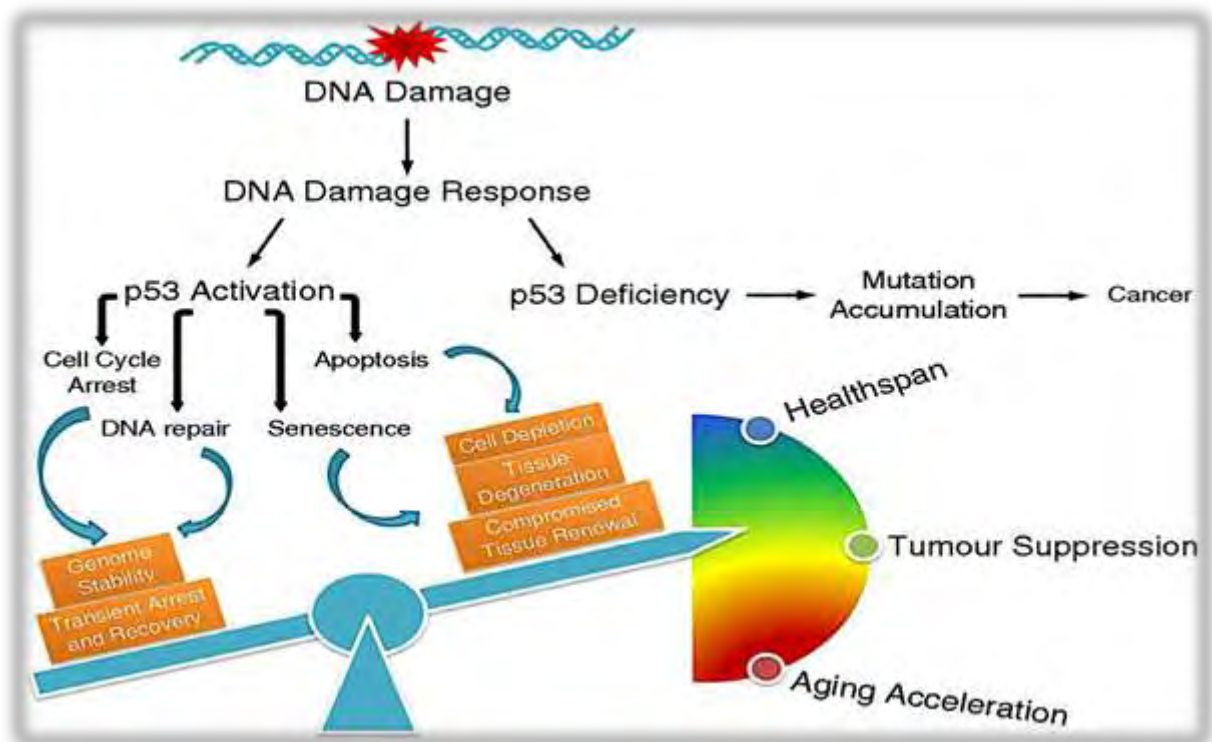
Πρωταγωνιστικό ρόλο στο μηχανισμό DDR κατέχει το p53 καθορίζοντας αν ο οργανισμός θα παραμείνει υγιής, θα στραφεί στην ογκογένεση ή θα παραδοθεί στο γήρας. Εκτός από την βασική ιδιότητα του ως το πιο σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο στον οργανισμό, αποτελεί τον βασικό ενορχηστρωτή των περιεχομένων του μηχανισμού DDR για την καταπολέμηση γενετικών βλαβών που προωθούν το γήρας του οργανισμού. Η ενεργοποίηση του στο μηχανισμό DDR καθορίζει την κυτταρική πορεία σε κατευθύνσεις όπως η παύση του κυτταρικού κύκλου και η ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου, η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, η απόπτωση του κυττάρου ή ακόμα η κυτταρική γήρανση. Στις δυο πρώτες περιπτώσεις εξασφαλίζονται έννοιες όπως η σταθερότητα του γονιδιώματος ενώ αντίθετα στις δυο υπόλοιπες περιπτώσεις επάγεται ο εκφυλισμός των ιστών αλλά και η κυτταρική εξάντληση.

