



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
χρόνια δημιουργίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΗΡΑΝΣΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ: ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΡΕΠΠΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ..... (Επιβλέπουσα)  
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ ..... (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)  
ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ..... (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

ΛΑΡΙΣΑ, ΕΤΟΣ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

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

**AGING STEM CELLS: GENETIC AND EPIGENETIC FACTORS**

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία θα περιγραφεί αναλυτικά η γήρανση των βλαστικών κυττάρων καθώς και οι επιγενετικοί και γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτή. Πιο συγκεκριμένα στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας θα αναφερθούν οι ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων από τις οποίες οι δυο κύριες είναι η αυτοανανέωση και η διαφοροποίησή τους. Στην συνέχεια θα αναλυθούν οι τύποι των βλαστοκυττάρων που συναντώνται τόσο στην εμβρυική όσο και στην ενήλικη ζωή. Η αναφορά σε αυτά θα μας δώσει την δυνατότητα να κατανοήσουμε τα βλαστικά κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό ώστε να γίνει καλύτερα αντιληπτό το φαινόμενο της γήρανσης τους. Στα επόμενα κεφάλαια της μελέτης παρουσιάζεται η γήρανση καθώς οι επιπτώσεις της στα διάφορα είδη βλαστοκυττάρων. Επίσης αναφέρονται οι γενετικοί παράγοντες που ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για το φαινόμενο αυτό όπως είναι η βράχυνση των τελομερών, οι μεταβολές στο μεταβολισμό, οι βλάβες του γενετικού υλικού και βλάβες στην πρωτεόσταση. Επιπλέον γίνεται περιγραφή των μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών που διαταράσσονται από τους γενετικούς παράγοντες αυτούς και επομένως οδηγούν τα βλαστικά κύτταρα και κατ' επέκταση ολόκληρο τον οργανισμό στην γήρανση. Επιπροσθέτως ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση είναι η επιγενετική και αλλαγές σε αυτή, και άρα θα αναλυθούν διαφοροποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών και τα μη κωδικά μόρια RNA, τα ονομαζόμενα microRNA, που περιγράφονται στα τελευταία κεφάλαια της παρούσας εργασίας. Τέλος αφού έχει γίνει κατανοητό το πως λειτουργούν τα βλαστοκύτταρα, πόσο σημαντικά είναι για τον οργανισμό καθώς και τι συμβάλλει στην γήρανσή τους θα γίνει αναφορά σε πιθανές μεθόδους που εφαρμόζονται ή θα μπορούσαν να εφαρμοστούν μελλοντικά με σκοπό την καταστολή της δυσλειτουργίας και της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων και επομένως την ανανέωση και την παράταση του νεανικού φαινότυπου του οργανισμού.

## **Abstract**

In the present study, the aging of the stem cells as well as the epigenetic and genetic factors contributing to it will be described. More specifically, in the first chapter of the paper we will mention the properties of the stem cells from which the two main ones are self-renewal and differentiation. It will then analyze the types of stem cells found in both embryonic and adult life. Reference to these will give us the ability to understand the bulk cells to a greater extent in order to better understand their aging phenomenon. The next chapters of the study show aging as well as its effects on the different stem cell species. There are also referals to genetic factors that are largely responsible for this phenomenon such as telomere destruction, cell aging, metabolism, genetic damage, and proteasis. In addition, there's a description of the pathways and cellular processes that are disrupted by these genetic factors and therefore leads the stem cells and extends the whole organism to aging. In addition, another very important part of aging stem cells are epigenetic factors such as DNA methylation, histone modifications and non-coding RNA molecules called microRNA as described in the last chapters of this paper. Finally, since it is understood how stem cells function and how important they are to the organism as well as what contributes to their aging there is going to be a reference to possible methods that are applied or could be applied in the future to suppress stem cell dysfunction and aging and therefore the renewal and prolongation of the juvenile phenotype of the organism.

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή .....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	8
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων .....	8
1.2 Φάση G <sub>0</sub> Βλαστικών Κυττάρων .....	9
1.3 Δραστηκότητα βλαστικών κυττάρων .....	11
1.4 Βασικοί τύποι βλαστικών κυττάρων .....	13
1.5 Άλλες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων .....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	21
2.1 Γήρανση βλαστοκυττάρων .....	21
2.2 Γονιμοποίηση και γήρανση .....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	27
3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	27
3.2 Οξειδωτικό στρες και γήρανση βλαστοκυττάρων .....	29
3.3 Αυτοφαγία και γήρανση βλαστοκυττάρων .....	33
3.4 Βλάβες στο γενετικό υλικό και γήρανση βλαστοκυττάρων .....	38
3.5 Φάση ηρεμίας και γήρανση .....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....	42
4.1 Επιγενετικοί παράγοντες .....	42
4.2 Μεθυλίωση DNA .....	44
4.3 Τροποποίηση Ιστονών .....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....	62
5.1 Βιογένεση των microRNAs και ρύθμιση της λειτουργίας των βλαστικών κύτταρων .....	62
5.2 MicroRNAs και γήρανση βλαστικών κυττάρων .....	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	76

## Εισαγωγή

Τα βλαστικά κύτταρα τα τελευταία χρόνια μονοπωλούν το ενδιαφέρον περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο πεδίο στη βιολογία. Η κατάσταση αυτή επικρατεί διότι τα βλαστικά κύτταρα διαθέτουν τις ιδιότητες της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης που τα τοποθετούν στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος διότι θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ανεύρεση θεραπειών για ασθένειες νευροεκφυλιστικής φύσεως, ενώ σημαντική θεωρείται και η εφαρμογή τους στην αναγεννητική ιατρική. Ταυτόχρονα η κατανόηση των ιδιοτήτων τους συμβάλει και στην ανακάλυψη των μηχανισμών του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα το 1988 στη Γαλλία έγινε η πρώτη μεταμόσχευση αίματος και εισήχθησαν σε ένα παιδί πέντε ετών, που έπασχε από αναιμία. Το ομφαλοπλακουντικό αίμα από το οποίο απομονώθηκαν τα βλαστικά κύτταρα άνηκε στην αδερφή του πεντάχρονου ασθενή. Επίσης 1989 πραγματοποιήθηκε με επιτυχία μια θεραπεία για την μυελογενή λευχαιμία με την χρήση βλαστικών κυττάρων. Επι προσθέτως το 1998 έγινε η πρώτη αυτόλογη μεταμόσχευση σε παιδί που είχε κακοήγη όγκο στο νευρικό σύστημα.

Επιπλέον, στην παρούσα εργασία θα διερευνηθεί και θα αναλυθεί το φαινόμενο της γήρανσης των βλαστοκυττάρων καθώς και οι παράγοντες που συμβάλουν σε αυτή. Η γήρανση των βλαστικών κυττάρων είναι η κατάσταση κατά την οποία τα βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν εξασθενημένη λειτουργία τόσο σε επίπεδο πολλαπλασιασμού όσο και σε επίπεδο διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται ανικανότητα διατήρησης της ομοιόστασης των ιστών και μη αποτελεσματική επαναφορά τους έπειτα από στρες ή τραυματισμό. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά την γήρανση των βλαστοκυττάρων σχετίζονται με τον φαινότυπο της γήρανσης του οργανισμού <sup>1</sup> Γιαυτό ακριβώς τον λόγο η κατανόηση της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων είναι απαραίτητη για να κατανοήσουμε τη γήρανση σε επίπεδο οργανισμού.

Στο φαινόμενο της γήρανσης των βλαστοκυττάρων συμβάλουν γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες. Κάποιοι από τους γενετικούς παράγοντες αυτούς είναι, η

απώλεια της πολικότητας, η συσσώρευση βλαβών στο DNA, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και του μεταβολισμού καθώς και η μείωση του μήκους των τελομερών. Από την άλλη, οι κύριες επιγενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στα βλαστοκύτταρα με το πέρασμα του χρόνου και ωθούν τα κύτταρα αυτά στην γήρανση είναι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών όπως η ακετυλίωση και η μεθυλίωση καθώς και η επίδραση κάποιων microRNAs που εμπλέκονται στην τροποποίηση της μεταγραφής αρκετών γονιδίων.<sup>2,3,4</sup>

Στα κεφάλαια που θα ακολουθήσουν, θα αναφερθούμε αναλυτικά τόσο στα χαρακτηριστικά των βλαστοκυττάρων και στις ιδιότητές τους αλλά και στο φαινόμενο της γήρανσης των βλαστοκυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των γενετικών και επιγενετικών παραγόντων που συμβάλουν σε αυτή.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων

Τα βλαστικά κύτταρα είναι κύτταρα που βρίσκονται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα είναι, η ικανότητα τους για ανανέωση και η διαφοροποίηση τους σε εξειδικευμένους τύπους. Πιο αναλυτικά η αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται μέσω πολλών κύκλων κυτταρικής διαίρεσης, διατηρώντας όμως παράλληλα την αδιαφοροποίητη κατάστασή τους. Η καταστασή τους αυτή σχετίζεται με την πλαστικότητα τους και την μη λειτουργική εξειδίκευσή τους.<sup>5</sup> Από την άλλη η ικανότητα που διαθέτουν τα βλαστοκύτταρα να διαφοροποιούνται σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων, απαιτεί να είναι είτε παντοδύναμα είτε πολυδύναμα, δηλαδή, να είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε τύπο ώριμων κυττάρων.

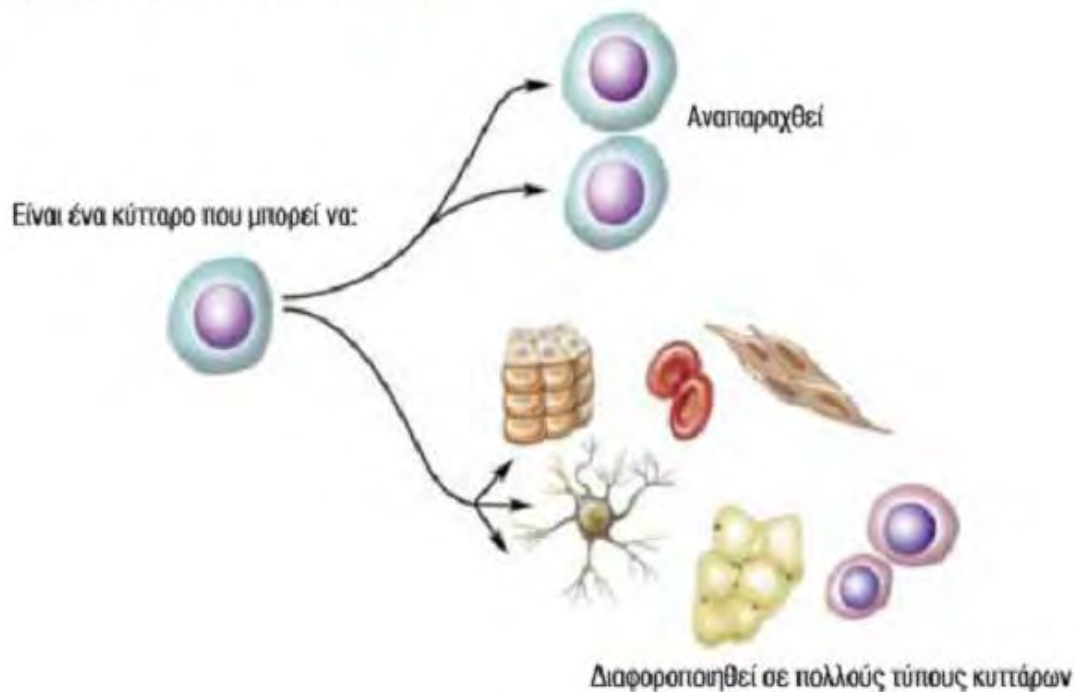
Τα βλαστικά κύτταρα τα συναντάμε σε όλα τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής. Η ηλικία του οργανισμού από τον οποίο απομονώνονται είναι αυτή που καθορίζει τις ιδιότητές τους. Σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης η δυνατότητα διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων προς τους διάφορους κυτταρικούς τύπους είναι αρκετά μεγάλη σε σχέση με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα. Αυτό βέβαια τείνει να ανατραπεί από έρευνες των τελευταίων ετών που αποδεικνύουν μέσω πειραματικών δεδομένων ότι τα βλαστοκύτταρα ενηλίκων ενός συγκεκριμένου ιστού, έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα άλλου ιστού.

Όσο αφορά τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων, πραγματοποιείται με δύο διαδικασίες. Αυτές είναι, η υποχρεωτική ασύμμετρη αναπαραγωγή και η στοχαστική διαφοροποίηση. Η ασύμμετρη αναπαραγωγή σχετίζεται με την



διαδικασία κατά την οποία το βλαστοκύτταρο χωρίζεται σε ένα πανομοιότυπο με το αρχικό βλαστικό κύτταρο και σε ένα άλλο διαφοροποιημένο κύτταρο. Από την άλλη, η στοχαστική διαφοροποίηση είναι η κατάσταση κατά την οποία το βλαστοκύτταρο αναπτύσσεται σε δυο διαφοροποιημένα κύτταρα ενώ ένα άλλο βλαστικό κύτταρο διαιρείται μέσω μίτωσης σε δυο πανομοιότυπα με το αρχικό βλαστικά κύτταρα.<sup>6</sup>

### Τι είναι ένα βλαστοκύτταρο;



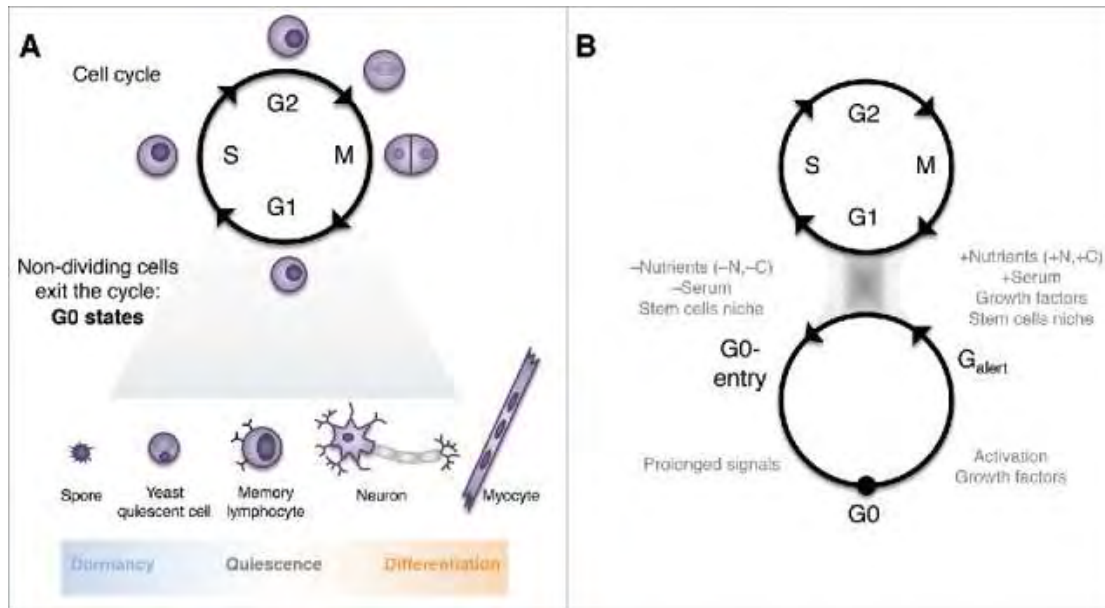
[www.pemptousia.gr](http://www.pemptousia.gr)

Εικόνα 1: Σχηματική παρουσίαση των δυο ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων, οι οποίες είναι η αυτοανανέωση και η διαφοροποίηση.

## 1.2 Φάση G0 Βλαστικών Κυττάρων

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις φάσεις: οι οποίες είναι : η Φάση G1 κατά την οποία το κύτταρο υπόκειται σε διεργασίες ώστε να προετοιμαστεί για την είσοδό του στην φάση S, φάση S είναι η φάση κατά την οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA, η φάση G2 όπου το γενετικό υλικό έχει αντιγραφεί και προετοιμάζεται για την είσοδό του στην επόμενη φάση που είναι η μίτωση, η φάση M όπου το διπλασιασμένο DNA συμπυκνώνεται και δημιουργούνται τα χρωμοσώματα που αποτελούνται από δυο αδερφές χρωματίδες το καθένα. Κατά την διάρκεια της μίτωσης οι αδερφές χρωματίδες διαχωρίζονται και τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν διαθέτουν το καθένα πλήρες αντίγραφο γενετικού υλικού του αρχικού κυττάρου.

Εκτός από τις φάσεις που αναφέρθηκαν ο κυτταρικός κύκλος διαθέτει μια ακόμα φάση που ονομάζεται G0 ή αλλιώς φάση ηρεμίας (quiescence). Τα κύτταρα δηλαδή τα οποία προκύπτουν από την μίτωση έχουν την δυνατότητα αντί να εισέλθουν στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου να εισαχθούν στην φάση G0. Η φάση αυτή του κυτταρικού κύκλου συμβάλλει στον να μην διαφοροποιούνται πρόωρα τα ενήλικα βλαστοκύτταρα αλλά ένας αριθμός τους να παραμένει αδιαφοροποίητος διατηρώντας κατά αυτόν τον τρόπο την πολυδυναμικότητά τους. Κατά την διάρκεια της φάσης ηρεμίας τα κύτταρα δεν διαιρούνται αλλά βρίσκονται σε ετοιμότητα για ερεθίσματα τα οποία θα τα ενεργοποιήσουν ώστε να εξέρθουν από την G0 και να συμμετάσχουν στις ανάγκες του οργανισμού που έχουν προκύψει π.χ επιδιόρθωση ιστού μετά από κάποιο τραυματισμό. Το εάν κάποιο κύτταρο εισέλθει στην φάση G0 ή G1 καθορίζεται από τις ανάγκες του οργανισμού και από τα ερεθίσματα που επικρατούν την στιγμή εκείνη. Σε συγκεκριμένους ιστούς η φάση quiescence είναι μεγάλης σημασίας και μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων τους βρίσκονται σε αυτήν π.χ. λεμφικός ιστός, σκελετικοί μύες, λιπώδης ιστός, νευρικός ιστός κ.ά. Επιπλέον η φάση αυτή διαχωρίζεται σε δυο μικρότερες, την φάση βαθιάς ηρεμίας και την G alert όπου τα κύτταρα βρίσκονται σε επιφυλακή ώστε να εξαχθούν από αυτή και να εισέλθουν ξανά στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Αυτό γίνεται ώστε τα κύτταρα αυτά να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε ώριμα κύτταρα, με σκοπό να καλύψουν τις απαιτήσεις του οργανισμού που έχουν προκύψει.<sup>7</sup>



<https://dx.doi.org>

Εικόνα 2: (Α) Παρουσίαση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και της ενεργότητας διάφορων κυττάρων. (Β) Η φάση G0 αναλυτικά και ο διαχωρισμός της στην G alert και την κατάσταση βαθιάς ηρεμίας.<sup>8,9</sup>

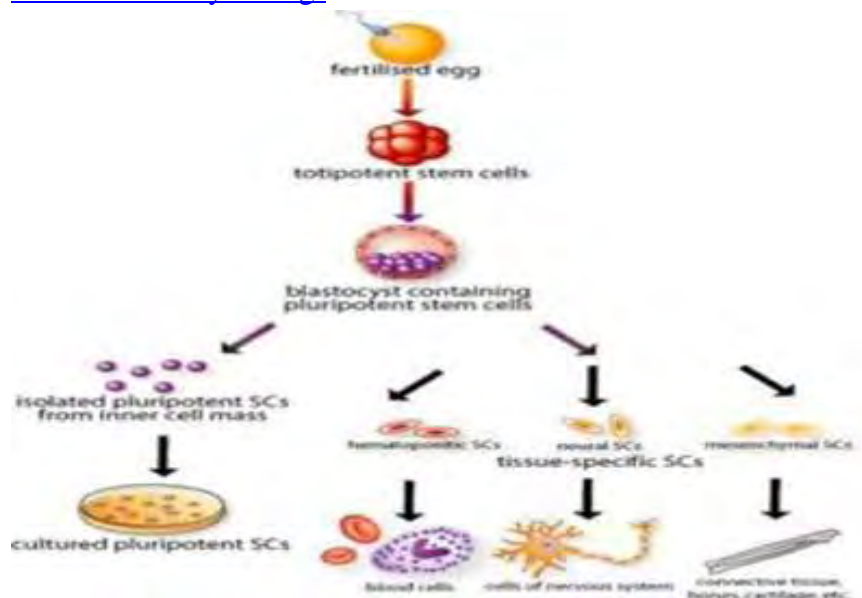
### 1.3 Δραστικότητα βλαστικών κυττάρων

Η Δραστικότητα κάθε κυττάρου είναι αυτή που καθορίζει τις δυνατότητες διαφοροποίησης του, δηλαδή την ικανότητα του να διαφοροποιείται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Με βάση την δραστηκότητά τους τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε κατηγορίες οι οποίες είναι:

1. Παντοδύναμα (totipotent) βλαστικά κύτταρα. Είναι τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου, μέχρι και την τέταρτη ημέρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν την δυνατότητα να κατασκευάσουν έναν ολόκληρο, βιώσιμο, οργανισμό.<sup>10</sup> Τα παντοδύναμα κύτταρα με διαιρέσεις θα

δώσουν την βλαστοκύστη (inner cell mass). Στην εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης υπάρχουν τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα.

2. Ολοδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα είναι τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης και έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων. Τα τρία βλαστικά δέρματα είναι το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα.<sup>11</sup>
3. Πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα. Πρόκειται για τα κύτταρα των τριών βλαστικών δερμάτων, που έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.<sup>10</sup>
4. Ολιγοδύναμα (oligopotent) βλαστικά κύτταρα. Αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λίγα μόνο κύτταρα, όπως τα λεμφοειδή ή μυελοειδή κύτταρα.<sup>6</sup>
5. Μονοδύναμα (Unipotent) βλαστικά κύτταρα. Τέτοια βλαστοκύτταρα μπορούν να παράγουν ένα μόνο είδος κυττάρου, αλλά διατηρούν την ιδιότητα της αυτοανανέωσης τους, η οποία τα διακρίνει από μη βλαστικά κύτταρα (π.χ., τα βλαστικά κύτταρα μυών).<sup>6</sup>



Εικόνα 3: Απεικόνιση της δραστηριότητας των βλαστικών κυττάρων.

## 1.4 Βασικοί τύποι βλαστικών κυττάρων

### ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα είναι ολοδύναμα. Όπως προαναφέραμε τα εμβρυονικά κύτταρα επειδή είναι ολοδύναμα, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων. Τα βλαστικά δέρματα είναι το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα.

Τα βλαστικά κύτταρα αυτά, προέρχονται από την εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης. Η βλαστοκύστη δημιουργείται κατά την εμβρυογένεση, την τέταρτη με πέμπτη ημέρα μετά την γονιμοποίηση. Σε αυτή την χρονική στιγμή το έμβρυο αποτελείται από 250 κύτταρα περίπου. Η εσωτερική κυτταρική μάζα διαχωρίζεται νωρίς από τα κύτταρα της εξωτερικής στιβάδας, από το οποία θα προέλθει το τροφοεξώδερμα. Η εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης (ICM) είναι η κύρια πηγή εμβρυονικών βλαστοκυττάρων.<sup>12</sup> Επίσης η ICM είναι δυνατόν να προέλθει και από κλωνοποίηση. Η διαδικασία της κλωνοποίησης περιλαμβάνει την μεταφορά ενός πυρήνα σωματικού κύτταρου σε απύρηνο ωάριο. Με αυτό τον τρόπο όταν το γονιμοποιημένο

ωάριο αναπτυχθεί σε βλαστοκύστη, είναι δυνατό να απομονώσουμε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.<sup>13</sup>

Όσο αφορά την απομόνωση και την καλλιέργεια των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, περίπου το 1995 ξεκίνησαν οι πρώτες μελέτες και προσπάθειες απομόνωσή τους από την εσωτερική μάζα βλαστοκυστών και ακολούθησε η καλλιέργειά τους *in vitro*. Ωστόσο η πρώτη επιτυχημένη απομόνωση τέτοιων κυττάρων πραγματοποιήθηκε το 1998.<sup>14</sup>

Σύμφωνα με τις μελέτες που ακολούθησαν, τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα είναι σε θέση να παράγουν *in vitro* όλους τους τύπους κυττάρων και των τριών βλαστικών δερμάτων χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους δείκτες. Πιο συγκεκριμένα με την προσθήκη ζ-σφαιρίνης, καλικρεΐνης, ενολάσης, ακτίνης των μυών και την βαριά αλυσίδα της μυοσίνης μπορούμε να πάρουμε κύτταρα του μεσοδέρματος. Επιπλέον με την χρήση α-φετοπρωτεΐνης και α1-αντιθρυψίνης σε εμβρυονικά κύτταρα *in vitro* έχουμε κύτταρα του ενδοδέρματος και για την παραγωγή κυττάρων του εξωδέρματος είναι απαραίτητη η προσθήκη ουσιών όπως είναι β-τουμπουλίνη τύπου III καθώς και η κερατίνη.<sup>15</sup>



[www.ir.lib.uth.gr](http://www.ir.lib.uth.gr)

Εικόνα 4: Παρουσίαση των σταδίων του ζυγωτού και της βλαστοκύστης στην οποία διαφέρεται η εσωτερική κυτταρική μάζα και η τροφοβλάστη.

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα για να διαφοροποιηθούν σε σωματικά κύτταρα σχηματίζουν τρισδιάστατη δομή, που ονομάζεται εμβρυονικό σωματίο. Τα σωματία αυτά δεν διαθέτουν πολικότητα και γιαυτό το λόγο δεν μπορούν να παράγουν βιώσιμο ανθρώπινο έμβρυο. Κατά την μελέτη των εμβρυονικών κυττάρων in vitro έχει αποδειχθεί ότι κατά τα πρώτα στάδια δημιουργούνται τα βλαστικά κύτταρα του εξωδέρματος και του μεσοδέρματος, σε αντίθεση με τα βλαστικά κύτταρα του ενδοδέρματος, τα οποία εμφανίζονται κατά την δέκατη ημέρα της ανάπτυξης.<sup>16</sup> Η ικανότητα των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων να αποκαθηστούν τους ιστούς, έχει συμβάλει στην χρήση αυτών σε θεραπείες που σχετίζονται με την ανάκτηση κατεστραμμένων νευρώνων. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την αντίληψη που υπήρχε, ότι τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου δεν διαιρούνται. Με την βοήθεια των ερευνών που έγιναν όσο αφορά τα βλαστικά κύτταρα αυτά, αποκαλύφθηκε ότι τα εμβρυονικά κύτταρα αρχικά διαφοροποιούνται σε νευρωνικά βλαστικά κύτταρα και αυτά με την σειρά τους παράγουν τους νευρώνες, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα.<sup>17</sup> Σε περιπτώσεις που τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούνται για μεταμόσχευση με σκοπό την θεραπεία διαταραχών είναι απαραίτητο να αφαιρούνται από αυτά πριν την μεταμόσχευση, τα αδιαφοροποίητα πολυδύναμα κύτταρα, διότι όπως έχει αποδειχθεί in vitro, τα κύτταρα αυτά μπορούν να παράγουν τερατώματα.<sup>18</sup>

Επίσης, τα εμβρυονικά γαμετικά κύτταρα αποτελούν μια άλλη κατηγορία εμβρυονικών κυττάρων, που προέρχονται από την γενετική ακρολοφία των εμβρύων. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης και παράγουν τους γαμέτες, δηλαδή, τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια.<sup>19</sup>

## ΕΝΗΛΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα σε αντίθεση με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα. Αυτό σημαίνει πως τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να παράγουν όλα τα είδη κυττάρων του ανθρώπινου σώματος όπως τα εμβρυονικά που είναι ολοδύναμα

βλαστοκύτταρα. Η κύρια λειτουργία των ενήλικων βλαστικών κυττάρων είναι να πολλαπλασιάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο ανθρώπινο σώμα από το να διαφοροποιούνται, με σκοπό να παράγουν ώριμα κύτταρα συγκεκριμένων ιστών.<sup>20</sup>

Η κύριες πηγές ενήλικων βλαστοκυττάρων είναι, το αίμα, ο μυελός των οστών, ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το πάγκρεας, οι μύες, το επηθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος και ο πάλφος των δοντιών.<sup>21</sup> Η απομόνωση των ενήλικων βλαστοκυττάρων και η καλλιέργεια τους *in vitro*, τις περισσότερες φορές είναι δύσκολη.<sup>22</sup>

Τα βλαστοκύτταρα που ανήκουν στην κατηγορία αυτή ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η ανανέωση των ιστών είτε αυτό γίνεται κάτω από φυσιολογικές, είτε κάτω από παθολογικές συνθήκες. Ανταποκρίνονται στις ανάγκες που εκφράζει το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται μέσω των ιδιοτήτων της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησής τους.<sup>23</sup> Δύο κύριες υποκατηγορίες των ενήλικων βλαστικών κυττάρων είναι τα βλαστοκύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και τα μεσεγχυματικά ενήλικα βλαστοκύτταρα. Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα παράγουν τα κύτταρα του

ανοσοποιητικού συστήματος και τα κύτταρα του αίματος, ενώ από τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προκύπτουν όλοι εκείνοι οι κυτταρικοί τύποι που συμβάλουν στην στήριξη του σώματος, όπως είναι οι μύες, οι χόνδροι, ο λιπώδης ιστός και άλλοι τύποι κυττάρων.<sup>24</sup>

## ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (IPS)

Ο Yamanaka και οι συνεργάτες του το 2006 χρησιμοποιώντας τέσσερις μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ήταν οι OCT4, SOX2, KLF4 και c-MYC, κατάφεραν να δημιουργήσουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα από ινοβλάστες του δέρματος ποντικού. Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν επαγόμενα πολυδύναμα



βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem cells, iPS), και όπως έχει αποδηχθεί διαθέτουν όλα τα κρητήρια των εμβρυικών βλατικών κυττάρων. Έπειτα απο μικρό χρονικό διάστημα πραγματοποιήθηκε η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων και απο σωματικά κύτταρα ανθρώπου.<sup>25,26,27,28</sup>

Σε μεταγενέστερες μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας OCT4 είναι ο μοναδικός που απαιτείται για το επαναπρογραμματισμό των βλαστικών κυττάρων, καθώς οι υπόλοιποι τρεις παράγοντες μπορούν να αντικατασταθούν απο άλλους και συμμετέχουν απλά στην ενεργοποίηση της πολυδύναμης κατάστασης<sup>29,30</sup> Επιπλέον τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για αντικατάσταση του μεταγραφικού παράγοντα OCT4 απο τον πυρηνικό υποδοχέα Nr5a2.<sup>31</sup> Τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα που έχουν καταφέρει να παραχθούν παρουσιάζουν πάρα πολλές ομοιότητες όπως προαναφέρθηκε με τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, αλλά δεν αποτελούν πανομοιότυπα κύτταρα. Αυτό αποδήχθηκε μέσα απο αναλύσεις με DNA μικροσυστοιχίες, που έκαναν φανερές τις διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των δυο κατηγοριών βλαστικών κυττάρων.<sup>32</sup> Ο επαναπρογραμματισμός είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί μεθυλίωση και απομεθυλίωση του DNA, αρκετούς κύκλους πολλαπλασιασμού και διαιρέσεων καθώς και επανέκφραση πρωτεϊνών και τροποποίηση ιστονών.<sup>33</sup>

## **1.5 Άλλες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων**

### **ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ**

Ο ομφάλιος λώρος αποτελεί πηγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται απο το επιθήλιο του ομφάλιου λώρου μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως είναι, τα κύτταρα του ήπατος, οι νευρώνες, αιμοποιητικά και άλλα είδη κυττάρων.<sup>34</sup> Επίσης είναι δυνατόν

να γίνει η απομόνωση βλαστικών κυττάρων από το αίμα του ομφάλιου λώρου τα οποία έχουν μεγαλύτερη δυναμικότητα διαφοροποίησης από ότι τα ενήλικα βλαστοκύτταρα. Τέτοια κύτταρα που βρίσκονται στο αίμα του ομφάλιου λώρου είναι μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα καθώς και CD34+ αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.<sup>35</sup>

#### ΑΜΝΙΑΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα βλαστικά κύτταρα της κατηγορίας αυτής βρίσκονται στην μεμβράνη του πλακούντα. Μια από τις κύριες ιδιότητες του είναι η δυνατότητα διαφοροποίησης τους σε κύτταρα και τον τριών βλαστικών δερμάτων. Η ικανότητά τους αυτή προέρχεται από το γεγονός ότι εκφράζουν παράγοντες όπως είναι ο Oct4, Nanog και η αλκαλική φωσφατάση. Επί προσθέτως, τα βλαστοκύτταρα αυτά είναι κατάλληλα για μεταμόσχευση, διότι έχει αποδηχθεί *in vitro* ότι δεν παράγουν τερατώματα.<sup>36</sup>

#### ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα, είναι κατάλληλα για μεταμόσχευση καθώς δεν δημιουργούν τερατώματα και συμμετέχουν στην επιδιόρθωση ιστών. Πιο συγκεκριμένα τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα διαπερνούν τον πλακούντα και υπάρχουν στην μητρική κυκλοφορία, ώστε να σπεύσουν σε σημεία όπου εμφανίζεται κάποια βλάβη. Η επιδιόρθωση της βλάβης μέσω αυτών των κυττάρων πραγματοποιείται με την παραγωγή ώριμων κυττάρων στην περιοχή της καταστροφής του ιστού.<sup>37</sup>

#### ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έχουν την δυνατότητα να παράγουν συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα διαφοροποιούνται σε κύτταρα του μεσοδέρματος του εμβρύου όπως είναι τα οστεοκύτταρα, τα λιποκύτταρα και τα χονδροκύτταρα, καθώς και σε νευρικά κύτταρα του εξωδέρματος. Τα κύτταρα αυτά δίνουν γένεση στον μεγαλύτερο αριθμό των κυττάρων του συνδετικού ιστού στους ενήλικες. Η απομόνωση και η καλλιέργειά τους *in vitro*, είναι εύκολη και με την χρήση των κατάλληλων ουσιών μπορούν να διαφοροποιηθούν προς τις κυτταρικές σειρές που προαναφέραμε. Η κύρια θέση τους στο ανθρώπινο σώμα είναι στο μυελό των οστών.<sup>38</sup> Παρόλα αυτά, τα βλαστικά κύτταρα αυτά έχουν απομονωθεί και από

άλλους ιστούς όπως είναι το δέρμα, ο λιπώδης ιστός, οι μύες και ο συνδετικός ιστός.<sup>39</sup> Το 1996 πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η απομόνωση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από μυελό των οστών ποντικού, από τους ερευνητές Friedenstein και Petrakova.<sup>38</sup>

#### ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα βλαστικά κύτταρα του συγκεκριμένου τύπου διαφοροποιούνται σε όλες τις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές. Διακρίνονται από μεγάλη ικανότητα αυτοανανέωσης. Οι απόγονοι των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων είναι μικρής διάρκειας αιμοποιητικά κύτταρα και παράγουν κυτταρικές σειρές για μικρό χρονικό διάστημα.<sup>40</sup> Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα είναι σε θέση να αποκαταστήσουν την αιμοποίηση σε ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια. Η συγκεκριμένη ικανότητά τους στηρίζεται στο μόριο CD34+, το οποίο εκφράζεται από τα κύτταρα αυτά.<sup>41</sup>

#### ΝΕΥΡΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα νευρικά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται κυρίως σε κυτταρικές σειρές του εξωδέρματος. Οι κατηγορίες κυττάρων που δημιουργούνται από τα βλαστικά κύτταρα του συγκεκριμένου τύπου είναι, τα κύτταρα των νευρώνων καθώς και δυο μη νευρωνικές κατηγορίες κυττάρων, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα.<sup>42</sup>

#### ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

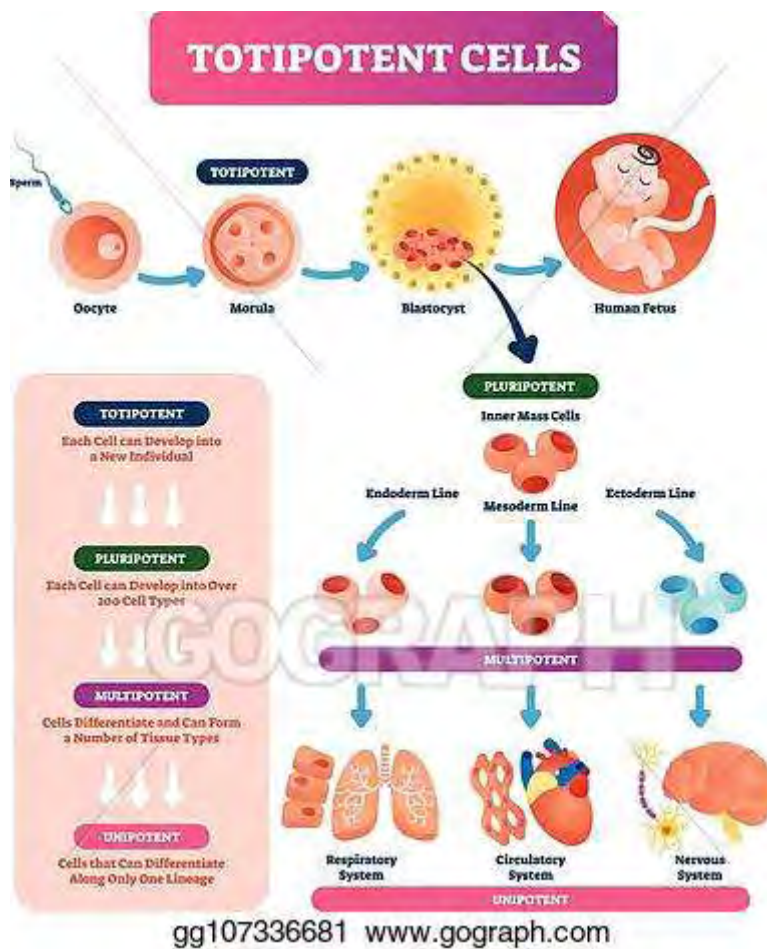
Τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος τοποθετούνται στους θύλακες των τριχών και στο στρώμα της επιδερμίδας. Τα βλαστοκύτταρα της επιδερμίδας διαφοροποιούνται σε κερατινοκύτταρα και παράγουν το προστατευτικό στρώμα της.<sup>43</sup> Όσο αφορά τα βλαστοκύτταρα που βρίσκονται στους θύλακες των τριχών διαφοροποιούνται και σχηματίζουν την επιδερμίδα και τους θύλακες της τρίχας.<sup>44</sup>

#### ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα επιθηλιακά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους κάποιους από τους οποίους είναι απορροφητικά κύτταρα, ενδοκρινή κύτταρα του

εντέρου, τα κύτταρα Paneth καθώς και τα κύτταρα Goblet. Τα επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα κατά κύριο λόγο, βρίσκονται στα τοιχώματα τις πεπτικής οδού σε ειδικές θέσεις που ονομάζονται κρύπτες.<sup>45</sup>

Στην παρακάτω εικόνα (εικ.4) που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι περισσότεροι τύποι βλαστικών κυττάρων, στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του ανθρώπου. Επίσης απεικονίζεται και η δραστικότητα της κάθε κατηγορίας βλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 5: Οι τύποι βλαστοκυττάρων και η δραστηριότητα τους στα διάφορα στάδια ανάπτυξης.<sup>26</sup>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **2.1 Γήρανση βλαστοκυττάρων**

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους, σε έναν ιστό. Αυτό δίνει την δυνατότητα στους ιστούς να αναπτύσσονται στα πλαίσια της φυσιολογικής λειτουργίας τους ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση του οργανισμού αλλά και να αναγεννώνται σε περιπτώσεις τραυματισμού. Τα βλαστικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν αναπαραγωγική γήρανση αλλά είναι επιρρεπή στην συσσώρευση βλαβών. Επομένως εφόσον τα βλαστοκύτταρα αποτελούν απαραίτητα κύτταρα για τους κυτταρικούς τύπους πολλών ιστών, η δυσλειτουργία τους εξαιτίας παραγόντων που τα οδηγούν στην γήρανση, είναι πιο επιζήμια σε σχέση με αυτή των άλλων κυτταρικών τύπων.

Η γήρανση των βλαστικών κυττάρων ως φαινόμενο αντικατοπτρίζει, την μείση της λειτουργίας των κυττάρων αυτών με το πέρασμα του χρόνου. Πιο συγκεκριμένα τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα κατά την διάρκεια της γήρανσης παρουσιάζουν μειωμένες δυνατότητες διαφοροποίησης και αυτοανανέωσης. Η μειωμένη λειτουργικότητα αυτή οδηγεί σε αλλαγές στην φυσιολογία και την ομοιόσταση των ιστών, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η υγεία και η βιωσιμότητα του οργανισμού. Γι

αυτόν ακριβώς τον λόγο η κατανόηση της γήρανσης σε συνεχώς αναπαραγόμενους ιστούς είναι πιθανό να συμβάλει στην κατανόηση του φαινομένου της γήρανσης και σε επίπεδο οργάνων.<sup>1</sup>

Οστόσο, έχουν αναπτυχθεί δυο θεωρίες για το φαινόμενο της γήρανσης. Η πρώτη είναι η θεωρία της ανταγωνιστικής πλειοτροπίας, κατά την οποία υποστηρίζεται ότι τα γονίδια που οδηγούν στην γήρανση επιλέγονται διότι παρέχουν πλεονεκτήματα, στα πρώτα χρόνια της ζωής.<sup>46</sup> Η δεύτερη θεωρία ονομάζεται μιας χρήσης και αναφέρει ότι η σωματική συντήρηση είναι δαπανηρή και αποτελεί μια στρατηγική εις βάρος της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης. Άρα σύμφωνα με τις θεωρίες αυτές, πολλοί από τους μηχανισμούς και τα γονίδια που οδηγούν στην γήρανση είναι απαραίτητα στα πρώτα χρόνια της ζωής του οργανισμού, αλλά με το πέρασμα του χρόνου εξελίσσονται σε επιβλαβή.<sup>47</sup> Οι παράγοντες που οδηγούν στην γήρανση των βλαστικών κυττάρων είναι τόσο γενετικοί όσο και επιγενετικοί. Κάποιοι από τους γενετικούς παράγοντες αυτούς είναι, η μείωση των τελομερών, η μεταβολή της πρωτεόστασης, οι βλάβες του DNA και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Επιπλέον στο φαινόμενο της γήρανσης εμπλέκονται και εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με την ακτινοβολία, τους παθογόνους παράγοντες και την έκθεση σε διάφορα επίπεδα οξυγόνου. Από την άλλη οι επιγενετικοί παράγοντες αφορούν την μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση ιστονών καθώς και δράση διάφορων ειδών microRNA.

Πριν περάσουμε στην αναλυτική παρουσίαση τόσο των γενετικών, όσο και των επιγενετικών παραγόντων της γήρανσης, θα περιγράψουμε κάποιες αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια του φαινομένου αυτού, σε ορισμένους πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων. Η μελέτη των μεταβολών αυτών, συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της γήρανσης ως φαινόμενο καθώς και των αλλαγών που επιφέρει τόσο στα βλαστικά κύτταρα όσο και σε ολόκληρο τον οργανισμό.