Ακόμα, ο μηχανισμός DDR είναι τόσο σπουδαίος για τον οργανισμό καθώς προστατεύει από την εκδήλωση ασθενειών του γήρατος στο νευρικό και μυοσκελετικό σύστημα. Τυχόν δυσλειτουργίες ή βλάβες σε όλο το μηχανισμό ή σε κάποιο από τα περιεχόμενα του μπορεί να οδηγήσουν σε κοινές παθήσεις που εξαρτώνται από το γήρας όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοπόρωση κ.α. Συνεπώς, μεταξύ του μηχανισμού DDR αλλά και των ηλικιοεξαρτώμενων παθήσεων παρατηρείται μια σχέση άμεσης εξάρτησης και αλληλεπίδρασης.

Εν κατακλείδι, για όλους τους παραπάνω λόγους ο κλάδος της γενετικής κατέχει τόσο μεγάλη σημαντικότητα και αναγνώριση και συνεχίζει να εξελίσσεται διαρκώς με ραγδαίους ρυθμούς. Βασικός στόχος είναι η βαθύτερη αναζήτηση του

τρόπου εμπλοκής και αποκατάστασης του μηχανισμού DDR σε ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις. Κάποια από τα βασικότερα αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τη γήρανση και το μηχανισμό DDR είναι γιατί τα γερασμένα κύτταρα αυξάνουν συναρτήσε του χρόνου και συσσωρεύονται στους ιστούς προκαλώντας σοβαρές παθήσεις, είναι άραγε όντως υπεύθυνη η κυτταρική γήρανση για την επαγωγή του γήρατος στον οργανισμό, σε τι κατάσταση θα οδηγηθεί ο οργανισμός αν απομακρυνθούν τα γερασμένα κύτταρα από αυτόν, πως θα μπορούσε να γίνει έλεγχος της δραστηριότητας των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο DDR κτλ.

Αναμφίβολα, στις επόμενες δεκαετίες προβλέπεται επέκταση των γνώσεων μας σχετικά με τους μηχανισμούς, τις λειτουργίες και τα χαρακτηριστικά της γήρανσης αλλά και πληροφοριοδότηση σχετικά με το πως τα νέα αυτά δεδομένα θα μπορούσαν να συμβάλουν στην καταπολέμηση των ηλικιοεξαρτώμενων νοσημάτων.



- Το p53 ως ο βασικός συντονιστής του μηχανισμού DDR στον ανθρώπινο οργανισμό

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ammari, M., Jorgensen, C., & Apparailly, F. (2013). Impact of microRNAs on the understanding and treatment of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(2), 225–233. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835d8385>
2. Baretić, D., & Williams, R. L. (2014). PIKKs - the solenoid nest where partners and kinases meet. *Current Opinion in Structural Biology*, 29, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.11.003>
3. Barnum, K. J., & O’Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1170, pp. 29–40). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
4. Barzilai, A. (2007). The Contribution of the DNA Damage Response to Neuronal Viability. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(2), 211–218. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.211>
5. Barzilai, A. (2010). DNA damage, neuronal and glial cell death and neurodegeneration. *Apoptosis*, 15(11), 1371–1381. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0501-0>
6. Bhusate, L. L., Herbert, K. E., Scott, D. L., & Perrett, D. (1992). Increased DNA strand breaks in mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 51(1), 8–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1540043>
7. Biegging, K. T., & Attardi, L. D. (2012). Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in Cell Biology*, 22(2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.10.006>
8. Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
9. Boots, A. M. H., Maier, A. B., Stinissen, P., Masson, P., Lories, R. J., & De Keyser, F. (2013). The influence of ageing on the development and management of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 9(10), 604–613. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.92>
10. Branzei, D., & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>

11. Cao, Z., Moore, B. T., Wang, Y., Peng, X.-H., Lappe, J. M., Recker, R. R., & Xiao, P. (2014). MiR-422a as a Potential Cellular MicroRNA Biomarker for Postmenopausal Osteoporosis. *PLoS ONE*, 9(5), e97098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097098>
12. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
13. Chen, Q., Liu, K., Robinson, A. R., Clauson, C. L., Blair, H. C., Robbins, P. D., ... Ouyang, H. (2013). DNA damage drives accelerated bone aging via an NF- κ B-dependent mechanism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(5), 1214–1228. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1851>
14. Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
15. Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
16. Coppedè, F., & Migliore, L. (2010). DNA Repair in Premature Aging Disorders and Neurodegeneration. *Current Aging Science*, 3, 3–19. <https://doi.org/10.2174/1874609811003010003>
17. Cornelius, C., Koverech, G., Crupi, R., Di Paola, R., Koverech, A., Lodato, F., ... Calabrese, V. (2014). Osteoporosis and alzheimer pathology: Role of cellular stress response and hormetic redox signaling in aging and bone remodeling. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 120. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00120>
18. Czarny, P., Pawlowska, E., Bialkowska-Warzecha, J., Kaarniranta, K., & Blasiak, J. (2015). Autophagy in DNA damage response. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms16022641>
19. Dubois, J. C., Yates, M., Gaudreau-Lapierre, A., Clément, G., Cappadocia, L., Gaudreau, L., ... Maréchal, A. (2017). A phosphorylation-and-ubiquitylation circuitry driving ATR activation and homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 45(15), 8859–8872. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx571>
20. Dupuy, A., & Sarasin, A. (2015). DNA damage and gene therapy of xeroderma pigmentosum, a human DNA repair-deficient disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 776, 2–8.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.08.007>

21. Farg, M. A., Konopka, A., Soo, K. Y., Ito, D., & Atkin, J. D. (2017). The DNA damage response (DDR) is induced by the C9orf72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 26(15), 2882–2896. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx170>
22. Firestein, G. S. (2014). The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 16(3), 114. <https://doi.org/10.1186/ar4593>
23. Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2011). DNA Damage Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a000745–a000745. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>
24. Giunta, S., Belotserkovskaya, R., & Jackson, S. P. (2010). DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 190(2), 197–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911156>
25. Glant, T. T., Mikecz, K., & Rauch, T. A. (2014). Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Medicine*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-35>
26. Goldring, M. B., & Marcu, K. B. (2012). Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends in Molecular Medicine*, 18(2), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.11.005>
27. Group, T. I. N. B. S. S. (2000). Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Archives of Disease in Childhood*, 82(5), 400–406. <https://doi.org/10.1136/ADC.82.5.400>
28. Hajizadeh, S., DeGroot, J., TeKoppele, J. M., Tarkowski, A., & Collins, L. V. (2003). Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 5(5), R234. <https://doi.org/10.1186/ar787>
29. Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell*, 28(5), 739–745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
30. Hiom, K. (2005). DNA repair: How to PIKK a partner. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.012>
31. Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485.

- <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
32. Hu, H., & Gatti, R. A. (2011). MicroRNAs: New players in the DNA damage response. *Journal of Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq042>
 33. Huen, M. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Research*, *18*(1), 8–16. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.109>
 34. Iannello, A., & Raulet, D. H. (2014). Immunosurveillance of senescent cancer cells by natural killer cells. *OncoImmunology*, *3*(2), e27616. <https://doi.org/10.4161/onci.27616>
 35. Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P., & Tsezou, A. (2008). Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks. *PLoS ONE*, *3*(11), e3740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003740>
 36. Iyama, T., & Wilson, D. M. (2016). Elements That Regulate the DNA Damage Response of Proteins Defective in Cockayne Syndrome. *Journal of Molecular Biology*, *428*(1), 62–78. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.020>
 37. Jackson, S. P., & Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.The
 38. Jeon, G. S., Kim, K. Y., Hwang, Y. J., Jung, M.-K., An, S., Ouchi, M., ... Ryu, H. (2012). Deregulation of BRCA1 Leads to Impaired Spatiotemporal Dynamics of γ -H2AX and DNA Damage Responses in Huntington's Disease. *Molecular Neurobiology*, *45*(3), 550–563. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8274-9>
 39. Jeppesen, D. K., Bohr, V. A., & Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, *94*(2), 166–200. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.013>
 40. Kaina, B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 66, pp. 1547–1554). [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00510-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00510-0)
 41. Kanungo, J. (2017). DNA-PK and P38 MAPK: A Kinase Collusion in Alzheimer's Disease? *Brain Disorders & Therapy*, *06*(02). <https://doi.org/10.4172/2168-975X.1000232>