### **Αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα**

Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs), είναι υπεύθυνα να τον σχηματισμό του αίματος και τοποθετούνται στο μυελό των οστών. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα μυελού των οστών τόσο σε νεαρά όσο και σε ενήλικα ποντίκια ανακαλύφθηκε ότι, και οι δυο πληθυσμοί κυττάρων παρουσιάζουν τις ίδιες δυνατότητες ανασύστασης σε περίπτωση μεταμόσχευσης.<sup>48</sup> Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε πως τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα διατηρούν την ικανότητα σχηματισμού του αίματος για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.<sup>49</sup> Δηλαδή κατά την διάρκεια της γήρανσης δεν παρατηρείται κατάρρευση του αιματολογικού συστήματος. Αυτό που παρατηρήθηκε μέσω των μελετών που έγιναν είναι ότι, τόσο στον άνθρωπο όσο και στον ποντικό μειώνεται η ικανότητα διαφοροποίησης των HSCs με το πέρασμα του χρόνου ενώ από την άλλη ο αριθμός τους αυξάνεται με την ηλικία. Αυτό ερμηνεύεται ως αντισταθμιστική αύξηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων ως απόκριση στην μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης και λειτουργίας τους.<sup>50, 51</sup> Επιπλέον κάτι άλλο το οποίο έγινε αντιληπτό κατά την μελέτη των ηλικιωμένων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων είναι το γεγονός ότι διαφοροποιούνται περισσότερο σε μυελώδη κύτταρα σε σχέση με κύτταρα του λεμφικού συστήματος.<sup>52,53,54</sup> Έτσι εξηγείται γιατί με την αύξηση της ηλικίας μειώνεται το ανοσοποιητικό σύστημα.<sup>55</sup> Επι προσθέτως η μέτρια αναιμία που αποτελεί χαρακτηριστικό ηλικιωμένων ατόμων μπορεί είναι αποτέλεσμα της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος.<sup>56</sup> Πειράματα επίσης απέδειξαν ότι η γήρανση των HSCs οφείλεται κατά κύριο λόγο σε ενδογενής κυτταρικούς μηχανισμούς, καθώς τα κύτταρα αυτά διατηρούν το ηλικιωμένο φαινότυπό τους και έπειτα από μεταμόσχευση σε νεαρά άτομα.<sup>54</sup>

### **Νευρικά βλαστοκύτταρα**

Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) μειώνονται σε αριθμό με την αύξηση της ηλικίας κάτι το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη νευρογένεση. Όπως έχει αποδηχθεί η νευρογένεση στα ενήλικα άτομα διατηρείται μόνο σε ορισμένα τμήματα

του εγκεφάλου.<sup>57,58</sup> Η μειωμένη λειτουργικότητα αυτή των νευρικών βλαστοκυττάρων είναι συνέπεια της δράσης εξωγενών παραγόντων.<sup>59</sup> Επιπλέον η ελάττωση της λειτουργίας των νευρικών βλαστικών κυττάρων και της νευρογένεσης αποτελεί τον βασικό λόγο, για τον οποίο τα ηλικιωμένα άτομα παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα μάθησης και μνήμης.<sup>60</sup> Επίσης μέσω πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί αποδείχθηκε ότι εάν αντικατασταθούν ορισμένοι παράγοντες στα ενήλικαν βλαστικά κύτταρα όπως είναι, ο IGF-1, ο GH, ο Wnt3, ο TGF-β ή GDF11 με τους αντίστοιχούς που προέρχονται από νευρικά βλαστοκύτταρα νεαρών ατόμων, είναι δυνατόν να αποκατασταθεί η νευρογένεση.<sup>61, 62, 63, 64, 65</sup>

### **Εντερικά βλαστοκύτταρα**

Οι γνώσεις που υπάρχουν για τα εντερικά βλαστικά κύτταρα (ISCs), προέρχονται κατά κύριο λόγο από την μελέτη της *Drosophila*. Με την αύξηση της ηλικίας ο αριθμός των βλαστοκυττάρων του εντέρου μεγαλώνει, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται μείωση της λειτουργίας τους.<sup>66</sup> Κατά την διάρκεια της γήρανσης των ISCs ενεργοποιούνται μονοπάτια σηματοδότησης όπως είναι, το JNK, το p38-MAPK και το PDGF / VEGF τα όποια σχετίζονται με την καταπόνηση του οργανισμού από το περιβάλλον και αποδεικνύουν την επίδραση εξωγενών παραγόντων στην γήρανση των εντερικών βλαστοκυττάρων.<sup>66,67</sup> Επί προσθέτως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία φαίνεται να συμβάλει στην γήρανση των ISCs.<sup>68</sup> Επίσης σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων του εντέρου και της εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου.<sup>69</sup>

### **Δερματικά στελεχειαία κύτταρα**

Το δέρμα αποτελείται από διάφορους τύπους βλαστικών κυττάρων κάποιοι από τους οποίους είναι τα βλαστοκύτταρα που παράγουν τα μελανοκύτταρα που με την σειρά



τους παράγουν τις χρωστικές ουσίες και τα βλαστικά κύτταρα των τριχοθυλακίων που είναι υπεύθυνα για την τριχοφυΐα. Με το πέρασμα του χρόνου και κατά την διάρκεια της γήρανσης τα βλαστικά κύτταρα των θυλακίων των τριχών παρουσιάζουν μεγάλες περιόδους ανάπαυσης που έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της τριχοφυΐας.<sup>70</sup> Ο αριθμός των βλαστοκυττάρων των θυλακίων των τριχών δεν μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας, αλλά παρουσιάζεται μειωμένη λειτουργικότητα αυτών.<sup>71,72</sup> Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα των τριχοθυλακίων βρίσκονται υπο την επίδραση ενδογενών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την γήρανσή τους. Παράδειγμα των ενδογενών παραγόντων αυτών αποτελεί, η αύξηση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT και μείωση της σηματοδότησης Notch κατά την γήρανση του συγκεκριμένου τύπου βλαστοκυττάρων.<sup>73</sup> Απο την άλλη πλευρά τα βλαστοκύτταρα των μελανοκυττάρων μειώνονται σε αριθμό κατά την γήρανση, το οποίο συμβαίνει διότι η διαφοροποίηση γίνεται σε βάρος της αυτοανανέωσης. Όπως έχει αποδειχθεί το στρες αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες της γήρανσης των μαλλιών. Έτσι εάν μειωθεί ο παράγοντας αυτός και ταυτόχρονα κατασταλλεί και η διαφοροποίηση που γίνεται σε βάρος της αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων των μελανοκυττάρων, είναι δυνατόν να διατηρηθεί το χρώμα των μαλλιών ανεξαρτήτου ηλικίας.<sup>74</sup>

### Δορυφορικά κελιά

Ο συγκεκριμένος τύπος βλαστικών κυττάρων είναι υπεύθυνος για την αναγέννηση των σκελετικών μυικών ινών μετά από τραυματισμό.<sup>75,76,77</sup> Τα δορυφορικά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν μείωση στον αριθμό τους με τον πέρασμα του χρόνου.<sup>78</sup> Τα βλαστικά κύτταρα αυτά κατά την διάρκεια της γήρανσης μεταβάλλουν της διαφοροποίησή τους πιο πολύ προς ινωδογόνο παρά προς μυογενή κυτταρική σειρά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία αναγέννησης έπειτα από κάποιο τραυματισμό που εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε ηλικιωμένα άτομα. Ο λόγος για

τον οποίο γίνεται αυτό είναι η αλλαγή των μονοπατιών σηματοδότησης Wnt και TGF-β.<sup>79,80</sup> Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο την κατανόηση της γήρανσης των δορυφορικών βλαστικών κυττάρων απέδειξαν ότι οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για το φαινόμενο της γήρανσης σε αυτό το είδος βλαστικών κυττάρων είναι κυρίως εξωγενείς. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούνται μεταβολές στην διαθεσιμότητα των προσδετών Wnt, Notch, FGF και TOP-β.<sup>81</sup> Από την άλλη η μείωση της αυτοανανέωσης οφείλεται σε ενδογενή παράγοντα που είναι η αύξηση του σηματοδοτικού μονοπατιού που επάγεται από το στρες p38-MAPK.<sup>82</sup>

## **2.2 Γονιμοποίηση και γήρανση**

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι με την ηλικία επέρχεται μείωση της γονιμότητας σε πολλά είδη οργανισμών.<sup>83</sup> Πιο συγκεκριμένα, Στον *C. Elegans* τα GSCs αποτελεί το μόνο βλαστοκύτταρο του οργανισμού καθώς το μεγεθός του είναι πολύ μικρό και παρατηρείται μείωση του αριθμού των βλαστοκυττάρων αυτών με το πέρασμα του χρόνου.<sup>84</sup> Επιπλέον στην *Drosophila* τόσο τα θηλυκά όσο και τα αρσενικά GSC ελαττώνονται με την ηλικία.<sup>85</sup> Αντιθέτως με τα είδη που προαναφέρθηκαν, στα ασπόνδυλα, η γονιμότητα των βλαστοκυττάρων διατηρείται σε όλη την διάρκεια της ζωής τους.

Στα θηλαστικά και πιο συγκεκριμένα στα αρσενικά τα σπερματογλοιακά βλαστοκύτταρα μειώνονται σε αριθμό κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>86,87,17</sup> Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί η μείωση του αριθμού των σπερματογλοιακών βλαστοκυττάρων οφείλεται κατά κύριο λόγο σε εξωγενείς παράγοντες. Επιπροσθέτως ένας άλλος παράγοντας που έχει αποδηχθεί ότι επηρεάζει τον αριθμό και την λειτουργικότητα των SSC είναι η ινσουλίνη.<sup>88, 89,90</sup> Σε αντίθεση όμως με τα θηλυκά τα αρσενικά άτομα των περισσότερων ειδών παραμένουν γόνιμα σε όλη την διάρκεια της ζωής τους. Από την άλλη πλευρά η γονιμότητα των

θηλυκών είναι συσχετισμένη με τα ωογενή βλαστοκύτταρα OSCs. Ωστόσο έχουν απομονωθεί ωογενή βλαστοκύτταρα από ποντίκια με σκοπό να μελετηθεί η λειτουργία τους και η εξέλιξή τους με το πέρασμα του χρόνου, όμως υπάρχει η ανάγκη για την πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών για να διερευνηθεί εάν η μείωση και η απουσία λειτουργικότητας των OSCs εμπλέκεται στην γήρανση των ωοθηκών και επομένως στην απώλεια της γονιμότητας των θηλυκών ατόμων.<sup>91</sup>

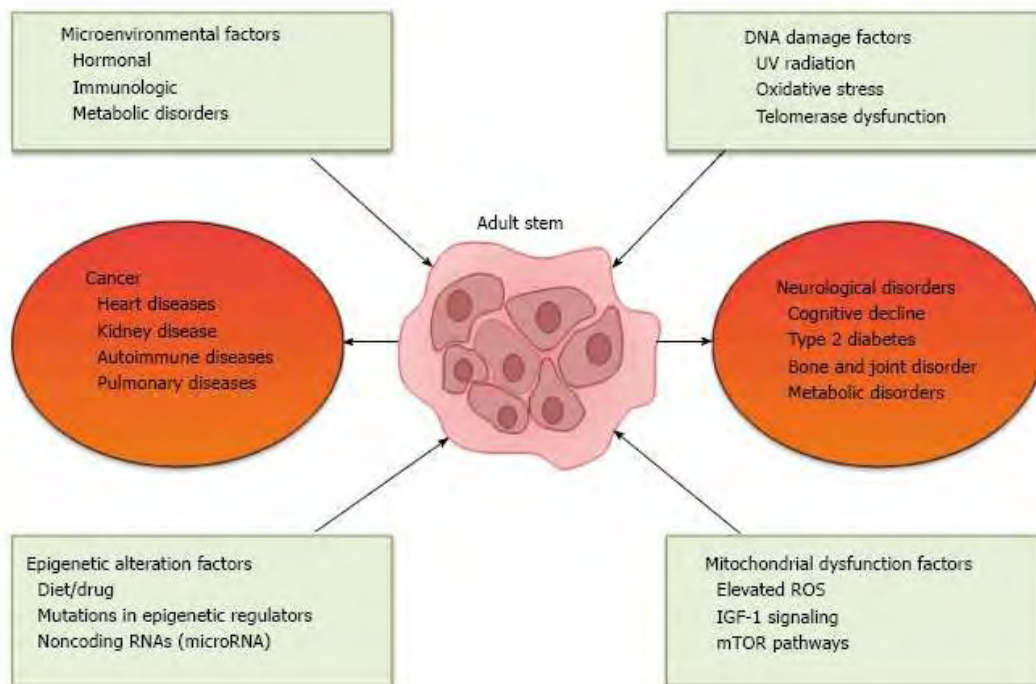
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τα βλαστικά κύτταρα είναι κύτταρα τα οποία έχουν την δυνατότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε διάφορους τύπους κυττάρων. Με το πέρασμα των χρόνων τα βλαστικά κύτταρα οδηγούνται σε μείωση αυτών των ιδιοτήτων τους διότι υπόκεινται σε συσσώρευση βλαβών του γενετικού υλικού και αδυναμία επιδιόρθωσης αυτών εξαιτίας της μειωμένης δράσης αρκετών γονιδίων.<sup>92</sup> Τα μεσεγχυματικά ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα μετατρέπονται σε επίπεδα κύτταρα με υπερτροφικούς πυρήνες εξαιτίας της συσσώρευσης βλαβών. Ακόμα ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η περίσσεια ινών ακτίνης και η αδυναμία προσκόλλησής τους σε επιφάνειες. Τα χαρακτηριστικά αυτά των ηλικιωμένων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων οφείλονται σε μείωση αρκετών παραγόντων όπως είναι CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 και HLA-DR και ο CD106 που παίζει σημαντικό ρόλο στην αδιπογένεση.<sup>93</sup> Επιπλέον τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα κατά την διάρκεια της γήρανσης παρουσιάζουν μειωμένη οστεογένεση και επομένως μειωμένη ικανότητα δημιουργίας οστού. Η απώλεια αυτή της οστεογένεσης με το πέρασμα των χρόνων, οφείλεται στην μειωμένη έκφραση της

PPAKγ η οποία ωθεί την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων προς οστεοβλάστική σειρά κυττάρων.<sup>94</sup> Αντιθέτως ο παράγοντας CD295 που είναι ο υποδοχέας της λεπτίνης παρουσιάζει αύξηση κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>95</sup>

Η μείωση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της λειτουργίας των διαφόρων οργάνων και κατεπέκταση του οργανισμού κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>96</sup> Ένας από τους κύριους παράγοντες που οδηγούν σε συσσώρευση των βλαβών του γενετικού υλικού είναι η συσσώρευση ROS, κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί συνεχώς την σταθερότητα του γονιδιώματος σε συνδυασμό με την μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζουν τα βλαστικά κύτταρα κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>97</sup> Επιπλέον η αδυναμία επιδιόρθωσης των βλαβών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την κληρονόμησή τους σε θυγατρικά κύτταρα και άρα την μειωμένη λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού. Επιπλέον άλλο ένα γεγονός το οποίο φαίνεται να συμβάλλει αρκετά κατά την διάρκεια της γήρανσης στην συσσώρευση βλαβών του DNA είναι η μειωμένη δράση της αυτοφαγίας η οποία έχει σαν κύριο ρόλο την εξάλειψη κατεστραμένων βιολογικών μακρομορίων και την επανατροφοδότηση του οργανισμού με απαραίτητα συστατικά. Η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των βλαστικών κυττάρων καθώς και η μείωση της αυτοφαγίας και της επισκευής του γενετικού υλικού κατά την διάρκεια της γήρανσης αποτελούν συνέπεια της μειωμένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία θα αναλυθούν εκτενέστερα παρακάτω.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316899/figure/F1>

Εικόνα 6: Αναλυτική παρουσίαση των παραγόντων που συμβάλλουν στην γήρανση των κυττάρων καθώς και οι συνέπειες αυτής στον οργανισμό.

### **3.2 Οξειδωτικό στρες και γήρανση βλαστοκυττάρων**

Το οξειδωτικό στρες είναι μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται απελευθέρωση αντιδραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου ( ROS και RNS αντίστοιχα) διότι υπάρχει ανισορροπία μεταξύ παραγωγής ελεύθερων ριζών και αντιοξειδωτικών μορίων. Επιπλέον εξωγενής παράγοντες όπως είναι το υπεριώδες φως, η ακτινοβολία και αυξητικοί παράγοντες είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην αύξηση των ROS. Η συσσώρευση ελεύθερων ριζών οξυγόνου συνήθως οδηγεί σε πρόκληση βλαβών σε αρκετά βιολογικά μακρομόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια. Ωστόσο παρόλο που τα υψηλά επίπεδα ROS έχουν σαν αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία, τα χαμηλά επίπεδα ROS όπως έχει

αποδειχθεί είναι απαραίτητα για την διατήρηση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και την επιβίωση.<sup>98, 99</sup> Απο διάφορες μελέτες που έχουν γίνει στα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα αναφέρεται ότι τα υψηλά επίπεδα ROS καθώς και η προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή τόσο της διαφοροποίησης όσο και της αυτοανανέωσης των συγκεκριμένων βλαστοκυττάρων.<sup>100,101</sup> Αντιθέτως η προσθήκη αντιοξειδωτικών ενζύμων οδηγεί στην αύξηση του πολλαπλασιασμού και την διαφοροποίησης.<sup>102</sup> Επίσης έχει αναφερθεί ότι τα υψηλά επίπεδα ROS έχουν σαν αποτέλεσμα την αναστολή της οστεογενετικής διαφοροποίησης των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων.<sup>103</sup> Σε αντίθεση με την οστεογένεση, μέσω διάφορων μελετών έχει αποδειχθεί ότι κατά την διάρκεια της αδιπογένεσης δηλαδή της διαφοροποίησης των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων σε λιποκύτταρα τα επίπεδα ROS αυξάνονται. Το γεγονός αυτό ίσως να υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ιδιαίτερου ρόλου των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) στην διαδικασία της λιπογένεσης<sup>104</sup> Όσο αφορά την γήρανση και τα επίπεδα ελεύθερων ριζών οξυγόνου έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ τους καθώς με το πέρασμα των χρόνων και κατά την διάρκεια της γήρανσης το οξειδωτικό στρες φαίνεται να αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό. Πιο συγκεκριμένα κατά την διάρκεια της γήρανσης έχει βρεθεί μειωμένη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD (δισμουτάση υπεροξειδίου). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου σε οξυγόνο καθώς και την διάσπαση του υπεροξειδίου του αζώτου. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρία είδη αντιοξειδωτικών SOD ενζύμων. Αυτά είναι το SOD1 το οποίο αποτελεί το πλέον άφθονο αντιοξειδωτικό ένζυμο και η απώλειά του οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ROS και επομένως σε πρόκληση βλάβης στο γενετικό υλικό. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι μοντέλα ζώων στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το SOD1 ένζυμο εμφάνιζαν αρκετά νωρίς σημάδια γήρανσης και ασθένειες που σχετίζονται με αυτήν. Άρα όπως είναι φανερό το αντιοξειδωτικό ένζυμο SOD1 συμβάλει στην μακροζωία των βλαστικών κυττάρων.<sup>105</sup> Επίσης ακόμα ένα ένζυμο της οικογένειας SOD αποτελεί το SOD2 ο ρόλος του οποίου είναι η προστασία των μιτοχονδρίων από το οξειδωτικό στρες.<sup>106</sup> Ένα ακόμα μέλος της οικογένειας των SOD ενζύμων είναι το SOD3, η απώλεια του οποίου έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αριθμού αντιγράφων του DNA. Από την άλλη πλευρά η αυξημένη έκφραση του SOD3 συνδέεται με την συσσώρευση του Hif-1α παράγοντα υποξίας στα κύτταρα καθώς και με την αναστολή της χονδρογένεσης των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων.<sup>107</sup> Επι προσθέτως ένα ακόμα αρκετά σημαντικό ένζυμο είναι η ATM. Ο ρόλος του

συγκεκριμένου ενζύμου είναι η επιδιόρθωση της θραύσης διπλής έλικας του DNA που λαμβάνουν χώρα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα αναφέρουν ότι κατά την διάρκεια της γήρανσης παρατηρείται απώλεια της λειτουργικότητας του ενζύμου ATM με αποτέλεσμα την ανικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του γενετικού υλικού που συμβαίνουν εξαιτίας των υψηλών επιπέδων ελεύθερων ριζών.<sup>108</sup> Επιπλέον ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας του οποίου η δράση φαίνεται να μειώνεται κατά την διάρκεια της γήρανσης είναι ο NRF2. Ο NRF2 αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες απόκρισης στο οξειδωτικό στρες καθώς ενεργοποιεί αντιοξειδωτικά γονίδια τα οποία με την σειρά τους κωδικοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η αυξημένη δράση του NRF2 έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε επέκταση της ζωής των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.<sup>105,109</sup> Επίσης το μονοπάτι σηματοδότης PI3K/AKT/mTOR/FOXO3 είναι ένα από τα πιο σημαντικά για την απόκριση έναντι του οξειδωτικού στρες. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται μέσω παραγόντων όπως είναι ο SDF1, η πρωτεΐνη Muc1 που παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων,<sup>107</sup> καθώς και μέσω της HDL η οποία προστατεύει τα αγγειακά τοιχώματα από το οξειδωτικό στρες και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα από την διαδικασία της απόπτωσης.<sup>110,111</sup> Η δυσλειτουργία του μονοπατιού αυτού κατά την διάρκεια της γήρανσης εξαιτίας της αναστολής της έκφρασης του FOXO3 γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της αποπτωτικής διαδικασίας και επομένως την συσσώρευση ελεύθερων ριζών και βλαβών του γενετικού υλικού. Επίσης σε ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα παρατηρείται καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού p38/MAPK το οποίο έχει σαν κύριο ρόλο του την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και επομένως την επέκταση της ζωής των βλαστοκυττάρων.

Επι προσθέτως σε ηλικιωμένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα παρατηρήθηκε μια αύξηση του P16INK4a το οποίο αποτελεί αναστολέα της κίνησης CDK.<sup>112</sup> Η αύξηση αυτή σε ηλικιωμένα βλαστοκύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας αυτοανανέωσης των κυττάρων.<sup>112</sup> Μελέτες αποδεικνύουν ότι η μείωση των επιπέδων του P16INK4a μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω θερμιδικού περιορισμού (CR), όπου τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης οδηγούν σε αύξηση της πρωτεΐνης STR1 η οποία αποτελεί ανιχνευτή του ενεργειακού αποθέματος των κυττάρων. Η STR1 με την σειρά της ενεργοποιεί την Akt / p70S6K1 η οποία καταστέλλει τον P16INK4a και επομένως

συμβάλλει στην μακροζωία των βλαστικών κυττάρων.<sup>113</sup> Επιπλέον ο παράγοντας p19(ARF) φαίνεται να ανταγωνίζεται τον P16INK4a κατά το οποίο σημαίνει ότι η αύξηση αυτού είναι δυνατόν να περιορίσει τον P16INK4a και να αποτρέψει την εμφάνιση των επιπτώσεων της γήρανσης.<sup>114</sup> Επομένως από όσα προναφέρθηκαν γίνεται κατανοητό ότι κατά την διάρκεια της γήρανσης συμβαίνει μείωση στην δραστικότητα αρκετών ενζύμων και παραγόντων που υπο κανονικές συνθήκες προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει συνεχή έκθεση του οργανισμού στα προϊόντα του οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε βλάβες του γενετικού υλικού, των πρωτεϊνών και των μιτοχονδρίων. Όλα αυτά με την σειρά τους έχουν ως συνέπεια την συσσώρευση τοξικών παραγόντων, κατεστραμμένων πρωτεϊνών και κατά επέκταση κυτταρική βλάβη και ιστική δυσλειτουργία τα οποία αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά της γήρανσης των οργανισμών και αρκετών ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος.<sup>115</sup>

Ωστόσο έχουν γίνει επίσης πάρα πολλές έρευνες για την ανεύρεση παραγόντων με σκοπό την μείωση του οξειδωτικού στρες και κατεπέκταση την διατήρηση της μακροζωίας των βλαστικών κυττάρων. Μια αντιοξειδωτική ουσία η οποία έχει σαν κύριο ρόλο της την δέσμευση των ROS και επομένως την μείωση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό είναι η NAC.<sup>116</sup> Επίσης το ασκορβικό οξύ καθώς και οι αναστολείς του mTOR μονοπατιού έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην θεραπεία των τραυματισμού που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες και επομένως βοηθούν στην αναγέννηση και την διατήρηση των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων.<sup>117</sup> Επιπλέον μέσω αρκετών ερευνών αναφέρεται ότι η ενεργοποίηση του NRF2 παράγοντα καθώς και η ενεργοποίηση της hTERT μέσω χημικών μορίων όπως είναι η βιταμίνη C, η ασπιρίνη και ο FGF-2 παράγοντας επιτυγχάνουν σε αρκετά μεγάλο βαθμό επαναφορά του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της ικανότητας διαφοροποίησης των μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων στα οποία έχει προκληθεί τραυματισμός εξαιτίας του οξειδωτικού στρες,<sup>118,119,120,121</sup> Ένας ακόμα βασικός παράγοντας ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών Sirtuins.<sup>120,121</sup> Στον άνθρωπο υπάρχουν 7 Sirtuins πρωτεΐνες οι οποίες εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες. Ο κύριος στόχος όμως της οικογένειας των πρωτεϊνών αυτών είναι η προστασία του οργανισμού από την γήρανση καθώς και από διάφορες παθήσεις όπως είναι τα μεταβολικά νοσήματα, η



απώλεια ακοής, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ο καρκίνος.<sup>122,123</sup> Πιο συγκεκριμένα το SIRT1 έχει σαν ρόλο του την αποακετυλίωση διάφορων υποστρωμάτων όπως είναι το p53, η DNA μεθυλοτρανσφεράση 1, ο PGC-1 παράγοντας και οι ιστόνες.<sup>124, 125</sup> Πειραματόζωα τα οποία είχαν ανενεργή την συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρουσίαζαν μειωμένο πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και πρόωρα σημάδια γήρανσης, σε αντίθεση με αυτά στα οποία υπήρχε υπερέκφραση της SIRT1 όπου παρατηρήθηκαν ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα.<sup>126</sup> Η SIRT6 αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του μεταβολισμού, της μεταγραφής καθώς επίσης συμβάλλει στην επισκευή βλαβών που προκαλούνται στο γενετικό υλικό εξαιτίας του οξειδωτικού στρες μέσω της ενεργοποίησης της PARP1.<sup>127,128</sup> Επιπλέον η SIRT7 εμπλέκεται στην αποακετυλίωση του U3-55K παράγοντα που αποτελεί μέρος του συμπλόκου U3 snoRNA και παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφή και την επεξεργασία του rRNA.<sup>129</sup> Επίσης η SIRT7 φαίνεται να συμμετέχει στην αναστολή της απόπτωσης μέσω της αποακετυλίωσης του p53<sup>130 131</sup> Όσο αφορά τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής που είναι η SIRT3, SIRT4 και η SIRT5 βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και τα προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται σε αυτά.<sup>132</sup> Ένας από τους κύριους ρόλους της SIRT3 είναι η ενεργοποίηση του SOD2 ο οποίος με την σειρά του οδηγεί στην μείωση των ROS. Η SIRT4 δρα υδrolύοντας τον E2 παράγοντα που αποτελεί συστατικό της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης PDH με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητα του συμπλέγματος αυτού και κατά συνέπεια να αυξάνεται το οξειδωτικό στρες και τα ROS. Άρα η αναστολή της SIRT4 είναι πιθανόν να συμβάλλει στην μείωση του οξειδωτικού στρες και των βλαβών του γενετικού υλικού που αποτελούν συνέπεια αυτού.<sup>133,134</sup> Τέλος η SIRT5 φαίνεται να βοηθά στην διατήρηση του οξειδωτικού στρες σε χαμηλά επίπεδα και επομένως στην αύξηση της ζωής των βλαστικών κυττάρων.