42. Karikkineth, A. C., Scheibye-Knudsen, M., Fivenson, E., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2017). Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Ageing Research Reviews*, 33, 3–17. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2016.08.002>
43. Kass, E. M., & Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters*, 584(17), 3703–3708. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.07.057>
44. Katsel, P., Tan, W., Fam, P., Purohit, D. P., & Haroutunian, V. (2013). Cycle Checkpoint Abnormalities during Dementia: A Plausible Association with the Loss of Protection against Oxidative Stress in Alzheimer’s Disease. *PLoS ONE*, 8(7), e68361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068361>
45. Kim, H.-N., Chang, J., Shao, L., Han, L., Iyer, S., Manolagas, S. C., ... Almeida, M. (2017). DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing *Osx1* may cause their decrease with age. *Aging Cell*, 16(4), 693–703. <https://doi.org/10.1111/accel.12597>
46. Klein, K., Ospelt, C., & Gay, S. (2012). Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 14(6), 227. <https://doi.org/10.1186/ar4074>
47. Kostopoulou, F., Malizos, K. N., Papathanasiou, I., & Tsezou, A. (2015). MicroRNA-33a regulates cholesterol synthesis and cholesterol efflux-related genes in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0556-y>
48. Kwiatkowski, D., Czarny, P., Toma, M., Jurkowska, N., Sliwinska, A., Drzewoski, J., ... Sliwinski, T. (2016). Associations between DNA Damage, DNA Base Excision Repair Gene Variability and Alzheimer’s Disease Risk. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 41(3–4), 152–171. <https://doi.org/10.1159/000443953>
49. Lee, K.-A., Bang, S.-Y., Park, B. L., Kim, J.-H., Shin, H. D., & Bae, S.-C. (2012). Lack of association between Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) polymorphisms and rheumatoid arthritis in a Korean population. *Rheumatology International*, 32(1), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1589-9>
50. Leyns, L., & Gonzalez, L. (2012). Genomic Integrity of Mouse Embryonic Stem Cells. In *Embryogenesis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/37327>
51. Li, Y., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2018). DNA damage, metabolism and

- aging in pro-inflammatory T cells. *Experimental Gerontology*, *105*, 118–127.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.027>
52. Li, Y., Shen, Y., Hohensinner, P., Ju, J., Wen, Z., Goodman, S. B., ... Weyand, C. M. (2016). Deficient Activity of the Nuclease MRE11A Induces T Cell Aging and Promotes Arthritogenic Effector Functions in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, *45*(4), 903–916.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.013>
53. Li, Z., Pearlman, A. H., & Hsieh, P. (2015). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair*, *38*, 94–101.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.019>
54. Lidzbarsky, G., Gutman, D., Shekhidem, H. A., Sharvit, L., & Atzmon, G. (2018). Genomic Instabilities, Cellular Senescence, and Aging: In Vitro, In Vivo and Aging-Like Human Syndromes. *Frontiers in Medicine*, *5*, 104.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00104>
55. Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, *79*(1), 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
56. Liu, B., K.H Yip, R., & Zhou, Z. (2012). Chromatin Remodeling, DNA Damage Repair and Aging. *Current Genomics*, *13*(7), 533–547.
<https://doi.org/10.2174/138920212803251373>
57. Liu, X.-D., Cai, F., Liu, L., Zhang, Y., & Yang, A.-L. (2015). microRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation. *Biological Chemistry*, *396*(4), 339–347. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0268>
58. Liu, Y., Li, Y., & Lu, X. (2016). Regulators in the DNA damage response. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.018>
59. Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L. H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034>
60. Maiuri, T., Mocle, A. J., Hung, C. L., Xia, J., van Roon-Mom, W. M. C., & Truant, R. (2016). Huntingtin is a scaffolding protein in the ATM oxidative DNA damage response complex. *Human Molecular Genetics*, *26*(2), ddw395.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw395>
61. Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR

- kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
62. Marinoglou, K. (2012). The role of the DNA damage response kinase ataxia telangiectasia mutated in neuroprotection. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(4), 469–480. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239948>
63. Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A., & Fatima, N. (2016). Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLOS ONE*, 11(4), e0152925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152925>
64. Maynard, S., Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2015). DNA damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025130>
65. Merideth, M. A., Gordon, L. B., Clauss, S., Sachdev, V., Smith, A. C. M., Perry, M. B., ... Introne, W. J. (2008). Phenotype and Course of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706898>
66. Milanese, C., Cerri, S., Ulusoy, A., Gornati, S. V., Plat, A., Gabriels, S., ... Mastroberardino, P. G. (n.d.). Activation of the DNA damage response in vivo in synucleinopathy models of Parkinson’s disease. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0848-7>
67. Mohamed, R. H., El-Shal, A. S., El-Shahawy, E. E., & Abdel Galil, S. M. (2016). Association of XRCC1 and OGG1 DNA repair gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian patients. *Gene*, 578(1), 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.021>
68. Mordes, D. A., & Cortez, D. (2008). Activation of ATR and related PIKKs. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6689>
69. Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., & Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>
70. Musich, P. R., & Zou, Y. (2011). DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Biochemical Society*