### **3.3 Αυτοφαγία και γήρανση βλαστοκυττάρων**

Η αυτοφαγία είναι η διαδικασία κατά την οποία παραγματοποιείται πέψη των κυτταρικών δομών που έχουν υποστεί βλάβη όπως είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες καθώς και άλλα βιολογικά μακρομόρια. Αποτελεί μια αρκετά συντηρημένη διαδικασία για τους ευκαριωτικούς οργανισμούς. Ένας από τους κύριους στόχους της επεξεργασίας των βιολογικών μακρομορίων που λαμβάνει χώρα κατά την αυτοφαγία είναι η αποκατάσταση των θρεπτικών συστατικών σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται εξάντληση αυτών.<sup>135</sup> Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι αυτοφαγίας αναλογά με τον μηχανισμό και τον τρόπο με τον οποίο το φορτίο φτάνει στο λυσοσώμα. Αυτοί οι τύποι είναι η μακρο-αυτοφαγία (MA), η μικρο-αυτοφαγία και η αυτοφαγία στην οποία εμπλέκονται μόρια-συνοδοί (CMA). Συγκεκριμένα η μακρο-αυτοφαγία συνδέεται με την ανακύκλωση πρωτεϊνών μεγάλης διάρκειας ζωής και κυτταροπλασματικών οργανιδίων.

Η διαδικασία της αυτοφαγίας αρχίζει με την δημιουργία του αυτοφαγοσώματος μέσω της ενεργοποίησης του Atg12 συστήματος που σχηματίζεται από τα Atg12, Atg5 και Atg16. Το φορτίο που πρόκειται να αποδομηθεί αναγνωρίζεται από το αυτοφαγόσωμα το οποίο στην συνέχεια αφού ενσωματώσει το φορτίο μεταφέρεται στην περιοχή του λυσοσώματος. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αυτοφαγόσωμα και το λυσοσώμα έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία του αυτοφαγολυσοσώματος το οποίο με την σειρά του απελευθερώνει το περιεχόμενό του στον λυσοσωμικό σωλήνα και αυτό αποικοδομείται από όξινες υδρολάσες.<sup>136</sup> Επίσης το Atg7 ένζυμο αποτελεί ένα κύριο ένζυμο για την δημιουργία του αυτοφαγοσώματος καθώς και την μεταφορά του φορτίου στο λυσοσώμα. Άρα από όσα προαναφέρθηκαν γίνεται κατανοητό ότι τα Atg γονίδια εμπλέκονται σε αρκετές διαδικασίες όπως είναι η διατήρηση της ομοιόστασης, ο ενδοκυτταρικός έλεγχος καθώς και η έμφυτη ανοσία.

Όσο αφορά την σχέση της αυτοφαγίας και της γήρανσης έρευνες αναφέρουν ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας φαίνεται να παρουσιάζει μια αρκετά μεγάλη μείωση με το πέρασμα των χρόνων κάτι το οποίο γίνεται αντιληπτό κυρίως μέσω της μειωμένης έκφρασης και δραστηριότητας των ενζύμων της οικογένειας Atg και την αλλαγή της έκφρασης της LC3 και της p62 πρωτεΐνης.<sup>137,138</sup> Αντιθέτως πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν απέδειξαν ότι η υπερέκφραση των Atg5 και Atg12 έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή των επιπτώσεων της γήρανσης και κατεπέκταση την αύξηση της διάρκειας ζωής τόσο των βλαστικών κυττάρων όσο και του οργανισμού.<sup>139,140</sup> Επίσης η μειωμένη δράση της αυτοφαγίας σε ηλικιωμένους

οργανισμούς έχει συνδεθεί και με αρκετές νόσους όπως είναι το Alzheimer, το Parkinson, ο καρκίνος και η καρδιακή δυσλειτουργία.<sup>137</sup> Μέσω αρκετών ευρετών που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της αυτοφαγίας και του οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση των ROS πέρα του φυσιολογικού έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση βλαβών στο κύτταρο με αποτέλεσμα την κυτταροτοξικότητα και άρα την επιτάχυνση της διαδικασίας της γήρανσης. Επομένως για αντιμετωπιστεί η κατάσταση αυτή είναι απαραίτητο να ενεργοποιηθεί η διαδικασία της αυτοφαγίας μέσω διάφορων μονοπατιών όπως είναι ROSNRF2-P62-αυτοφαγία, ROS-HIF1-BNIP3 / NIX- αυτοφαγία, ROS-FOXO3-LC3 / BNIP3-αυτοφαγία, και ROSTIGAR- αυτοφαγία.<sup>104</sup> Αρχικά αυτό το οποίο συμβαίνει είναι ότι η αύξηση των ROS στα μιτοχόνδρια προκαλεί την ενεργοποίηση του γονιδίου ATG4, το οποίο με την σειρά του ρυθμίζει το ATG8 ώστε να αρχίσει ο σχηματισμός των αυτοφαγοσωμάτων κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί στην ζύμη.<sup>141</sup>

Κατά την διάρκεια της γήρανσης έχει παρατηρηθεί μείωση της διαδικασίας της αυτοφαγίας με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται συσσώρευση των βλαβών οι οποίες αποτελούν συνέπεια του οξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά κάποιες μελέτες που έχουν γίνει αναφέρουν ότι υπάρχουν περιπτώσεις όπου φαίνεται η αυτοφαγία να προάγει την διαδικασία της γήρανσης μέσω της υπερέκφρασης του ULK3. Αυτό το γεγονός παρουσιάζει τον αμφιλεγόμενο ρόλο της αυτοφαγίας στην διαδικασία της γήρανσης και γιαυτό ακριβώς τον λόγο αποτελεί βασικό αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνών.<sup>142</sup> Ωστόσο η κατάλληλη αυτοφαγία είναι σε θέση να διατηρήσει τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων διότι οδηγεί σε απαλλαγή των κυττάρων από τις βλάβες και την τοξικότητα που έχουν προκληθεί από το οξειδωτικό στρες.<sup>143, 138</sup> Όπως λοιπόν γίνεται αντιληπτό η γήρανση επιτυγχάνεται μέσω καταστολής της αυτοφαγίας και επομένως η διάρκεια ζωής των βλαστικών κυττάρων φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δύναμη που έχει η αυτοφαγική διαδικασία.<sup>144, 143</sup> Επιπλέον μια διαδικασία η οποία φαίνεται να έχει άμεση συσχέτιση με την αυτοφαγία είναι η CR (θερμιδικός περιορισμός). Η CR αποτελεί μια διαδικασία η οποία μειώνει την ενεργειακή ανισορροπία στον οργανισμό μέσω χαμηλής θερμοκρασίας, χαμηλού μεταβολισμού και παραγωγή χαμηλών επιπέδων ROS.<sup>145</sup> Επίσης πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η CR είναι δυνατόν να οδηγήσει καταστολή της μεθυλίωσης αρκετών γονιδιωματικών περιοχών κάτι το οποίο αποτελεί επερχόμενο της γήρανσης.<sup>146</sup> Επί προσθέτως μια πρόσφατη μελέτη που έγινε σε πιθήκους αναφέρει

ότι η CR είχε σαν αποτέλεσμα την βελτίωση της ζωής των ενήλικων πιθήκων καθώς και την αποτροπή της εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο διαβήτης.<sup>147</sup> Ο βασικός μηχανισμός απόκρισης του στην CR φαίνεται να είναι η επεξεργασία γονιδίων RNA και ο επαναπρογραμματισμός.<sup>148</sup>

Εκτός από την CR, η αυτοφαγία είναι δυνατόν να προκληθεί από την ανοξία, το στρες και τις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Οι περισσότερες μελέτες όμως έχουν επικεντρωθεί στην διερεύνηση της διέγερσης της αυτοφαγίας μέσω της CR διότι αποτελεί το πιο συχνό φαινόμενο.<sup>149,150</sup> Ένας από τους βασικούς στόχους της CR είναι η αποτελεσματική ανακύκλωση των μιτοχονδρίων κάτι το οποίο πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης της SIRT1 που αλληλεπιδρά με τον παράγοντα PGC-1 με σκοπό την αναδιοργάνωση του μεταβολισμού των μιτοχονδρίων.<sup>151</sup> Επομένως μέσω της διαδικασίας αυτής επιτυγχάνεται ανακύκλωση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων (μιτοφαγία) κάτι το οποίο αποδύκνυει ότι η αυτοφαγία που ενεργοποιείται μέσω της CR κατέχει πού σημαντικό ρόλο στην αντιγήρανση τόσο των βλαστικών κυττάρων όσο και του οργανισμού.<sup>152,153,154</sup> Τα μονοπάτια τα οποία έχουν βρεθεί να ρυθμίζουν την CR είναι, το μονοπάτι της SIRTUIN, το μονοπάτι της πρωτεΐνης κινάσης αδενοσίνης (AMPK) καθώς και το mTOR.<sup>133</sup> Ο κύριος ρόλος της οικογένειας των πρωτεϊνών SIRT είναι η ρύθμιση της προτεώστασης και η γονιδιωματική σταθερότητα.<sup>155</sup> Επιπλέον ο παράγοντας AMPK αποτελεί ανιχνευτή θρεπτικών συστατικών εφόσον επιτηρεί την αναλογία ATP/AMP και στοχεύει τόσο στην διατήρηση της ομοιόστασης όσο και των κυτταρικών λειτουργιών.<sup>156</sup> Η ενεργοποίηση του AMPK συμβαίνει όταν η αναλογία ATP/AMP<sup>157</sup> μειώνεται, δηλαδή όταν έχουμε σύνθεση της ATP σε καταστάσεις υποξίας, ισχαιμίας και χαμηλών θρεπτικών συστατικών καθώς και έπειτα από την κατανάλωση της ATP εξαιτίας άσκησης ή νηστείας.<sup>158</sup> Επίσης η CR οδηγεί σε μείωση της αναλογίας αυτής και επομένως ενεργοποίηση του παράγοντα AMPK.<sup>98</sup> Όσο αφορά το μονοπάτι σηματοδότησης mTOR, ρυθμίζεται αρνητικά από την CR με σκοπό την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Το mTOR μονοπάτι αποτελείται από δυο επιμέρους σύμπλοκα το mTORC1 και το mTORC2 τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αυτοφαγίας. Πιο συγκεκριμένα το mTORC1 σχετίζεται με τον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων ενώ το mTORC2 είναι δυνατόν να καταστέλλει την αυτοφαγία μέσω της οδού σηματοδότησης Akt/FOXO3A.<sup>159</sup> Επομένως αυτό το

οποίο συμβαίνει είναι ότι αρχικά η CR ενεργοποιεί το AMPK το οποίο με την σειρά του φωσφορυλιώνει το σύμπλοκο TSC2 ώστε να ανασταλλεί το mTORC1.<sup>160</sup> Στην συνέχεια η AMPKα καταστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση TOR eFectorS6K.<sup>161</sup> Από την άλλη πλευρά υπάρχει και άλλη μια οδό μέσω της οποίας ενεργοποιείται η αυτοφαγία στα θηλαστικά η οποία περιλαμβάνει την απευθείας φωσφορυλίωση του ULK1 από την AMPK.<sup>35</sup> Δηλαδή στην περίπτωση όπου υπάρχουν υψηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα του mTORC1 το οποίο με την σειρά του αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ των AMPK και ULK1 ώστε να μην πραγματοποιηθεί η διαδικασία της αυτοφαγίας. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει μείωση των θρεπτικών συστατικών στον οργανισμό λαμβάνει χώρα φωσφορυλίωση του ULK1<sup>162, 163,164</sup> ενώ υπο συνθήκες υποξίας η CR με σκοπό να ενεργοποιηθεί η αυτοφαγία προβαίνει σε ρύθμιση του μονοπατιού AMPK-mTOR, κάτι το οποίο αυξάνει την επιβίωση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.<sup>165,121</sup> Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η μεταφορμίνη παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την CR καθώς ενεργοποιεί την αυτοφαγία μέσω της AMPK και άρα είναι αρκετά σημαντική για την μείωση των βλαβών και της τοξικότητας που είναι αποτελέσματα της γήρανσης.<sup>166</sup> Επίσης μια άλλη ουσία η οποία βρέθηκε να σχετίζεται με την αυτοφαγία και άρα την επέκταση της ζωής των βλαστικών κυττάρων είναι η σπερμιδίνη μέσω της παραγωγής επιθηλιακών βλαστικών κυττάρων και την αναγέννηση μυϊκών βλαστοκυττάρων.<sup>167</sup> Τέλος η ραπαμυκίνη έχει ανακαλυφθεί ότι επίσης επάγει την διαδικασία της αυτοφαγία με αποτέλεσμα να επεκτείνει την διάρκεια ζωής. Η ουσία αυτή και τα παράγωγά της έχουν πάρει έγκριση από το FDA για έλεγχο απόρριψης μοσχεύματος νεφρού καθώς επίσης βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

### **3.4 Βλάβες στο γενετικό υλικό και γήρανση βλαστοκυττάρων**

Η συσσώρευση βλάβης του γενετικού υλικού αποτελεί μια δαιδικασία που φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την γήρανση.<sup>168, 169,170</sup> Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η απενεργοποίηση των γονιδίων επιδιόρθωσης FEN1, RAD51, EXO1 καθώς και του BRAC1 έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση βλαβών του DNA και επομένως την πρόκληση γήρανσης των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα η μειωμένη έκφραση του γονιδίου RB1 έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του δυναμικού διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων.<sup>171, 172,173</sup> Με σκοπό να προσδιοριστεί καλύτερα η σχέση ανάμεσα στην γήρανση και την συσσώρευση βλαβών του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκαν αρκετά πειράματα κατά τα οποία έγινε η σύγκριση μεταξύ νεαρών και ηλικιωμένων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων όσο αφορά την απόκριση τους σε βλάβες του γενετικού υλικού που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών ανέφεραν ότι τα ηλικιωμένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα παρουσίασαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και μειωμένη ικανότητα στην επιδιόρθωση βλαβών.<sup>174, 175</sup> Επίσης οι βλάβες στο γενετικό υλικό εκτός από το οξειδωτικό στρες είναι δυνατόν να προκληθούν και από ακτινοβολία καθώς και χημικά φάρμακα. Για να γίνει λοιπόν καλύτερα κατανοητή η απόκριση των βλαστικών κυττάρων στις βλάβες του γενετικού υλικού ανάλογα με την ηλικία έγιναν μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν δυο ουσίες που προκαλούν θραύση της διπλής έλικας του γενετικού υλικού και είναι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> καθώς και η BLM. Οι μελέτες αυτές λοιπόν απέδειξαν ότι τα ηλικιωμένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα στα οποία προκλήθηκαν βλάβες μέσω αυτών των δυο ουσιών παρουσίασαν αρκετά μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα νεαρά βλαστοκύτταρα. Άρα γίνεται αντιληπτό ότι τα ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα τοξικότητας που προκαλείται από τα ROS που απελευθερώνονται μέσω του οξειδωτικού στρες εξαιτίας της μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας που έχουν. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια μέτρηση της ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPX, CAT, Zn-SOD και Mn-SOD τόσο σε νεαρά όσο και σε ηλικιωμένα βλαστοκύτταρα κάτι το οποίο απέδειξε ότι πραγματικά υπάρχει μειωμένη δράση των ενζύμων αυτών στα γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.

Επι προσθέτως μέσω αρκετών ερευνών μελετήθηκαν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών. Οι βλάβες λοιπόν που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες συχνά επιδιορθώνονται μέσω του μηχανισμού εκτομής βάσης BER<sup>176</sup>, ενώ οι θραύσεις διπλής έλικας επιδιορθώνονται μέσω των μηχανισμών HR( ομόλογου ανασυνδυασμού) ή του NHEJ( μη ομόλογου ανασυνδυασμού).<sup>177</sup> Έτσι μέσω πειραμάτων έγινε μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων επιδιόρθωσης τόσο για τον HR όσο και τον NHEJ και BER μηχανισμό. Τα ένζυμα τα οποία μελετήθηκαν ήταν XRCC1, OGG1 και το APE1 για τον BER καθώς και τα BRCA2, XRCC4, BRCA1, Ku70 και Rad51 για τους HR και NHEJ μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών κατέδειξαν ότι υπάρχει σημαντική μείωση των ενζύμων αυτών στα ηλικιωμένα βλαστοκύτταρα σε σχέση με τα νεαρά κάτι το οποίο ίσως ευθύνεται για την μειωμένη απόκριση στις βλάβες των γηρασμένων βλαστικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα αρκετά φανερά γίνονται οι επιπτώσεις της γήρανσης στα βλαστικά κύτταρα του δέρματος και των τριχοθυλακίων. Με το πέρασμα των χρόνων και την αύξηση της ηλικίας παρατηρείται γήρανση του δέρματος και αραιώση των μαλλιών καθώς και γκριζάρισμά τους. Όλα αυτά αποτελούν συνέπεια της συσσώρευσης βλαβών στα βλαστικά κύτταρα και της αδυναμίας τους να επιδιορθώσουν τις βλάβες αυτές του γενετικού υλικού.<sup>178,179, 180</sup> Επίσης οι επιπτώσεις της γήρανσης γίνονται αισθητές και στα βλαστικά κύτταρα του αναπαραγωγικού συστήματος. Ειδικότερα η σπερματογένεση είναι μια διαδοκασία η οποία συνεχίζεται σε όλη την διάρκεια της ζωής με αποτέλεσμα τα σπερματογλοιακά βλαστοκύτταρα να συσσωρεύουν βλάβες στο γενετικό υλικό τους όπου η αδυναμία επιδιόρθωσής του οδηγεί σε απώλεια της γονιμότητας και ανάπτυξη διάφορων ασθενειών.<sup>181, 182, 183</sup> Επομένως αυτό το οποίο γίνεται αντιληπτό μέσω αρκετών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί είναι ότι η γήρανση έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη απόκριση των βλαστικών κυττάρων στις βλάβες του DNA καθώς και την μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Τα βλαστικά κύτταρα είναι αρκετά ευαίσθητα σε βλάβες του γενετικού υλικού εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας ζωής τους. Επίσης τα κύτταρα διαρκώς επιβάλλονται σε οξειδωτικό στρες τόσο από ενδογενές όσο και από εξωγενές παράγοντες. Κατά την διάρκεια της γήρανσης παρατηρείται αρκετά μεγάλη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των βλαστικών κυττάρων κάτι το οποίο ενισχύει ακόμα περισσότερο την ευαισθησία τους σε βλάβες. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο η αύξηση παραγόντων πρόληψης του οξειδωτικού στρες και η ενίσχυση των

μηχανισμών επιδιόρθωσης είναι δυνατόν να συμβάλλουν στην προστασία των βλαστοκυττάρων και την επέκταση της διάρκειας ζωής τους<sup>184, 185</sup>

### **3.5 Φάση ηρεμίας και γήρανση**

Η κατάσταση ηρεμίας αποτελεί μια προστατευτική κατάσταση για τα βλαστικά κύτταρα αλλά ταυτόχρονα είναι επιρρεπής σε διαταραχές όσο αφορά τα ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα. Οι διαταραχές κατά την φάση ηρεμίας είναι δυνατόν να επηρεάσουν την γόνιδιακή έκφραση καθώς και τον μεταβολισμό καά την έξοδο των κυττάρων απο την φάση αυτή. Οι παραγόντες που συμβάλλουν στην δημιουργία προβλημάτων σε ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στην φάση G0 είναι εξωγενείς όπως είναι η αύξηση της φλεγμονής και οι αλλαγή στην συγκέντρωση διάφορων μεταβολιτών καθώς και ενδογενής στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η συσσώρευση βλαβών του γενετικού υλικού, οι επιγενετικές αλλαγές και οι βλάβες στην λειτουργία των μιτοχονδρίων. Δήλαδή αυτό το οποίο διαπιστώνεται μέσω αρκετών μελετών είναι ότι η γήρανση συμβάλλει στην αποτυχία συντήρησης της κατάστασης ηρεμίας των βλαστικών κυττάρων και στην ελλατωματική εξοδό τους απο αυτήν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της λειτουργίας των βλαστοκυττάρων και κατεπέκταση την διαταραχή της ιστικής ομοιόστασης με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με την γήρανση.

Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι η κατάσταση ηρεμίας έχει αρνητικές επιδράσεις στην επιδιόρθωση βλαβών του γενετικού υλικού. Μέσω πρόσφατων ερευνών αναφέρεται ότι τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA.<sup>2</sup> Επιπλέον αλλή μια επίπτωση της γήρανσης στην φάση G0 του κυτταρικού κύκλου είναι ότι τα ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν ανεπάρκεια απόκρισης στην σηματοδότηση βλάβης εξαιτίας σφαλμάτων που συμβαίνουν στην PP4o η οποία είναι υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση της γH2AX που αποτελεί σήμα υπάρξης



βλάβης του γενετικού υλικού.<sup>186</sup> Επίσης ένα ακόμη μειονέκτημα της φάσης G0 των βλαστικών κυττάρων είναι ότι κύτταρα που βρίσκονται στην κατάσταση αυτή για να επιδιορθώσουν τις βλάβες χρησιμοποιούν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης NHEJ ο οποίος είναι αρκετά επιρρεπής σε λάθη σε σχέση με τον ομόλογο ανασυνδυασμό HR. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ηρεμιστικά βλαστικά κύτταρα να παρουσιάζουν μεγαλύτερη γονιδιωματική αστάθεια σε σχέση με τα ενεργά βλαστοκύτταρα.<sup>2,187,188</sup> Ακόμη μελέτες έχουν αποδείξει ότι η φλεγμονή κατά την οποία απελευθερώνονται φλεγμονώδη κυτοκίνες και αποτελεί συνέπεια της γήρανσης, επιδρά στα βλαστικά κύτταρα της G0 φάσης εγκλωβίζοντάς τα, σε αυτήν. Βέβαια όπως αναφέρεται σε περίπτωση που τα ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα καταφέρουν να εξέλθουν από την κατάσταση αυτή παρουσιάζουν αρκετά καλή λειτουργικότητα.<sup>189</sup> Επιπροσθέτως, τα ηρεμιστικά βλαστικά κύτταρα στηρίζονται περισσότερο στην γλυκόλυση κατά το οποίο εξαιτίας της μειωμένης ATP έχει σαν αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση στα μιτοχονδριακά ερεθίσματα.<sup>190</sup> Πράσφατες μελέτες επίσης αναφέρουν ότι τα ενεργά βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς διατήρησης της πρωτεϊνικής ομοιόστασης σε σύγκριση με τα βλαστοκύτταρα που βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας. Πιο αναλυτικά αποδείχθηκε ότι τα ηρεμιστικά βλαστικά κύτταρα έχουν μεγαλύτερα λυσοσώματα και πιο πολλά αδιάλυτα συσσωματώματα κάτι το οποίο δείχνει ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην ενεργοποίησή τους, η οποία όμως είναι δυνατόν να αποκατασταθεί με την βοήθεια του αναστολέα του mTOR ή τον περιορισμό θρεπτικών συστατικών.<sup>191</sup> Τέλος στοιχεία αναφέρουν ότι η αυτοφαγία αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα ο οποίος επηρεάζει την κατάσταση ηρεμίας των βλαστοκυττάρων. Η μείωση της αυτοφαγίας που συμβαίνει κατά την διάρκεια της γήρανσης έχει σαν αποτέλεσμα την παραμονή των κυττάρων στην φάση G0 εξαιτίας διάφορων μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια.<sup>143</sup>

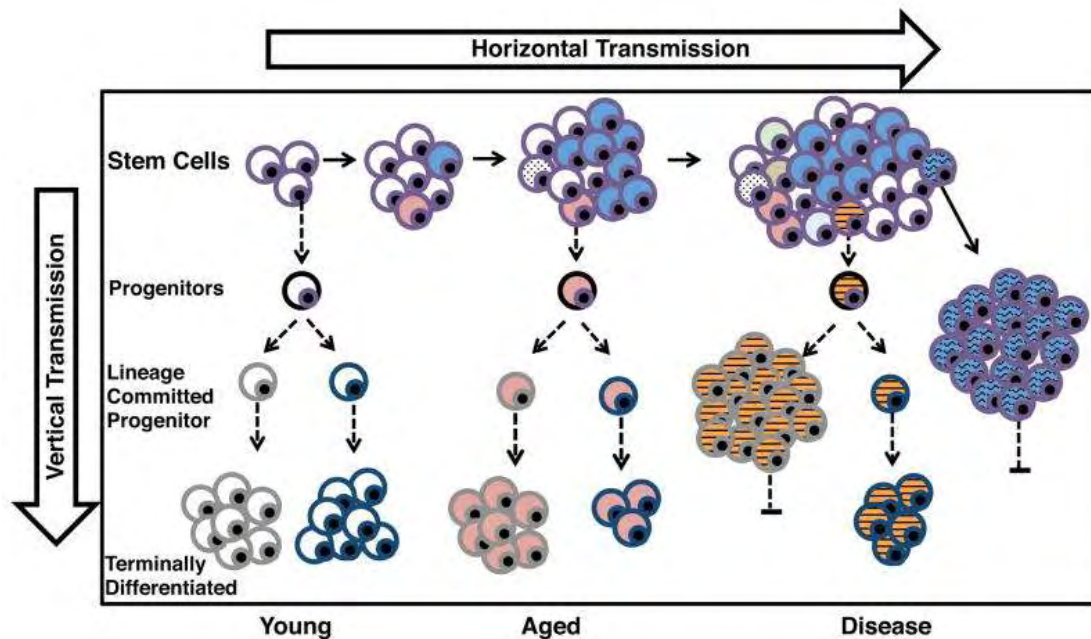
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **4.1 Επιγενετικοί παράγοντες**

Δυο βασικοί επιγενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την μείωση και την εξασθένηση των βλαστοκυττάρων είναι η μεθυλίωση του DNA και η τροποποίηση των ιστονών<sup>192,193,1</sup>. Η επιγενετική ρύθμιση δεν σχετίζεται με αλλαγές στην αλληλουχία του DNA αλλά περιλαμβάνει τις αναστρέψιμες κληρονομήσιμες αλλαγές στην λειτουργία των γονιδίων. Η επιγενετική ρύθμιση έχει σαν κύρια λειτουργία τον συντονισμό όλων των κυττάρων ενός οργανισμού, ώστε να κατέχουν την ίδια



Εικόνα 9: Απεικόνιση των επιγενετικών μηχανισμών της μεθυλίωσης του DNA ,της τροποποίησης των ιστονών και τα microRNA.



Εικόνα 10: Η διαίρεση των βλαστικών κυττάρων σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις που είναι η νεαρή ηλικία, η γήρανση και η ασθένεια.

## 4.2 Μεθυλίωση DNA

Η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα σε όλο το μήκος του γονιδιώματος. Κυριώς εμφανίζεται σε περιοχές με την ονομασία CpG νησίδες, όπου πρόκειται για περιοχές πλούσιες σε θυμίνη και κυτοσίνη. Η μεθυλίωση πραγματοποιείται από τα ένζυμα DNA μεθυλοτρανσφεράσες. Τα ένζυμα αυτά προσθέτουν μια μεθυλομάδα στον πέμπτο άνθρακα της κυτοσίνης (C) που προηγείται της γουανίνης (G) στις CpG νησίδες. Οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες διακρίνονται σε

δυο κατηγορίες τις DNMT3A και DNMT3B οι οποίες δρουν σε μη μεθυλιωμένες περιοχές και τις μετατρέπουν σε μεθυλιωμένες και υπάρχει και η DNMT1 που δρα σε μεθυλιωμένες περιοχές με σκοπό την διατήρηση της μεθυλιωμένης κατάστασης. Η μεθυλοτρανσφεράση DNMT1 διατηρεί τις ημεθυλιωμένες περιοχές στον νεοσυντιθέμενο κλώνο που δημιουργούνται κατά την διαδικασία της αντιγραφής.

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αποδυναμώνουν ότι, το ένζυμο DNMT1 σχετίζεται επίσης, με την διατήρηση της ισοροπίας ανάμεσα στην διαφοροποίηση και την αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα στο δέρμα η καταστολή του DNMT1 έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη αυτοανέωση και την πρόωρη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του δέρματος. Η συνέπεια αυτού είναι η απώλεια των ιστών.<sup>195</sup> Όσο αφορά την δράση της μεθυλοτρανσφεράσης σε άλλα είδη βλαστικών κυττάρων, πειράματα που έχουν γίνει αναφέρουν πως η απώλεια του συγκεκριμένου ενζύμου σε νευρικά βλαστοκύτταρα (NSCs) οδηγεί σε πρόωρη διαφοροποίησή τους προς αστροκύτταρα<sup>196, 197</sup> και στα εντερικά βλαστικά κύτταρα παρατηρείται πλήρη απώλεια της ικανότητας διαφοροποίησής τους.<sup>198</sup> Επιπροσθέτως η απώλεια του DNMT1 σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση και των δυο ιδιοτήτων τους, αυτοανανέωσής τους και της διαφοροποίησής τους.<sup>199,200</sup> Έχοντας υπόψη, τα όσα προαναφέρθηκαν για τις συνέπειες της απώλειας της δραστηριότητας του ενζύμου DNMT1 στα βλαστικά κύτταρα, παρατηρούμε ότι παρουσιάζονται παρόμοιοι φαινότυποι με αυτούς της γήρανσης όπως είναι, άνιση διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων με το να είναι αυξημένη προς την μυελογένεση, αύξηση του αριθμού των αστροκυττάρων του νευρικού συστήματος και γενικότερα μειωμένη και μη ισοροπημένη τόσο αυτοανανέωση όσο και διαφοροποίηση σε πολλά είδη βλαστικών κυττάρων. Άρα τα δεδομένα αυτά φανερώνουν την άμεση συσχέτιση της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων σε πολλούς ιστούς με την αλλοιωμένη μεθυλίωση του DNA.

Επιπλέον, πάρα πολλές μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια προσπαθήσαν να διευκρινίσουν τον ρόλο των δυο μεθυλοτρανσφερασών DNMT3A και DNMT3B στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Αυτό το οποίο αποδείχθηκε είναι ότι, η απώλεια των δυο αυτών ενζύμων οδηγεί στην διαταραχή της διαφοροποίησης και την αύξηση της αυτοανανέωσης σε βάρος άλλων λειτουργιών στα βλαστικά κύτταρα. Επομένως όπως γίνεται αντιληπτό η de novo μεθυλίωση που πραγματοποιείται απο

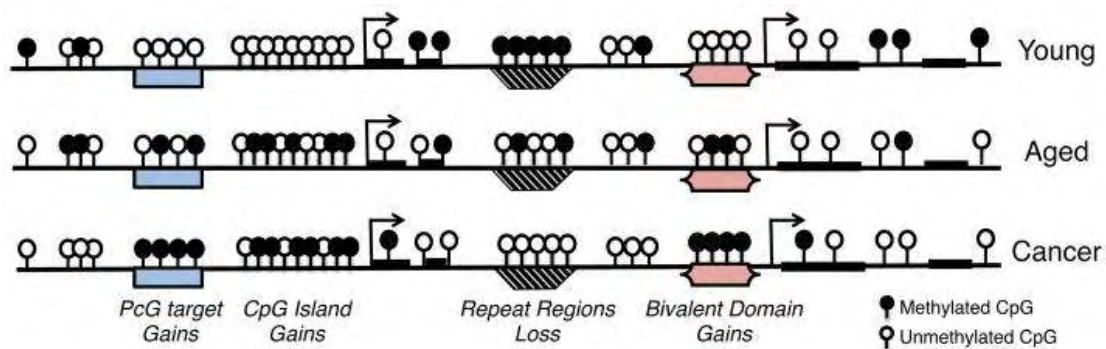
τις δυο μεθυλοτρανσφεράσες αυτές, είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.<sup>201, 202, 203</sup>

Η απομεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται TET. Η διαδικασία της απομεθυλίωσης γίνεται σε πολλά στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την παραγωγή της 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνης (5-hmc). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναλύουν τον ρόλο των ενζύμων απομεθυλίωσης στα βλαστικά κύτταρα. Όπως έχει αποδειχθεί η απώλεια του ενζύμου TET1 στα νευρικά βλαστικά κύτταρα επηρεάζει τον ρυθμό αυτοανανέωσής τους εφόσον προκαλεί μείωση αυτού, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην διαφοροποίησή τους. Επίσης πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια, αναφέρουν ότι η έλλειψη του ενζύμου TET1 στους συγκεκριμένους οργανισμούς έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη μάθηση και μνήμη διότι, η αθξημένη μεθυλίωση που επικρατεί καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων.<sup>204</sup> Επιπλέον απώλεια ενός άλλου ενζύμου απομεθυλίωσης της οικογένειας TET, που είναι το TET3 έχει ως συνέπεια την αύξηση της απόπτωσης στα νευρικά βλαστοκύτταρα και την σημαντική μείωση του πληθυσμού τους. Μια άλλη οικογένεια ενζύμων που έχει μελετηθεί και σχετίζεται με την απομεθυλίωση του DNA είναι GADD45.<sup>205,206,207</sup> Τα ένζυμα της οικογένειας αυτής όπως έχει γίνει γνωστό συμμετέχουν στην απομεθυλίωση αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες που έχουν ως κύριο λόγο την αποκατάσταση βάσεων ή την εκτομή νουκλεοτιδίων.<sup>208</sup> Ο κύριος ρόλος λοιπόν, των ενζύμων της οικογένειας GADD45 είναι η απομεθυλίωση περιοχών του DNA με σκοπό την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση διάφορων ειδών βλαστοκυττάρων.

Διάφορα δεδομένα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην οικογένεια των ενζύμων GADDA αναφέρουν ότι η απώλεια δυο ενζύμων που ανήκουν στην ομάδα αυτή και είναι το GADDA45A και το GADDA45B οδηγεί στην εξασθενημένη απομεθυλίωση του DNA η οποία είναι απαραίτητη ώστε να λάβει μέρος η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.<sup>208</sup> Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση αυτών των δυο παραγόντων σχετίζεται με την πρόωρη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε βάρος της αυτοανανέωσής τους. Επί προσθέτως έχει αποδειχθεί ότι, το GADD45B εμπλέκεται στην διαδικασία της νευρογένεσης.<sup>206</sup> Επομένως από όλα όσα προαναφέρθηκαν είναι κατανοητό ότι προβλήματα που σχετίζονται με την μεθυλίωση του DNA έχουν ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία

των βλαστικών κυττάρων και κατά συνέπεια την εμφάνιση φαινοτύπων που παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με αυτών της γήρανσης. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσο αφορά την συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την ηλικία. Αυτό το οποίο έχει αποδειχθεί από τις αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί είναι ότι σε ηλικιωμένα κύτταρα και ιστούς κυριαρχεί μια κατάσταση υπερμεθυλίωσης του γονιδιώματος.<sup>209,210</sup>

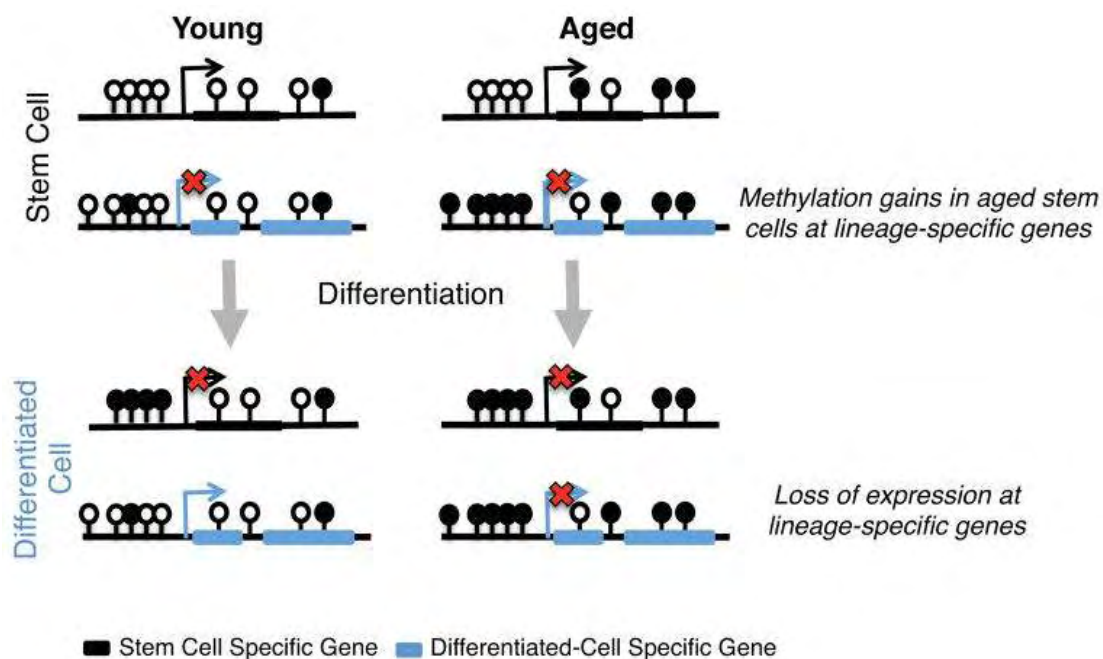
Πιο αναλυτικές μελέτες έχουν γίνει σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Με το πέρασμα του χρόνου όπως έχει ανακαλυφθεί επικρατεί μια άνιση κατανομή των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος, όπου παρατηρείται αυξημένος αριθμός μυελοειδών κυττάρων σε σχέση με τον πληθυσμό των λεμφοειδών κυττάρων. Με σκοπό την ακριβή ανεύρεση της αιτίας του φαινομένου αυτού και την αποφυγή λανθασμένων εκτιμήσεων χρησιμοποιήθηκε από τους ερευνητές που εκπόνησαν τις συγκεκριμένες μελέτες, το σύστημα αλγορίθμου bootstrap ώστε να γίνει η εκτίμηση σφάλματος.<sup>211</sup> Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών, που έγιναν σε περιφερικό αίμα ανθρώπου απέδειξαν πως η υπερμεθυλίωση που επικρατεί σε ηλικιωμένα άτομα συνδέεται άμεσα με την κυτταρική γήρανση και επομένως με την γήρανση των βλαστικών κυττάρων καθώς όλα τα κύτταρα που προκύπτουν από την διαφοροποίηση αυτών κληρονομούν το αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης.<sup>210</sup>



Εικόνα 11: Αναπαράσταση των προτύπων μεθυλίωσης των βλαστικών κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος σε κατάσταση νεότητας, γήρανσης και της ασθένειας του καρκίνου.

Επιπλέον μια άλλη θεωρία που έχει αναπτυχθεί για τα υπερμεθυλίωση του γενετικού υλικού σε μεγάλες ηλικίες και την σχέση της με την λειτουργία των βλαστικών κυττάρων είναι, ότι δεν υπάρχει άμεση επίδραση της υπερμεθυλιωμένης κατάστασης

με τα βλαστοκύτταρα άλλα τα αλλαγμένα πρότυπα μεθυλίωσης επιδρούν σε απογόνους που προκύπτουν από την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Μέλετες που πραγματοποιήθηκαν στηριζόμενες σε αυτή την θεωρία αναφέρουν πως τα αλλοιωμένα πρότυπα μεθυλίωσης που γίνονται φανερά με την ηλικία στο αιμοποιητικό σύστημα συγκεκριμένα, δεν είχαν επίδραση στα παρόντα βλαστικά κύτταρα, αλλά μετέβαλαν την μεταγραφή και την έκφραση γονιδίων στις επόμενες γενεές κυττάρων που προέκυψαν.<sup>212</sup> Άρα τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών επισημαίνουν ότι η τροποποίηση της μεθυλίωσης του DNA που συμβαίνει με το πέρασμα του χρόνου είναι πιθανό να επηρεάζει την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων αλλά οι επιδράσεις των αλλοιωμένων προτύπων μεθυλίωσης όσο αφορά την μεταγραφή γονιδίων εμφανίζονται στα κύτταρα που παράγονται.<sup>2</sup>



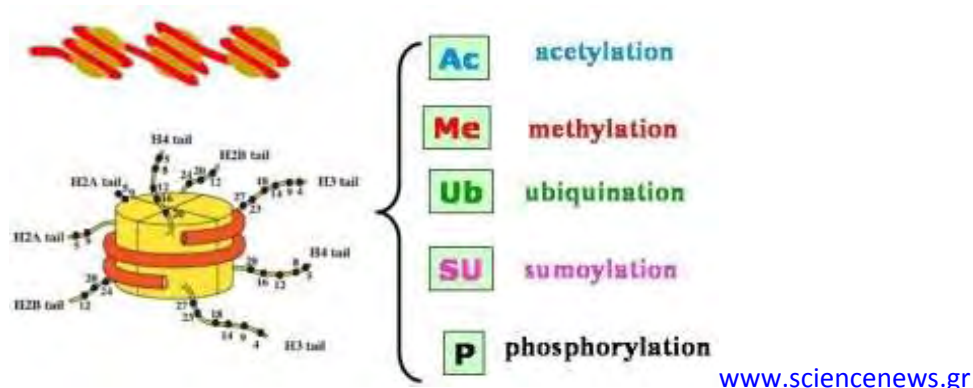
Εικόνα 12: Παρουσίαση της επίδρασης των αλλαγμένων προτύπων μεθυλίωσης που προκύπτουν με την ηλικία, στα κύτταρα που παράγονται μέσω της διαφοροποίησης βλαστικών κυττάρων και κληρονομούν τα συγκεκριμένα πρότυπα.

### 4.3 Τροποποίηση Ιστονών

Οι τροποποιήσεις των ιστονών αποτελούν μια πιο πολύπλοκη διαδικασία σε σχέση με την μεθυλίωση του DNA. Οι τέσσερις βασικές ιστόνες είναι H2A, H2B, H3 και H4.



Οι πρωτεΐνες αυτές δημιουργούν ένα οκταμερές γύρω από το οποίο περιλείεται το DNA μήκους 146 ζεύγη βάσεων και κατά αυτόν τον τρόπο συμπυκνώνεται σε μέγεθος. Επίσης υπάρχει και η ιστόνη H1 που ως κύριο ρόλο έχει την σταθεροποίηση του οκταμερούς με το γενετικό υλικό. Η πρόσδεση του DNA στο οκταμερές των ιστονών πραγματοποιείται διότι οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες που αποτελούνται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως είναι η λυσίνη και η αργινίνη σε αντίθεση με το γενετικό υλικό το οποίο έχει αρνητικό φορτίο. Από το οκταμερές που δημιουργούν οι ιστόνες προεξέχουν οι N-τελικές ουρές τους, στις οποίες πραγματοποιούνται οι τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση, η σουμοϋλίωση και η ουβικιτίνωση. Πιο συγκεκριμένα η ακετυλίωση των ιστονών γίνεται από τα ένζυμα HATs, που μεταφέρουν μια ακετυλοομάδα στο αμινοξύ λυσίνη. Η αποακετυλίωση πραγματοποιείται από μια άλλη ομάδα ενζύμων που ονομάζονται HDACs. Όσο αφορά την μεθυλίωση των ιστονών είναι μια τροποποίηση που γίνεται από τα ένζυμα HMTs και περιλαμβάνει την μεταφορά μεθυλοομάδας, ενώ η απομεθυλίωση που είναι η αντίστροφη διαδικασία γίνεται από τα ένζυμα HDMs. Οι τροποποιήσεις των ιστονών που προαναφέρθηκαν ρυθμίζουν κυρίως την μεταγραφική δραστηριότητα. Πιο αναλυτικά θα αναφερθούμε στην ακετυλίωση και την μεθυλίωση διότι είναι οι πιο καλά μελετημένες διαδικασίες στα βλαστοκύτταρα.



Εικόνα 13: Παρουσίαση του οκταμερές των ιστονών, των N-τελικών τους άκρων και των τροποποιήσεων που υφίσταντο.

### Ακετυλίωση ιστονών

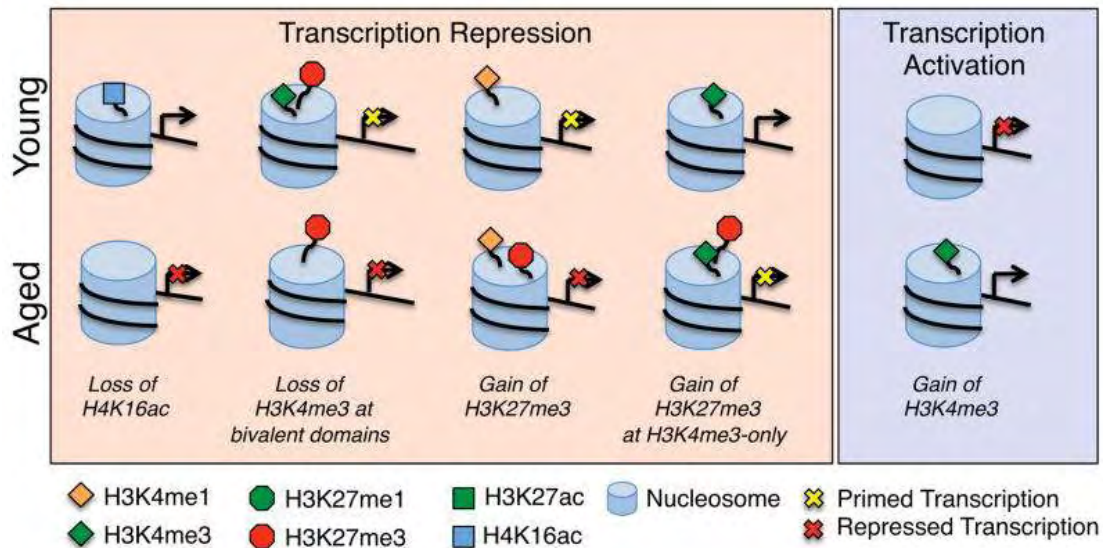
Η ακετυλίωση των ουρών των ιστονών έχει σαν αποτέλεσμα την αποσυμπύκνωση της χρωματινής σε ένα μικρό βαθμό και επομένως τη μεγαλύτερη μεταγραφική ικανότητα του DNA. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την ακετυλίωση και την αποακετυλίωση των ιστονών υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση ώστε να επιτυγχάνεται με ακρίβεια η κυτταρο-ειδική έκφραση.

Επι προσθέτως, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της ακετυλίωσης των ιστονών και των ενζύμων που εμπλέκονται σε αυτή (HATs), στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Πειράματα που έγιναν σε ποντίκια τα οποία είχαν τροποποιηθεί ώστε να μην εκφράζουν τα ένζυμα ακετυλίωσης HATs στα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, απέδειξαν ότι η απώλεια αυτή είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη απόπτωση των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος και την παρουσία σοβαρής αναιμίας στον οργανισμό.<sup>213</sup> Άρα η σωστή ακετυλίωση των ιστονών είναι απαραίτητη για την αυτοανανέωση και την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος.

Επιπλέον τα ένζυμα ακετυλίωσης είναι σημαντικά για την διατήρηση της ομοιόστασης και την λειτουργικότητα των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Πιο αναλυτικά, η CBP πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των ακετυλοντρασφερασών, έχει ως κύριο ρόλο την ακετυλίωση των αστροκυττάρων και γονιδίων των ολιγοδενδριτικών κυττάρων. Η απώλεια της συγκεκριμένης πρωτεΐνης οδηγεί σε προβλήματα στον αριθμό των κυττάρων που ακετυλιώνει.<sup>90</sup> Επίσης η μείωση της λειτουργικότητας του ενζύμου ακετυλίωσης Trrap έχει σαν συνέπεια την πρόωρη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων.<sup>214</sup> Επιπλέον άλλοι δυο παράγοντες της οικογένειας των HATs ενζύμων είναι ο Moz και ο MORF, για τους οποίους μελέτες που έχουν γίνει, συνδέουν την λειτουργία τους με την σωστή διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων.<sup>215,216</sup> Απο την άλλη πλευρά, τα ένζυμα αποακετυλίωσης HDAC χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες και έχει αποδειχθεί ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Τα ένζυμα της κατηγορίας HDAC I φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια των Hdac1 και Hdac2 ενζύμων στα εντερικά βλαστικά κύτταρα οδηγεί σε μείωση της ικανότητας διαφοροποίησής τους, αλλαγμένη πόλωση και αυξημένο ρυθμό κυτταρικού θανάτου.<sup>217,218</sup> Όσο αφορά το αιμοποιητικό σύστημα η απώλεια των ενζύμων της HDAC I κατηγορίας έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των κυττάρων του μυελού των οστών εξαιτίας

της αλλοιωμένης διαφοροποίησης,<sup>219</sup> καθώς και την απώλεια μεγάλου αριθμού βλαστικών κυττάρων.<sup>220</sup> Όπως είναι φανερό τα αποτελέσματα της μη λειτουργικότητας των ενζύμων αυτών δεν σχετίζονται με την ικανότητα αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων, αλλά με τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης εξαιτίας της αλλοιωμένης διαφοροποίησης τους. Παρομοίως, με το αιμοποιητικά και εντερικά βλαστικά κύτταρα, η καταστολή των ενζύμων HDAC της κατηγορίας I με την χρήση φαρμάκων στα νευρικά βλαστοκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της διαφοροποίησής τους και επομένως την αύξηση της απόπτωσης.<sup>221</sup> Επίσης η αναστολή κάποιων ενζύμων της κατηγορίας HDAC I και HDAC II στα νευρικά βλαστικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι οδηγεί στην αυξημένη έκφραση του Cdkn1a, ο οποίος είναι ένας από τους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Το αποτέλεσμα της αλλαγής της έκφρασης αυτού του παράγοντα είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.<sup>222</sup> Η κατηγορία ενζύμων αποακετυλίωσης HDAC III περιλαμβάνει την οικογένεια Sirtuin. Τα ένζυμα της κατηγορίας III για να δράσουν χρειάζονται NAD<sup>+</sup> σε σχέση με τα ένζυμα των υπόλοιπων κατηγοριών που χρησιμοποιούν ως συμπάραγοντα το Zn<sup>+</sup>. Ο παράγοντας SIRT1 που ανήκει στην οικογένεια αυτή των ενζύμων αποακετυλίωσης, φαίνεται να συνδέεται με την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς χονδροκύτταρα και κύτταρα των οστών.<sup>223</sup> Στα νευρικά βλαστικά κύτταρα η αναστολή του SIRT1 οδηγεί στην αύξηση της αυτοανανέωσης και του πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ολιγοδενδριτικών κυττάρων<sup>224</sup>, ενώ αντιθέτως ο SIRT2 παράγοντας αναστέλλει την διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων προς ολιγοδενδροκύτταρα.<sup>225</sup> Επιπροσθέτως, όπως έχει αποδειχθεί το SIRT1 εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του δέρματος προς κερατινοκύτταρα.<sup>226</sup> Στα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού και μυϊκού συστήματος η αναστολή του SIRT1, συνδέεται με την πρόωρη διαφοροποίηση και την αλλοιωμένη αυτοανανέωση.<sup>227,228</sup> Επιπλέον η μειωμένη έκφραση του παράγοντα αυτού στα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος οδηγεί στην εμφάνιση φαινοτύπων παρόμοιους με αυτούς που εμφανίζονται κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>228,229</sup> Η μελέτη της τροποποίησης των ιστονών στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία, καθώς απαιτείται αρκετά μεγάλος αριθμός ενήλικων βλαστικών κυττάρων τα οποία είναι σπάνια. Έτσι με σκοπό να ξεπεραστούν τα εμπόδια αυτά χρησιμοποιήθηκε ανοσοχρώση ώστε να μελετηθούν τα επίπεδα ακετυλίωσης στη λυσίνη H4K16 σε ενήλικα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Τα δεδομένα που

προήλθαν απο αυτή την ανάλυση φανέρωσαν μειωμένα επίπεδα ακετυλίωσης της λυσίνης σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα κατά την διάρκεια της γήρανσης, σε αντίθεση με τα νεαρά βλαστοκύτταρα. Η αναστολή του Cdc42 στα ενήλικα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα με την χρήση κατάλληλων φαρμάκων είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ακετυλίωσης και την αποκατάσταση ως ένα βαθμό της λειτουργικότητας των συγκεκριμένων βλαστικών κυττάρων.<sup>230</sup> Επομένως όπως είναι κατανοητό αν και δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι παράγοντες που οδηγούν στην μείωση των επιπέδων ακετυλίωσης κατα την διάρκεια της γήρανσης στα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, μέσω των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί έχει αποδειχθεί ότι η υποακετυλίωση που επικρατεί κατά την γήρανση των βλαστικών κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητάς τους να ανταποκρίνονται στις βλάβες του γενετικού υλικού. Άρα η μειωμένη ακετυλίωση συμβάλλει στην συσσώρευση βλαβών του DNA στα βλαστικά κύτταρα με αποτέλεσμα με το πέρασμα των χρόνων να επέρχεται ο φαινότυπος της γήρανσης.<sup>231,201</sup>



Εικόνα 14: Σχηματική παρουσίαση της τροποποίησης των ιστονών σε νεαρά και ενήλικα βλαστικά κύτταρα καθώς και η επίδραση τους στην έκφραση γονιδίων.

## Μεθυλίωση ιστονών

Η μεθυλίωση των ιστονών σε αντίθεση με την ακετυλίωση ρυθμίζει με έμμεσο τρόπο την έκφραση γονιδίων, μεταβάλλοντας τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες. Η μεθυλίωση εμφανίζεται τόσο σε κατάλοιπα λυσίνης, όσο και σε κατάλοιπα αργινίνης στα N-τελικά άκρα των ιστονών που προεξέχουν από το οκταμερές που σχηματίζουν. Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί εξετάζουν την μεθυλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης. Η μεταφορά της μεθυλοομάδας στα τελικά άκρα των ιστονών γίνεται από τα ένζυμα που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs).

Πιο συγκεκριμένα όπως έχει αποδειχθεί, η μεθυλίωση της H3H4 ιστόνης εμπλέκεται στην αυτοανανέωση και την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων.<sup>232,233</sup> Στα βλαστικά κύτταρα του νευρικού συστήματος παρουσιάζεται μεθυλίωση στην H3K4 και στην H3K27ac κοντά σε περιοχές όπου υπάρχουν ενεργά εκφραζόμενα γονίδια τα οποία είναι σημαντικά για την σωστή λειτουργία των νευρικών βλαστοκυττάρων. Επίσης η μεθυλίωση της H3K4 εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές ενισχυτών γονιδίων τα οποία εκράζονται σε μόνο σε διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα.<sup>234</sup> Η μεθυλίωση της H3K4 δεν οδηγεί πάντα στην έκφραση των γονιδίων αλλά αρκετές φορές σχετίζεται με την έναρξη της μεταγραφής.<sup>235</sup> Για παράδειγμα, στα δορυφορικά κύτταρα των μυών τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας παρατηρείται τριμεθυλίωση της H3K4 σε γόνιδια που δεν εκράζονται εκείνη την στιγμή, αλλά είναι μεταγραφικά ενεργά όταν τα δορυφορικά κύτταρα βγουν από την φάση ηρεμίας και ενεργοποιηθούν.<sup>236</sup> Επομένως όπως είναι φανερό, η μεθυλίωση των ιστονών στα βλαστικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την τον μηχανισμό έναρξης της έκφρασης γονιδίων τόσο κατά την διαφοροποίησή τους, όσο και κατά τις φάσεις που αυτά είναι ενεργοποιημένα.

Μελέτες που έχουν γίνει αναφέρουν ότι η αλλοιωμένη μεθυλίωση της H3K4 ιστόνης είναι πιθανόν να συνδέεται με την γήρανση των βλαστοκυττάρων. Έτσι για να διερευνηθεί η συμβολή των αλλαγμένων προτύπων μεθυλίωσης στην γήρανση των βλαστοκυττάρων, απομονώθηκαν αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα από νεαρά και ηλικιωμένα ποντίκια. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών ανέφεραν αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης της H3K4 ιστόνης στα ενήλικα ποντίκια σε σχέση με τα νεαρά. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη μεθυλίωση στα ηλικιωμένα ποντίκια είχε

επιπτώσεις στην έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην γήρανση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων.<sup>237</sup> Αντιθέτως οι μέλετες που πραγματοποιήθηκαν στα δορυφορικά κύτταρα των μυών δεν απέδειξαν σημαντικές διαφορές στην μεθυλιωμένη κατάσταση ανάμεσα στα νεαρά και ηλικιωμένα ποντίκια.<sup>236</sup>

Primary Mark	Secondary Mark	Stem Cell Population	Transcriptional State	Aging	Reference
H3K4me1		NSC	Primed	N.S	<a href="#">Creyghton et al., 2010</a>
	H3K27ac	NSC	Active	N.S	
	H3K27me3/H3K4me3	HSC	Primed	N.S	<a href="#">Cui et al., 2009</a>
		HSC	Active	N.S	
H3K4me2		HSC	Primed	N.S	<a href="#">Attema et al., 2007</a> ; <a href="#">Orford et al., 2008</a>
H3K4me3		Satellite SC	Primed/Active	No sig. change	<a href="#">Liu et al., 2013</a>
	H3K27me3	Satellite SC	Primed	Increase of H3K27me3	

Primary Mark	Secondary Mark	Stem Cell Population	Transcriptional State	Aging	Reference
		HSC	Primed/Active	Increase	<a href="#">Sun et al., 2014</a>
	H3K27me3	HSC	Primed	Increase of H3K27me3	
		Hair Follicle SC	Primed/Active	N.S	<a href="#">Lien et al., 2011</a>
	H3K27me3	Hair Follicle SC	Primed	N.S	
		Mesenchymal SC	Primed/Active	N.S	<a href="#">Noer et al., 2009</a>
	H3K27me3	Mesenchymal SC	Primed	N.S	
<b>H3K27me1</b>		HSC	Active	N.S	<a href="#">Cui et al., 2009</a>
<b>H3K27me3</b>		HSC	Repressive	No sig. change	<a href="#">Sun et al., 2014</a>

Primary Mark	Secondary Mark	Stem Cell Population	Transcriptional State	Aging	Reference
		Satellite	Repressive	Increase	<a href="#">Liu et al., 2013</a>
<b>H4K16ac</b>		HSC	Active	Decrease	<a href="#">Florian et al., 2012</a>

Πίνακας 1: Αναλυτική παρουσίαση των τροποποιήσεων των ιστονών που σχετίζονται με την γήρανση στα βλαστικά κυττάρων και πως επηρεάζουν την μεταγραφική ικανότητα των γονιδίων. Η σημείωση του πίνακα N.S: not studied.

Επι προσθέτως, αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την μεθυλίωση της λυσίνης 27 στην H3 ιστόνη. Η μονομεθυλιωμένη μορφή της H3 ιστόνης (H3K27) σχετίζεται με γονιδιακή έφραση, σε αντίθεση με την δυμεθυλιωμένη (H3K27me2) και τριμεθυλιωμένη (H3K27me3) μορφή της που έχουν σαν αποτέλεσμα την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Η μεθυλίωση της λυσίνης 27 της H3 ιστόνης γίνεται απο το σύμπλεγμα Polycomb2 (PRC2). Το σύμπλεγμα αυτό περιλαμβάνει τις EED και SUZ12 υπομονάδες, καθώς και την καταλυτική υπομονάδα EZH2. Απο πειράματα που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι, το σύμπλεγμα αυτό είναι απαραίτητο για την σωστή λειτουργία αρκετών ειδών βλαστικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα τα δεδομένα των μελετών αναφέρουν ότι, η αυξημένη έκφραση της υπομονάδας EZH2 του PRC2 συμπλέγματος στα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, εμπλέκεται στην διατήρηση της δυναμικότητάς τους.<sup>238</sup> Επίσης πειράματα σε δορυφορικά κύτταρα των μυών αποδεικνύουν πως η καταλυτική υπομονάδα του συμπλέγματος EZH2 είναι σημαντική για την αυτοανανέωσή τους,<sup>239,240</sup> καθώς η απώλεια της έκφρασης της οδηγεί σε μειωμένη αναγεννητική ικανότητα των μυών.<sup>241</sup> Απο την άλλη πλευρά η μειωμένη έκφραση την EED υπομονάδας του



συμπλέγματος PRC2 συνδέεται με απώλεια των ικανοτήτων των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων.<sup>242</sup> Επομένως η μεθυλίωση της λυσίνης 27 της H3 ιστόνης που πραγματοποιείται από το PRC2 σύμπλοκο είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων.

Επιπλέον μελετήθηκε ο παράγοντας EZH1, οποίος φαίνεται να εμπλέκεται στην δραστηριότητα του συμπλέγματος Polycomb2 μέσω της σύνδεσής του με τις υπομονάδες EED και SUZ12. Όπως αναφέρεται ένας από τους ρόλους του EZH1 είναι να αντισταθμίζει την απώλεια της EZH2 υπομονάδας.<sup>243</sup> Επίσης ο παράγοντας EZH1 ρυθμίζει την μονομεθυλίωση εφόσον συνδέεται στην EED υπομονάδα και την δυμεθυλίωση της λυσίνης 27 της H3 ιστόνης στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα η οποία είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση και την αυτοανανέωση των κυττάρων αυτών.<sup>244</sup> Όπως έχει αποδειχθεί η ρύθμιση της μονομεθυλίωσης της H3 ιστόνης από τον EZH1 παράγοντα γίνεται μέσω της πρόσδεσής του στην EED υπομονάδα του συμπλέγματος PRC2.<sup>243</sup> Επειδή όπως προαναφέρθηκε ο EZH1 αντισταθμίζει την μειωμένη έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας EZH2, η απώλεια και των δυο οδηγεί τόσο σε προβλήματα στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων του δέρματος όσο και σε μη διατήρηση της τριμεθυλιωμένης κατάστασης της ιστόνης H3 στην λυσίνη 27.<sup>245</sup> Όσο αφορά την υπομονάδα SUZ12 η απώλεια της έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη αυτοανανέωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, καθώς και την ώθηση της διαφοροποίησής τους περισσότερο προς λεμφοειδή και μυελώδη κυτταρικές σειρές.<sup>246</sup> Επίσης πραγματοποιήθηκαν έρευνες με σκοπό να διερευνηθεί η κατάσταση της μεθυλίωσης της λυσίνης 27 της H3 ιστόνης σε ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών αναφέρουν ότι δεν υπάρχει αλλαγή των σημείων της H3K27me3 ανάμεσα σε νεαρά και ηλικιωμένα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, αλλά αυτό που παρατηρείται είναι μια μεταβολή στην ένταση του σήματος της τριμεθυλίωσης της ιστόνης H3 στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα.<sup>237</sup> Επιπλέον αυξημένη ένταση της τριμεθυλιωμένης κατάστασης της λυσίνης 27 παρουσιάζεται και στα δορυφορικά κύτταρα των μυών.<sup>236</sup> Αν και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η συμβολή της αλλοιωμένης τριμεθυλίωσης της λυσίνης 27 στην H3 ιστόνη στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων των μυών και του αιμοποιητικού συστήματος κατά την διάρκεια της γήρανσης, παρόλα αυτά η αύξηση του σήματος αυτού που παρουσιάζεται με την ηλικία φαίνεται να καταστέλλει την αυτοανανέωση των βλαστοκυττάρων.

Με σκοπό την παιρεταιίρω διευρεύνση της συμβολής της αλλοιωμένης μεθυλίωσης της H3 ιστόνης στην δυσλειτουργία των βλαστικών κυττάρων κατα την διάρκεια της γήρανσης έγιναν μελέτες για την ανέρυση νέων μεθυλιωμένων περιοχών, καθώς και περιοχών που παρουσίασαν απώλεια της μεθυλιωμένης κατάστασης της ιστόνης αυτής με το πέρασμα του χρόνου. Όπως έγινε λοιπόν φανερό μέσα απο τα πειράματα που έλαβαν χώρο, τα ηλικιωμένα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν περισσότερα σημεία τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3 στην λυσίνη 27 απο ότι τα νεαρά βλαστικά κύτταρα. Η αυξημένη αυτή μεθυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή αρκετών γονιδίων τα οποία ήταν ενεργά σε νεαρά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα. Έτσι σύμφωνα με τα δεδομένα, το ποσοστό των νέων τριμεθυλιωμένων περιοχών ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερο σε σχέση με την απώλειες της τριμεθυλιωμένης H3 ιστόνης σε ενήλικα βλαστικά κύτταρα.<sup>237</sup> Επιπλέον επειδή οι τροποποιήσεις των ιστονών αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν και άλλες μελέτες σε αυτόν τον τομέα καθώς η τριμεθυλιωμένες μορφές της H3 ιστόνης στην λυσίνη 27 και την λυσίνη 4 ίσως να μην αποτελούν τις μόνες τροποποιήσεις που εμπλέκονται στην καταστολή γονιδίων και επομένως στην δυσλειτουργία των βλαστικών κυττάρων κατά την γήρανση.

### **Αλληλεπίδραση επιγενετικών μηχανισμών**

Πολλά δεδομένα μελετών υποδηλώνουν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των επιγενετικών μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η μεθυλίωση του DNA είναι δυνατόν να κατασταλλεί απο την τροποποιήσεις της H3 ιστόνης όπως είναι η μεθυλίωση που οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα των ενζύμων μεθυλίωσης DNMT3A και DNMT3B.<sup>247</sup> Επομένως αυτού του είδους η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε αυτούς τους δυο επιγενετικούς μηχανισμούς φανερώνει ότι σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η απομεθυλίωση της H3 ιστόνης, ώστε να πραγματοποιηθεί η μεθυλίωση του DNA σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους.