- Transactions*, 39(6), 1764–1769. <https://doi.org/10.1042/BST20110687>
71. Niccoli, T., & Partridge, L. Ageing as a risk factor for disease, 22 *Current Biology* § (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>
 72. Norbury, C. J., & Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207532>
 73. Ogawa, M., Matsuda, T., Ogata, A., Hamasaki, T., Kumanogoh, A., Toyofuku, T., & Tanaka, T. (2013). DNA Damage in Rheumatoid Arthritis: An Age-Dependent Increase in the Lipid Peroxidation-Derived DNA Adduct, Heptanone-Etheno-2'-Deoxycytidine. *Autoimmune Diseases*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/183487>
 74. Ogino, M., Ichimura, M., Nakano, N., Minami, A., Kitagishi, Y., & Matsuda, S. (2016). Roles of PTEN with DNA Repair in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 954. <https://doi.org/10.3390/ijms17060954>
 75. Partridge, L. (2014). Intervening in ageing to prevent the diseases of ageing. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(11), 555–557. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.08.003>
 76. Pascucci, B., Fragale, A., Marabitti, V., Leuzzi, G., Calcagnile, A. S., Parlanti, E., ... D'Errico, M. (2018). CSA and CSB play a role in the response to DNA breaks. *Oncotarget*, 9(14), 11581–11591. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24342>
 77. Rasheed, N., Wang, X., Niu, Q.-T., Yeh, J., & Li, B. (2006). Atm-deficient mice: an osteoporosis model with defective osteoblast differentiation and increased osteoclastogenesis. *Human Molecular Genetics*, 15(12), 1938–1948. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl116>
 78. Reynolds, J. J., & Stewart, G. S. (2013). A nervous predisposition to unrepaired DNA double strand breaks. *DNA Repair*. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.011>
 79. Roos, W. P., & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>
 80. Roos, W. P., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>
 81. Rose, J., Söder, S., Skhirtladze, C., Schmitz, N., Gebhard, P. M., Sesselmann, S.,

- & Aigner, T. (2012). DNA damage, discoordinated gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(9), 1020–1028. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.05.009>
82. Ruzankina, Y., Pinzon-Guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., ... Brown, E. J. (2007). Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell*, 1(1), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.03.002>
83. Santiago, K. M., França de Nóbrega, A., Rocha, R. M., Rogatto, S. R., Achatz, M. I., Santiago, K. M., ... Achatz, M. I. (2015). Xeroderma Pigmentosum: Low Prevalence of Germline XPA Mutations in a Brazilian XP Population. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 8988–8996. <https://doi.org/10.3390/ijms16048988>
84. Schreiber, V., Dantzer, F., Amé, J. C., & De Murcia, G. (2006, July). Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1963>
85. Sepe, S., Milanese, C., Gabriels, S., Derks, K. W. J., Payan-Gomez, C., van IJcken, W. F. J., ... Mastroberardino, P. G. (2016). Inefficient DNA Repair Is an Aging-Related Modifier of Parkinson's Disease. *Cell Reports*, 15(9), 1866–1875. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.071>
86. Serrano, M. A., Li, Z., Dangeti, M., Musich, P. R., Patrick, S., Roginskaya, M., ... Zou, Y. (2013). DNA-PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53-RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair. *Oncogene*, 32(19), 2452–2462. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.257>
87. Shackelford, D. A. (2006). DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(4), 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.009>
88. Shao, L., Fujii, H., Colmegna, I., Oishi, H., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2009). Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(6), 1435–1449. <https://doi.org/10.1084/jem.20082251>
89. Shendure, J., & Akey, J. M. (2015). The origins, determinants, and consequences of human mutations. *Science*, 349(6255), 1478–1483. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9119>
90. Simpson, J. E., Ince, P. G., Matthews, F. E., Shaw, P. J., Heath, P. R., Brayne, C.,

- ... MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. (2015). A neuronal DNA damage response is detected at the earliest stages of Alzheimer's neuropathology and correlates with cognitive impairment in the Medical Research Council's Cognitive Function and Ageing Study ageing brain cohort. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(4), 483–496. <https://doi.org/10.1111/nan.12202>
91. Sirbu, B. M., & Cortez, D. (2013). DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012724>
92. Stagni, V., Cirotti, C., & Barilà, D. (2018). Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase in the Control of Oxidative Stress, Mitochondria, and Autophagy in Cancer: A Maestro With a Large Orchestra. *Frontiers in Oncology*, 8, 73. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00073>
93. Sun, Y., Zhou, L., Lv, D., Liu, H., He, T., & Wang, X. (2015). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition prevents interleukin-1 β -induced inflammation in human osteoarthritic chondrocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(6), 422–430. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv033>
94. Takayama, K., Kawakami, Y., Lee, S., Greco, N., Lavasani, M., Mifune, Y., ... Huard, J. (2014). Involvement of ERCC1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of apoptosis and cellular senescence. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(10), 1326–1332. <https://doi.org/10.1002/jor.22656>
95. Themeli, M., & Spyridonidis, A. (2012). DNA Damage and Repair in Epithelium after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 15813–15825. <https://doi.org/10.3390/ijms131215813>
96. Toh, W. S., Brittberg, M., Farr, J., Foldager, C. B., Gomoll, A. H., Hui, J. H. P., ... Spector, M. (2016). Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthopaedica*, 87(sup363), 6–14. <https://doi.org/10.1080/17453674.2016.1235087>
97. Trachana, V., Ntoumou, E., Anastasopoulou, L., & Tsezou, A. (2018). Studying microRNAs in osteoarthritis: Critical overview of different analytical approaches. *Mechanisms of Ageing and Development*, 171, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.02.006>
98. Ummarino, D. (2016). DNA repair links T-cell ageing to inflammation. *Nature*

- Reviews Rheumatology*, 12(12), 694–694.
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.181>
99. Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature13193>
100. Wang, W.-Y., Pan, L., Su, S. C., Quinn, E. J., Sasaki, M., Jimenez, J. C., ... Tsai, L.-H. (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nature Neuroscience*, 16(10), 1383–1391.
<https://doi.org/10.1038/nn.3514>
101. Wang, X., & Li, B. (2007). Genetic studies of bone diseases: evidence for involvement of DNA damage response proteins in bone remodeling. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 3(4), 217–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675047>
102. Wang, Y., Li, L., Moore, B. T., Peng, X.-H., Fang, X., Lappe, J. M., ... Xiao, P. (2012). MiR-133a in Human Circulating Monocytes: A Potential Biomarker Associated with Postmenopausal Osteoporosis. *PLoS ONE*, 7(4), e34641.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034641>
103. Weyand, C. M., Shen, Y., & Goronzy, J. J. (2018). Redox-sensitive signaling in inflammatory T cells and in autoimmune disease. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.004>
104. Weyand, C. M., Yang, Z., & Goronzy, J. J. (2014). T-cell aging in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 26(1), 93–100.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000011>
105. Williams, A. B., & Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>
106. Yosunkaya, E., Karakurt, F., Cetin, E., Ozgonenel, L., Onaran, I., Batar, B., ... Sultuybek, G. K. (2012). Rheumatoid arthritis risk associates with DNA repair gene XRCC1 Arg399Gln polymorphism in Turkish patients. *Rheumatology International*, 32(5), 1265–1269. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1725-6>
107. Yuan, F.-L., Li, X., Xu, R.-S., Jiang, D.-L., & Zhou, X.-G. (2014). DNA Methylation: Roles in Rheumatoid Arthritis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 77–82. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9913-8>
108. Yui, N., Yoshioka, H., Fujiya, H., Musha, H., Beppu, M., Karasawa, R., & Yudoh, K. (2014). The DNA Repair Enzyme Apurinic/Apyrimidinic

Endonuclease (Apex Nuclease) 2 Has the Potential to Protect against Down-Regulation of Chondrocyte Activity in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 14921–14934. <https://doi.org/10.3390/ijms150914921>