Επίσης, μελέτες σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα έχουν αποδείξει ότι δεν είναι δυνατή η απομεθυλίωση της H3K4 ιστόνης εξαιτίας της απώλειας του LSD1 παράγοντα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να καταστέλλεται η μεθυλίωση του DNA γενετικών τόπων που είναι σημαντικοί για την διαφοροποίηση των συγκεκριμένων βλαστικών κυττάρων. Έτσι πειραματόζωα με έλλειψη του LSD1 παράγοντα

εμφανίζουν απώλεια της ικανότητας διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικυττάρων τους.<sup>232</sup> Επιπλέον μια ακόμα αλληλεπίδραση που έχει παρατηρηθεί είναι ανάμεσα στην μεθυλίωση του γενετικού υλικού και την τριμεθυλίωση στην λυσίνη 27 της H3 ιστόνης (H3k27me3). Η τροποποίηση αυτή της H3 ιστόνης εντοπίζεται αρκετά συχνά κοντά σε CpG νησίδες που υπομεθυλιώνονται σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα.<sup>248,249</sup> Τα δεδομένα πειραμάτων αναφέρουν ότι η αλληλεπίδραση αυτή ίσως να εμπλέκεται στην γήρανση αρκετών ειδών βλαστικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα στα ηλικιωμένα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα γίνεται φανερή υπερμεθυλίωση των περιοχών οι οποίες στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονταν από τριμεθυλίωση στην λυσίνη 27 της H3 ιστόνης. Η συνέπεια της υπερμεθυλίωσης του DNA στα ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, είναι η απώλεια του δυναμικού τους και επομένως η εμφάνιση του φαινοτύπου της γήρανσης.<sup>212,237</sup> Επίσης δεδομένα πρόσφατων μελετών υποδηλώνουν ότι το σύμπλεγμα PRC2 που είναι υπεύθυνο για την μεθυλίωση της H3 ιστόνης στην λυσίνη 27, αλληλεπιδρά με τις DNMT3A και DNMT3B μεθυλοτρανσφεράσες καθώς και με τον TET1 παράγοντα με σκοπό την αναστολή της μεθυλίωσης του DNA σε ηλικιωμένα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.<sup>250,251</sup> Επομένως η καταστολή του συμπλόκου αυτού συμβάλλει στην μεθυλίωση του DNA.<sup>212,252</sup> Σε αντίθεση με τον ανταγωνισμό που υπάρχει ανάμεσα στην μεθυλίωση της H3K4 και H3K27 ιστόνης οι οποίες καταστέλλουν την μεθυλίωση του DNA, η H3K36me3 τροποποίηση της ιστόνης αυτής έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA και ωθεί την μεθυλίωση του γενετικού υλικού που είναι απαραίτητη για την έκφραση σημαντικών γονιδίων.<sup>253,254</sup> Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ηλικιωμένα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα απέδειξαν ότι η μείωση της H3K36me3 στα κύτταρα αυτά κατά την γήρανση συνοδεύεται με υπομεθυλίωση του DNA.<sup>252</sup> Αυτό το γεγονός πιθανόν να υποδηλώνει ότι η απώλεια της H3K36me3 θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση της γονιδιακής έκφρασης κατά την γήρανση εξαιτίας της μειωμένης μεθυλίωσης του γενετικού υλικού. Άρα είναι φανερό ότι οι δυο επιγενετικοί μηχανισμοί της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης των ιστονών αλληλεπιδρούν και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση του δυναμικού των ηλικιωμένων βλαστικών κυττάρων.

Με το πέρασμα των χρόνων και κατά την διάρκεια της γήρανσης οι περισσότεροι ιστοί παρουσιάζουν μεγάλη νοσηρότητα. Η συμβολή των επιγενετικών μηχανισμών

στις ασθένειες που παρουσιάζονται με την ηλικία έχουν μελετηθεί αρκετά καλά στο αιμοποιητικό σύστημα. Κατά την διάρκεια της γήρανσης στο αιμοποιητικό σύστημα εμφανίζονται διάφορα είδη κακοηθειών όπως είναι η λευχαιμία, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα καθώς και τα λεμφώματα και τα μυελώματα. (Hodgkins and Non-Hodgkin) [seer.cancer.gov](http://seer.cancer.gov)) Δεδομένα ερευνών αναφέρουν ότι τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα που παρουσιάζονται με την ηλικία στο αιμοποιητικό σύστημα οφείλονται κατά κύριο λόγο στα αλλοιωμένα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA τα οποία με την σειρά τους συμβάλλουν στην διαταραχή της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων.<sup>255</sup> Όπως έχει ανακαλυφθεί τα βλαστοκύτταρα στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα διαφοροποιούνται έχοντας μεταλλάξεις στους βασικούς επιγενετικούς μηχανισμούς όπως είναι η μεθυλίωση του γενετικού υλικού. Η θεραπείες που στοχεύουν στις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA και επιφέρουν την φυσιολογική κατάσταση του γενετικού υλικού καθώς και την επιθυμητή γονιδιακή έκφραση φαίνεται να οδηγούν και σε αποκατάσταση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων.<sup>256</sup> Επι προσθέτως, στην οξεία μυελογενή λευχαιμία και σε πολλά είδη κακοηθειών έχει βρεθεί απώλεια της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT3A η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων.<sup>257</sup> Επίσης μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί υποδηλώνουν ότι στα περισσότερα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και την οξεία μυελογενή λευχαιμία παρουσιάζονται μεταλλάξεις σε αρκετά σημαντικούς επιγενετικούς παράγοντες όπως είναι ο TET2, ASXL1 και ο IDH1.

Επιπλέον κατά την διάρκεια της γήρανσης παρουσιάζεται σε αρκετά μεγάλο βαθμό μια μετάλλαξη κατά την οποία η κυτοσίνη αντικαθιστάται από την θυμίνη, κάτι το οποίο παρατηρείται όταν απομακρύνεται μια μεθυλιωμένη κυτοσίνη.<sup>258</sup> Αυτή η αντικατάσταση βάσης που εμφανίζεται με την ηλικία σε πολλούς ιστούς έχει ως συνέπεια την μόνιμη αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης σε αυτές τις θέσεις με αποτέλεσμα να η υπομεθυλίωση αρκετών περιοχών να αποτελεί κύριο φαινόμενο τόσο σε ηλικιωμένους ιστούς όσο και σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου.<sup>259</sup> Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι το ASXL1 το οποίο μεταλλάσσεται στα περισσότερα είδη λευχαιμιών και δυσπλασιών ανήκει στην οικογένεια του συμπλέγματος Polycomb και οι μεταλλάξεις σε αυτό οδηγούν σε απώλεια της τριμεθυλίωσης της H3 ιστόνης στην λυσίνη 27 μέσω της δράσης του συμπλόκου αυτού.<sup>260</sup> Πιο συγκεκριμένα πειράματα σε ποντίκια έχουν αποδείξει ότι η

απώλεια του ASXL1 παράγοντα έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της τριμεθυλιωμένης κατάστασης της H3 ιστόνης στην λυσίνη 4 και 27.<sup>237</sup> Το γεγονός αυτό με την σειρά του οδηγεί στην αλλαγή των προτύπων μεθυλίωσης του DNA σε αυτές τις περιοχές διότι παρατηρείται αύξηση της μεθυλίωσης του DNA κάτι το οποίο φαίνεται να συνεισφέρει στην εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.

Οι επιγενετικές αλλοιώσεις που προαναφέρθηκαν και σχετίζονται με την ηλικία δεν είναι μόνιμες, σε αντίθεση με την αλλοιώσεις και τις μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό και αποτελούν μόνιμο χαρακτηριστικό. Άρα σε ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα η επιδιόρθωση των αλλοιωμένων επιγενετικών μηχανισμών είναι πιθανόν να οδηγήσει στην εν μέρη αποκατάσταση της λειτουργικότητάς τους. Με σκοπό να διερευνηθεί αν όντως κάτι τέτοιο θα είχε αποτέλεσμα στην βελτίωση της λειτουργικότητας των ηλικιωμένων βλαστοκυττάρων έγινε μια πρόσφατη μελέτη σε ηλικιωμένα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, που επαναπρογραμματίστηκαν στην αρχική πολυδύναμη κατάστασή τους και έπειτα διαφοροποιήθηκαν σε κύτταρα του αίματος. Τα δεδομένα του πειράματος αυτού απέδειξαν ότι τα επαναπρογραμματισμένα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα δεν παρουσίαζαν την δυσλειτουργία που εμφάνιζαν ως ηλικιωμένα βλαστικά κύτταρα.<sup>261</sup> Επομένως μέσα απο την μελέτη αυτή έγινε φανερό ότι η επαναφορά των αλλοιωμένων επιγενετικών μηχανισμών μέσω επαναπρογραμματισμού συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην αποκατάσταση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων.

Επίσης πραγματοποιήθηκε ακόμα μια έρευνα κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν νευρικά βλαστικά κύτταρα και δορυφορικά κύτταρα μυών. Στο πείραμα αυτό συνδέθηκαν το κυκλοφορικό σύστημα ηλικιωμένων και νεανικών βλαστικών κυττάρων που είχαν απομονωθεί απο ποντίκια.<sup>262,263,61</sup> Τα δεδομένα που προήλθαν απο το πείραμα αυτό αναφέρουν ότι η έκθεση των ηλικιωμένων βλαστικών κυττάρων στο κυκλοφορικό σύστημα των νεανικών βλαστοκυττάρων είχε ως συνέπεια την βελτίωση του δυναμικού και της λειτουργικότητάς τους, κάτι το οποίο είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην ανανέωση των επιγενετικών τους μηχανισμών.

Απο όλα όσα προαναφέρθηκαν και απο τα δεδομένα αρκετών ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί και συνεχίζουν να γίνονται, έχει γίνει κατανοητό ότι το επιγονιδίωμα των βλαστικών κυττάρων κατά το μεγαλύτερο μέρος του παραμένει σταθερό κατά την διάρκεια της γήρανσης εκτός απο κάποιους συγκεκριμένους

γενετικούς τόπους οι οποίοι παρουσιάζουν αλλοιωμένο επιγενετικό προφίλ.<sup>212, 264, 236,237</sup> Επομένως είναι δυνατόν με την στόχευση σε αυτά τα συγκεκριμένα σημεία και την επιδιόρθωση των επιγενετικών αλλοιώσεων να ανακτηθεί σε ένα μεγάλο ποσοστό η λειτουργία των ηλικιωμένων βλαστοκυττάρων. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας κατά τέτοιο θα μπορεί να είναι εφικτό και συγκεκριμένα μέσω του μηχανισμού Cas9 / CRISPR<sup>265</sup> και του TALEN.<sup>266</sup> Το σύστημα της Cas9 καθώς και ο μηχανισμός TALEN μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία του γονιδιώματος, αλλά γίνονται πολλές μελέτες ώστε να αναμορφωθούν σε τέτοιο βαθμό με σκοπό την ανίχνευση και την επιδιόρθωση των σημείων με αλλοιωμένο επιγενετικό προφίλ.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **5.1 Βιογένεση των microRNAs και ρύθμιση της λειτουργίας των βλαστικών κύτταρων**

Όπως είναι γνωστό δυο από τα κύρια γνωρίσματα των βλαστικών κυττάρων είναι η αυτοανανέωση με σκοπό την διατήρηση του πληθυσμού τους και η διαφοροποίησή τους προς διάφορους τύπους κυττάρων με συγκεκριμένες λειτουργίες.<sup>267</sup> Σε όλη την διάρκεια της ζωής ο κύριος ρόλος των βλαστοκυττάρων είναι η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και των οργάνων. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην διερεύνηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στην διατήρηση, τον καθορισμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών. Ένα επίσης πολύ σημαντικό θέμα έρευνας έχει αποτελέσει και η γήρανση των βλαστικών κυττάρων καθώς η δυσλειτουργία που παρατηρείται σε αυτά με το πέρασμα των

χρόνων έχει αντίκτυπο τόσο στους ιστούς όσο και σε ολόκληρο τον οργανισμό. Η ρύθμιση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες γενετικούς και επιγενετικούς. Στα προηγούμενα κεφάλαια ανάλυθηκαν εκτενώς αρκετοί από τους γενετικούς καθώς και δυο κύριοι επιγενετικοί παράγοντες που φαίνεται να εμπλέκονται στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων και στο φαινόμενο της γήρανσής τους. Όστόσο υπάρχει άλλος ένας εξίσου σημαντικός επιγενετικός μηχανισμός που έχει μελετηθεί για τον τρόπο που συμβάλλει στην λειτουργία και τον φαινότυπο της γήρανσης των βλαστοκυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός είναι τα microRNAs τα οποία θα αναλυθούν στο κεφάλαιο αυτό.

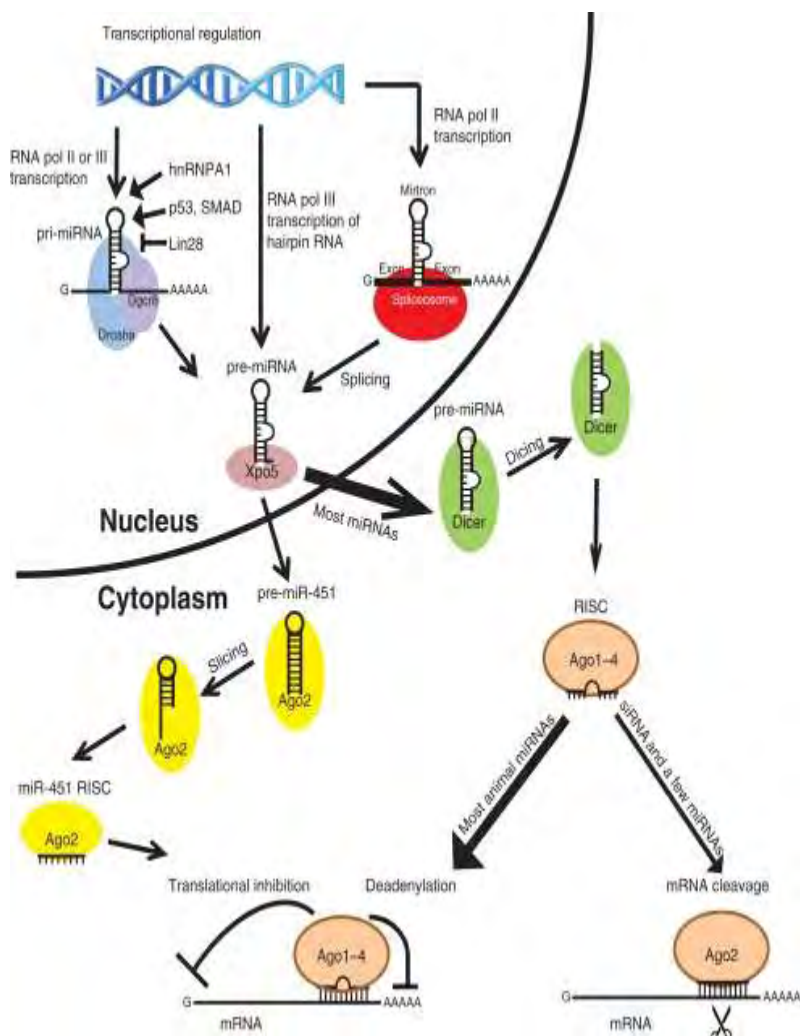
Τα microRNAs είναι μη κωδικά μόρια RNA τα οποία όπως έχει αποδειχθεί εφράζονται σε πάρα πολλούς οργανισμούς. Η βιογένεση των μορίων αυτών ακολουθεί μια διαδικασία κατά την οποία αρχικά μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και παράγεται το pri-mRNA. Στην συνέχεια το pri-mRNA αναγνωρίζεται και επεξεργάζεται από το ένζυμο Drosha. Το αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η δημιουργία του pre-mRNA το οποίο έχει μήκος 70 νουκλεοτιδίων. Το μόριο αυτό εξάγεται από τον πυρήνα και απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όπου δέχεται την δράση ενός άλλου ενζύμου που ονομάζεται Dicer. Έπειτα από την δράση του ενζύμου αυτού προκύπτει το microRNA που είναι δίκλωνο και έχει μήκος 22 νουκλεοτιδίων και τέλος μετατρέπεται σε ώριμο μέσω της δράσης της Risc ενός ενζύμου που το μετατρέπει σε μονόκλωνο και είναι συμπληρωματικό ως προς το mRNA στόχο του. Ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα microRNAs εξαρτάται από την συμπληρωματικότητάς τους προς το mRNA στόχο. Στις περιπτώσεις στις οποίες τα microRNAs είναι διαθέτουν πλήρη συμπληρωματικότητα ως προς τον στόχο τους προβαίνουν σε πλήρη αποικοδόμησή του, ενώ όταν υπάρχει μερική συμπληρωματικότητα απλώς προχωρούν σε κατάστολή της έκφρασης του mRNA στόχου. Τα microRNAs με σκοπό να καταστείλουν την γονιδιακή έκφραση μέσω της συμπληρωματικότητάς τους σθνδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) του mRNA στόχου τους. Επίσης έχει ανακαλυφθεί ότι ένα mRNA μπορεί να αποτελέσει στόχο για πολλά microRNAs ταυτόχρονα.<sup>268, 269</sup>

Τα πρώτα microRNAs των οποίων ο ρόλος αποσαφηνίστηκε ήταν το lin-4 και το let-7 καθώς αποδείχθηκε ότι ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση κύριων ρυθμιστών της διαφοροποίησης όπως είναι τα lin-14, Lin-28 και lin-41.<sup>270</sup> Μέσω των μελετών αυτών έγινε γνωστό ότι τα microRNAs εμπλέκονται σε αρκετά μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη

των οργανισμών. Τα τελευταία χρόνια με βάση τα όσα είχαν ανακαλυφθεί για μη κωδικά αυτά μόρια RNA, άρχισαν να πραγματοποιούνται έρευνες με σκοπό την ανεύρεση του ρόλου τους στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων.

Τα πρώτα πείραματα που έγιναν εστίασαν στον ρόλο των microRNAs στην διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων καθώς αποδείχθηκε ότι αρκετά από αυτά τα μόρια παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση κατά την διάρκεια της διαδικασίας αυτής.<sup>271, 272, 273, 274</sup> Το είδος των βλαστικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες ήταν τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα διότι η καλλιέργεια τους είναι πιο εύκολη και έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Το πρώτο στάδιο της έρευνας περιελάμβανε της απαλοιφή του ενζύμου Dicer που εμπλέκεται στην βιογένεση των microRNAs. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής ήταν η απώλεια όλων των microRNAs που οδήγησε στην αύξηση της αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων και την αλλοίωση της διαφοροποίησής τους.<sup>275, 276</sup>



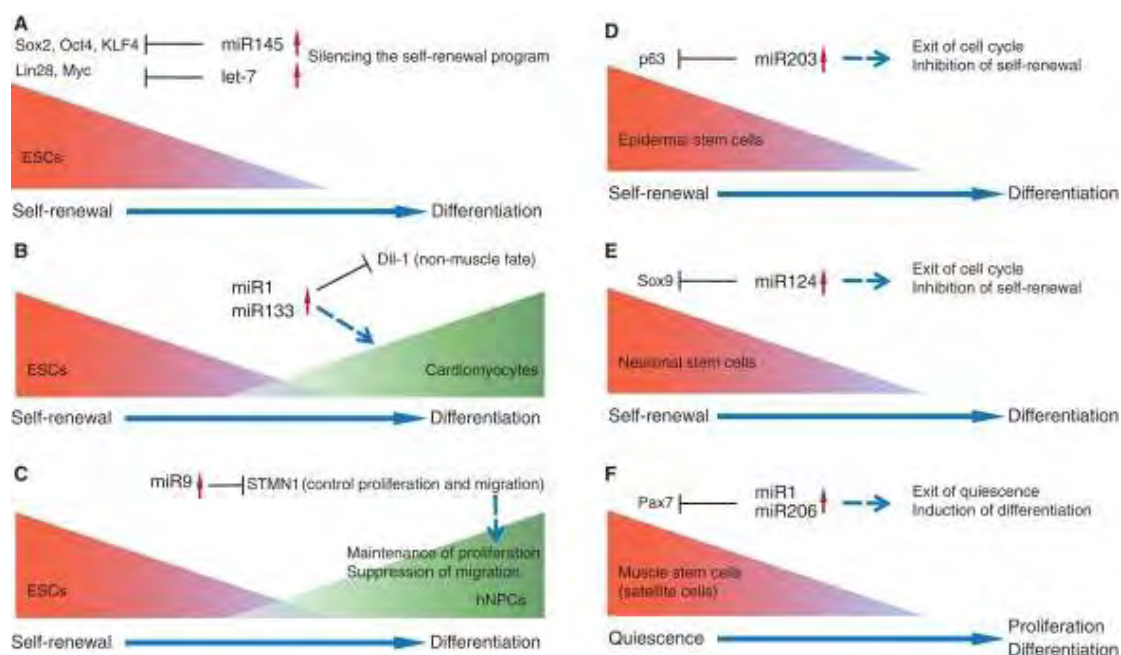


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096054>

Εικόνα 15: Μονοπάτια βιογένεσης και ρύθμισης των microRNAs.

Επι προσθέτως, μια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε αφορούσε το ένζυμο Drosha του οποίου το γονίδιο αποσιωπήθηκε με σκοπό να ανευρεθεί ο ρόλος των microRNAs στην λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα από την απώλεια του ενζύμου αυτού στα εμβρυικά βλαστοκύτταρα ήταν παρόμοια με αυτά που παρουσιάστηκαν κατά την απώλεια του ενζύμου Dicer, δηλαδή αυξημένη αυτοανανέωση και ελαττωματική διαφοροποίηση.<sup>277</sup> Επομένως τα δεδομένα των μελετών αυτών υποδηλώνουν τον βασικό ρόλο των microRNAs στην ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ διαφοροποίησης και αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων.

Η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων είναι μια διασκασία που για να πραγματοποιηθεί σωστά θα πρέπει να πληρούνται δυο προϋποθέσεις. Πρώτον να μειώνεται η αυτοανανέωσή τους την κατάλληλη χρονική στιγμή και δεύτερον να υπάρχουν παράγοντες που να καθορίζουν την κυτταρική σειρά που είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί μέσω της διαφοροποίησης. Έτσι ξεκίνησαν να λαμβάνουν χώρα διάφορες μελέτες ώστε να ανακαλυφθούν τα microRNAs που εμπλέκονται σε αυτές τις δυο διαδικασίες. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι το miR-145 παρουσιάζεται σε χαμηλά επίπεδα κατά την διάρκεια της αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων, ενώ η εκφρασή του είναι αυξημένη κατά της διαφοροποίησή τους. Άρα το μη κωδικό RNA μόριο αυτό αποτελεί ανταγωνιστή της αυτοανανέωσης και καταστέλλει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Sox2, Klf4 και Oct4 όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα που ακολουθεί.<sup>278</sup>



Εικόνα 16: Απεικόνιση του ρόλου των microRNAs στην λειτουργία εμβρυικών και σωματικών βλαστικών κυττάρων. (A) Το miR-145 και το let-7 καταστέλλουν μεταγραφικούς παράγοντες και αποσιωπείται η αυτοανανέωση. (B) Καθορισμός κυτταρικής γραμμής από το miR-133 και miR-1. (C) Διατήρηση της συγκεκριμένης γραμμής από το miR-9. (D-F) Ο ρόλος των miR-202, miR-1, miR-206 και miR-124 στην πρόωθηση της διαφοροποίησης των σωματικών βλαστικών κυττάρων και την καταστολή της αυτοανανέωσής τους μέσω της αποσιώπησης μεταγραφικών παραγόντων.

Μια απο τις πιο καλά μελετημένες οικογένειες των microRNAs είναι αυτή του let-7. Η οικογένεια αυτή μη κωδικών μορίων RNA υπάρχει σε πάρα πολλούς οργανισμούς και διατηρείται απο το *C. Elegans* μέχρι και τον άνθρωπο. Περιλαμβάνει περίπου έντεκα μέλη που είναι διασκορπισμένα σε διάφορους γενετικούς τόπους. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων καθώς αναστέλλει την παραγωγή παραγόντων όπως είναι το *lin28* και το *Myc* ώστε να σταματήσει την αυτοανανέωση των εμβρυικών βλαστοκυττάρων και να προάγει την διαφοροποίησή τους.<sup>279</sup>

Επιπλέον τα *mir-133* και *miR-1* ενεργοποιούνται απο τον παράγοντα SRF ο οποίος δρα κατά την διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων απο την οποία προκύπτουν τα κύτταρα του καρδιακού μυός.<sup>280,281</sup> Αυτά τα δυο μη κωδικά μόρια σαν κύριο ρόλο κατα την διαφοροποίηση των εμβρυικών κυττάρων έχουν την καταστολή του D11-1 παράγοντα που συμμετέχει στο μοναπάτι σηματοδότησης Notch ώστε να ανασταλλεί η έκφραση γονιδίων που προάγουν την διαφοροποίηση προς μη μυικά κύτταρα και έτσι να παράγονται μόνο κυτταρικές σειρές του καρδιακού μυϊκού συστήματος.<sup>280</sup> Απο την άλλη πλευρά ένα άλλο μόριο το *miR-9* ωθεί τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα να διαφοροποιηθούν προς νευρικές κυτταρικές σειρές.<sup>282</sup> Το *miR-9* έχει βρεθεί ότι στοχεύει τον πυρηνικό υποδοχέα NR2E1 ο οποίος αποτελεί σημαντικό παράγοντα της αυτοανανέωσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι το *miR-9* μπορεί να ανασταλλεί απο τον NR2E1 πυρηνικό υποδοχέα κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι υπάρχει μια ανταγωνιστική σχέση ανάμεσα σε αυτούς τους δυο παράγοντες, η ισορροπία της οποίας όμως είναι απαραίτητη για την διατήρηση του φυσιολογικών επιπέδων αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κύτταρων του νευρικού συστήματος.<sup>283</sup> Επομένως είναι φανερό ότι τα microRNA εμπλέκονται στην λειτουργία των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων με τρεις τρόπους. Πρώτον καταστέλλουν την αυτοανανέωση και προάγουν την διαφοροποίηση. Δεύτερον καθορίζουν ως προς ποια κυτταρική σειρά είναι αναγκαίο να διαφοροποιηθούν τα βλαστικά κύτταρα αναστέλλοντας τα γόνidia που οδηγούν σε άλλες κυτταρικές σειρές και τρίτον συμβάλλουν στην διατήρηση της παραγόμενης κυτταρικής γραμμής. (όπως έχει αναλυθεί και σχηματικά στην εικόνα 16)

Επίσης μελέτες που έγιναν στο δέρμα με την χρήση του *in situ* υβριδισμού αποκαλύπτουν ότι το *miR-203* παρουσιάζει αυξημένη έκφραση κατά την

διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων.<sup>284</sup> Πιο συγκεκριμένα όπως έχει αποδειχθεί μέσω πειραμάτων το miR-203 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών βλαστικών κυττάρων και τα ωθεί σε διαφοροποίηση στοχεύοντας στο γονίδιο του ΔNr63a. Το ΔNr63a είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εμπλέκεται στην διατήρηση του πληθυσμού των επιδερμικών βλαστικών κυττάρων.<sup>285,286,287</sup> Έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που ανέστειλλε τον miR-203 και τα δεδομένα που προέκυψαν απέδειξαν ότι παρουσιάστηκε φυσιολογικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των επιδερμικών βλαστοκυττάρων καθώς και αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ΔNr63a. Αν και ακόμα δεν είναι γνωστό εάν ο ΔNr63a αποτελεί τον μοναδικό στόχο του miR-203 στα βλαστικά κύτταρα του δέρματος, αυτό που έχει ανευρεθεί είναι ότι το συγκεκριμένο μη κωδικό μόριο έχει την δυνατότητα να καταστέλλει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών βλαστοκυττάρων.<sup>284</sup> Επιπλέον όσο αφορά το miR-124 μελέτες που έχουν γίνει υποδηλώνουν ότι η αυξημένη έκφραση του στα νευρικά βλαστικά κύτταρα επάγει την διαφοροποίησή τους ενώ η καταστολή του οδηγεί στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών. Ο στόχος του miR-124 είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Sox9, του οποίου τα επίπεδα θα πρέπει να βρίσκονται χαμηλά ώστε να επιτευχθεί η διαφοροποίηση των νευρικών βλαστοκυττάρων, κάτι το οποίο αναλαμβάνει να κάνει το miR-124.<sup>288</sup>

Πρόσφατες μελέτες που έχουν γίνει στα δορυφορικά κύτταρα των μυών αναφέρουν ότι τα δυο κύρια μη κωδικά μόρια RNA που εντοπίζονται σε αυτόν τον πληθυσμό κυττάρων είναι τα miR-1 και miR-206. Ο βασικός στόχος των δυο αυτών μορίων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Pax7. Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός παρουσιάζεται σε υψηλά επίπεδα σε δορυφορικά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας και συμβάλλει στην διατήρηση του πληθυσμού τους. Σε περιπτώσεις όμως τραυματισμού όπου τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα ενεργοποιούνται και εξέρχονται από την φάση ηρεμίας με σκοπό να αποκαταστήσουν την βλάβη που έχει προκληθεί, τα επίπεδα του Pax7 μειώνονται σε μεγάλο βαθμό ώστε να πραγματοποιηθεί η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και να γίνει η αναγέννηση των μυών. Η μείωση αυτή της έκφρασης του Pax7 μεταγραφικού παράγοντα πραγματοποιείται από τα miR-1 και miR-206. Αντιθέτως η μείωση της έκφρασης αυτών των δυο microRNAs έχει σαν αποτέλεσμα την μη καταστολή του

Pax7 παράγοντα ο οποίος επεμβαίνει στην διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του μυϊκού συστήματος και την επιβραδύνει.<sup>289</sup>

Επι προσθέτως, πειράματα στο αιμοποιητικό σύστημα των θηλαστικών απέδειξαν την αυξημένη έκφραση των miR-181, miR-223 και miR-142 στα κύτταρα μυελού των οστών που διαφοροποιούνται σε Β λεμφοκύτταρα.<sup>290</sup> Ακόμα η αύξηση της έκφρασης του miR-181 είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων Β λεμφοκυττάρων σε βάρος των Τ λεμφοκυττάρων. Επίσης πειράματα κατά τα οποία πραγματοποιήθηκε καταστολή των μη κωδικών μορίων RNA αναφέρουν ότι το miR-155 αποτελεί έναν από τους βασικούς ρυθμιστές της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων κατά την διάρκεια της ανοσοαπόκρισης.<sup>291</sup> Τα δεδομένα των μελετών αυτών γνωστοποίησαν ότι οι κύριοι στόχοι του miR-155 είναι mRNA που κωδικοποιούν κυτοκίνες

Όλα όσα προαναφέρθηκαν αφορούν την συμβολή των microRNAs στην διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Τα στοιχεία που υπάρχουν για τον ρόλο των μορίων αυτών στον πολλαπλασιασμό και την διατήρηση του πληθυσμού των κυττάρων είναι λίγα αλλά υπάρχουν μελέτες των οποίων τα δεδομένα αναφέρονται στην εμπλοκή κάποιων microRNAs στην αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων. Οι μελέτες που έγιναν ώστε να διευκρινισθεί ο ρόλος των microRNAs στον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων περιελάμβαναν αποσιώπηση του ενζύμου Dicer και Dgcr8 που αποτελεί συνπαράγοντα του Drosha. Η καταστολή των ενζύμων αυτών είχε ως συνέπεια την παρουσία προβλημάτων στην αυτοανανέωση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Μέσα από αυτά τα πειράματα αποσαφηνίστηκε επίσης και η λειτουργία του miR-290 το οποίο όπως υποδηλώνεται είναι σε θέση να αντισταθμίσει την έλλειψη του Dgcr8 συνπαράγοντα άρα και τα ελαττώματα που εμφανίζονται στον πολλαπλασιασμό εξαιτίας της έλλειψης αυτού. Το miR-290 φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης παραγόντων που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων όπως είναι το Rbl2, Lats2 και το Cdkn1a.<sup>292</sup> Συγκεκριμένα η καταστολή του Rbl2 από το miR-209 οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών του DNA με αποτέλεσμα την ελατωμένη μεθυλίωση του γενετικού υλικού.<sup>293,294</sup> Άρα είναι φανερό ότι το miR-209 παίζει σημαντικό ρόλο στην αυτοανανέωση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων καθώς και στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου τους.

Επιπλέον εκτός από τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα έρευνες όσο αφορά την συμβολή των microRNAs στην αυτοανανέωση έχουν γίνει και σε σωματικά βλαστικά κύτταρα. Πιο αναλυτικά έχει αποδειχθεί πως η αυξημένη έκφραση του miR-205 που εντοπίζεται σε βλαστικά κύτταρα του μαστικού αδένου προάγει τον πολλαπλασιασμό τους και την διατήρηση του πληθυσμού τους. Ως βασικός στόχος του συγκεκριμένου μη κωδικού μορίου RNA αναφέρεται ο παράγοντας PTEN που χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό γόνιδο.<sup>295</sup> Επίσης ένα άλλο microRNA που μελετήθηκε είναι το miR-125b που εντοπίζεται κυρίως στα βλαστικά κύτταρα του δέρματος.<sup>296</sup> Η έκφραση του συγκεκριμένου μορίου παρουσιάζεται αυξημένη κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων του δέρματος ενώ φαίνεται να μειώνεται σε αρκετά μεγάλο βαθμό όταν αυτά διαφοροποιούνται. Επομένως η επαγόμενη αύξηση της έκφρασης του miR-205 σε δερματικά βλαστικά κύτταρα οδηγεί σε μείωση της διαφοροποίησής τους και προαγωγή της αυτοανανέωσής τους.

Ενας επίσης πολύ βασικός ρόλος των microRNAs εκτός από την εμπλοκή τους στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων είναι η συμβολή τους σε καταστάσεις τραυματισμού και στρες στις οποίες υπόκειται ο οργανισμός όπως έχει γίνει αναφορά προηγουμένως για τον Pax7 παράγοντα και την απόκριση των miR-1 και miR-206 σε καταστάσεις καταστροφής των μυών. Πειράματα τα οποία προσπάθησαν να διελευκάνουν τον ρόλο των microRNAs σε τέτοιες καταστάσεις με τις οποίες οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος σχεδόν καθημερινά, χρησιμοποίησαν καταστολείς των μη κωδικών μορίων RNA με σκοπό να παρατηρήσουν τις συνέπειες αυτής της ενέργειας στον οργανισμό. Συγκεκριμένα τα μόρια που οδηγήθηκαν σε καταστολή μέσω της μελέτης αυτής ήταν το miR-206, miR-145, miR-143, miR-208, miR-133 και miR-499. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ανέφεραν αρχικά την παρουσία κάποιου συγκεκριμένου φαινοτύπου που να σχετίζεται με την απώλεια αυτών των microRNAs όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε αυστηρά ελεγχόμενο περιβάλλον. Σε αντίθεση με αυτό όταν πραγματοποιήθηκε έκθεση του οργανισμού σε συνθήκες τραυματισμού και στρες εμφανίστηκαν ισχυροί φαινότυποι εξαιτίας της αναστολής των microRNAs που αναφέρθηκαν και ο οργανισμός δεν κατάφερε να ανταποκριθεί αποτελεσματικά.<sup>297</sup> Επομένως έγινε κατανοητό ότι τα συγκεκριμένα μη κωδικά μόρια RNA μπορεί να μην είναι τόσο απαραίτητα για την διαβίωση του οργανισμού σε καθορισμένο και αποστειρωμένο περιβάλλον, όμως αποτελούν αρκετά σημαντικούς παράγοντες για

την αποτελεσματική αντιμετώπιση και επαναφορά του οργανισμού μετά από έντονες και επίπονες καταστάσεις όπως είναι το άγχος και ο ταρυματισμός.

## **5.2 MicroRNAs και γήρανση βλαστικών κυττάρων**

Κάποια είδη microRNAs φαίνεται να εμπλέκονται και στην γήρανση των βλαστικών κυττάρων. Έρευνες που έχουν γίνει σε ηλικιωμένα νευρικά βλαστικά κύτταρα αναφέρουν ότι ένας από τους βασικούς παράγοντες της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού ο οποίος είναι ο Hmga2 παρουσιάζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τα νεανικά νευρικά βλαστοκύτταρα.<sup>298</sup> Όπως έχει αποδειχθεί η μείωση αυτή του Hmga2 οφείλεται στην αυξημένη έκφραση του let-7 που παρατηρείται σε ηλικιωμένα βλαστοκύτταρα.<sup>299,298</sup> Ο παράγοντας Hmga2 συμβάλλει στην αυτοανανέωση και την διατήρηση του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων του νευρικού συστήματος.<sup>298</sup> Επίσης η μείωση της έκφρασης του Hmga2 επηρεάζει και τα επίπεδα των p16 και p19 με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται ακόμα μεγαλύτερη ελάττωση του δυναμικού της αυτοανανέωσης και της διατήρησης των νευρικών βλαστοκυττάρων. Αυτό συμβαίνει διότι σε νεανικά κύτταρα κανονικά ο Hmga2 προσδένεται στην περιοχή JunB που αποτελεί θετικό ρυθμιστή της μεταγραφής των p16 και p19 και μειώνει τα επίπεδα τους κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα ηλικιωμένα νευρικά βλαστοκύτταρα καθώς η μειωμένη έκφραση του Hmga2 εξαιτίας του let-7 οδηγεί στην αύξηση του JunB και επομένως στην ενίσχυση της ενεργότητας των p19 και p16.<sup>298,300</sup> Ισχυρή απόδειξη αυτού αποτελεί επίσης ένα πείραμα που πραγματοποιήθηκε και κατά το οποίο αφαιρέθηκε η 3'-UTR (αμετάφραστη περιοχή) του let-7 με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση να δεσμευτεί στον Hmga2 παράγοντα για να τον αναστείλλει και άρα τα επίπεδα αυτοανανέωσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων παρέμειναν σε φυσιολογικά επίπεδα.<sup>298</sup>

Επι προσθέτως για την διερεύνηση του ρόλου των microRNAs στην γήρανση των βλαστικών κυττάρων έχουν γίνει μελέτες και σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC). Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι ενήλικα πολυδύναμα κύτταρα τα οποία έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες και λιποκύτταρα. Η απομόνωση των κυττάρων αυτών μπορεί να γίνει από διάφορους

ιστούς όπως είναι ο ομφάλιος λώρος, ο μυελός των οστών και ο λιπώδης ιστός.<sup>149,301</sup> Σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση κάποιων microRNAs όπως είναι το miR-369-5p, miR-499 και το miR-371. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η αυξημένη έκφραση του miR-499 επλέκεται στον πολλαπλασιαστικό δυναμικό των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων και το μειώνει σε αρκετά μεγάλο βαθμό. Όσο αφορά το miR-369-5p βρέθηκε να εμπλέκεται στην μείωση της διαφοροποίησης καθώς και στην ελάτωση της έκφρασης των μεθυλοτρανσφερασών του DNA με κύριο στόχο του την DNMT3A. Από την άλλη πλευρά το miR-371 φάνηκε να έχει τα αντίθετα αποτελέσματα σε σχέση με τα άλλα δυο microRNAs που αναφέρθηκαν.<sup>302</sup> Επιπλέον πραγματοποιήθηκε απομόνωση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από ομφάλιο λώρο και καλλιεργήθηκαν ώστε να παρατηρηθούν αλλαγές στην έκφραση διάφορων microRNAs κατά την διάρκεια της γήρανσης. Τα δεδομένα από αυτές τις καλλιέργειες υποδηλώνουν ότι με το πέρασμα του χρόνου σε αυτό το είδος βλαστικών κυττάρων παρουσιάζεται σε αρκετά μεγάλο βαθμό μείωση της αποακετυλάσης HDAC και μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης AT-hook 2 ενώ από την άλλη παρουσιάζονται αυξημένα τα επίπεδα των p16, p21 και p27. Η μείωση της αποακετυλάσης HDAC όπως έχει βρεθεί σχετίζεται με την αναστολή της έκφρασης αρκετών microRNAs όπως είναι το let-7a1, let-7f1, miR-23a και miR-26a. Τα μη κωδικά μόρια αυτά έχουν εντοπιστεί τόσο στον ενδοκυττάριο όσο και στο εξωκυττάριο χώρο κάτι το οποίο αποδुकνύει ότι είναι πολύ πιθανόν να εμπλέκονται στην έκφραση σημαντικών γονιδίων για την λειτουργία των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων αλλά και στην επικοινωνία τους με άλλα γειτονικά κύτταρα. Άρα η αναστολή τους κατά την διάρκεια της γήρανσης ενδέχεται να συμβάλλει στην εμφάνιση προβλημάτων τόσο στην λειτουργία όσο και στην επικοινωνία των βλαστοκυττάρων του μεσεγχυματικού χώρου. Αντιθέτως η επαγόμενη αύξηση της αποακετυλάσης είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής της χρωματίνης και επομένως της έκφραση των microRNAs που είχαν κατασταλαί ως αποτέλεσμα της μειωμένης έκφρασής της. Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος μελετήθηκε και εμφανίζεται σε μεγάλο βαθμό κατά την διάρκεια της γήρανσης είναι το οξειδωτικό στρες. Στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που είχαν απομονωθεί παρατηρήθηκε ότι το οξειδωτικό στρες που αποτελεί έναν από τις κύριες συνέπειες της γήρανσης καθώς αυξάνεται ο αριθμός των βλαβών στο κύτταρο, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της έκφρασης των let-7a και miR-23a.<sup>303</sup> Το miR-23a συμμετέχει στην απόπτωση και αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του



παράγοντα PGC-1a ο οποίος εμπλέκεται στην βιογένεση και την λειτουργία των μιτοχονδρίων.<sup>304, 305, 306</sup> Άρα η αυξημένη έκφραση του miR-23a κατά την διάρκεια της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων είναι πολύ πιθανόν να υποδηλώνει βλάβες στην λειτουργία και την βιογένεση των μιτοχονδρίων. Επίσης μια άλλη πρωτεΐνη που αποτελεί στόχο του miR-23a είναι η SIRT3. Η πρωτεΐνη αυτή έχει σαν βασικό ρόλο της την βιογένεση των μιτοχονδρίων και την προστασία από το οξειδωτικό στρες και έχει συσχετισθεί επίσης με την μακροζωία στον ανθρώπινο οργανισμό.<sup>307</sup> Επιπλέον από την μελέτη των ηλικιωμένων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ανακαλύφθηκαν ακόμα πέντε microRNAs των οποίων τα επίπεδα είχαν μειωθεί αρκετά σε σχέση με νεαρά βλαστικά κύτταρα. Αυτά είναι το miR-19a, miR-17, miR-19b, miR-20a και το miR-19.<sup>308,308</sup> Συγκεκριμένα το miR-19 φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR το οποίο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό την κυτταρική ανάπτυξη και στην επιβίωση του οργανισμού.<sup>309,310</sup> Ακόμα ένας τύπος βλαστικών κυττάρων που μελετήθηκε είναι τα δορυφορικά βλαστικά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται στον μυϊκό ιστό. Σε αυτήν την έρευνα έγινε προσπάθεια να ανευρεθούν microRNAs η αλλαγή της έκφρασης των οποίων να σχετίζεται με την μειωμένη αναγεννητική ικανότητα που εμφανίζεται στο μυϊκό σύστημα έπειτα από τραυματισμό κατά την διάρκεια της γήρανσης. Για αυτόν τον λόγο πραγματοποιήθηκαν βιοψίες από μύες ηλικιωμένων και νεαρών ποντικών. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής απέδειξαν την παρουσία αυξημένων επιπέδων των let-7b και let-7e στον ιστό των ηλικιωμένων ποντικών.<sup>311,312</sup> Επίσης η αυξημένη έκφραση αυτών των δυο microRNAs σε ηλικιωμένους ιστούς συσχετίστηκε άμεσα με τα μειωμένα επίπεδα της CDK6 που αποτελεί θετικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Όπως έχει ξανααναφερθεί η αύξηση των επιπέδων των microRNAs της οικογένειας let-7 σθμβάλλει με την σειρά του έμμεσα στην αναστολή του Hmga2 παράγοντα και κατεπέκταση στην αυξημένη ενεργότητα των p19 και p16 που φαίνεται να ευθύνονται για την μειωμένη αυοανανέωση και αναγεννητική ικανότητα που εμφανίζουν τα δορυφορικά βλαστικά κύτταρα και επομένως το μυϊκό σύστημα κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>311</sup> Επιπλέον ένα άλλο μη κωδικό μόριο RNA το οποίο φαίνεται επίσης να σχετίζεται με την γήρανση των κυττάρων είναι το miR-34a. Το miR-34a σε ηλικιωμένους ιστούς προσδένεται στην SIRT1 αποακετυλάση και την καταστέλλει. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η SIRT1 να μην αποακετυλιώνει τον FoxO1 παράγοντα ο οποίος είναι αρνητικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης κατά την ακετυλιωμένη κατάσταση του.

Επομένως το miR-34a αποδεδηγμένα οδηγεί στην μείωση της αγγειογένεσης και την δυσλειτουργία των βλαστικών κυττάρων των ενδοθηλιακών ιστών κατά την διάρκεια της γήρανσης.<sup>313</sup>

### **5.3 Αντιμετώπιση γήρανσης βλαστικών κυττάρων και μελλοντικοί στόχοι**

Στα προηγούμενα κεφάλαια ανέρθησαν εκτενώς τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων, οι κατηγορίες τους καθώς και οι επιγενετικοί και γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην γήρανση αυτών. Κλείνοντας λοιπόν θα αναφερθούμε σε πρόσφατες μελέτες οι οποίες μελέτησαν τους τρόπους με τους οποίους είναι δυνατόν να αντιστραφεί το φαινόμενο της γήρανσης και επομένως να επεκταθεί η διάρκεια ζωής των βλαστικών κυττάρων και κατεπέκταση ολόκληρου του οργανισμού. Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει αρκετές έρευνες στον εγκέφαλο, τους μυς και τους ιστούς του ήπατος ηλικιωμένων ζώων, μέσω των οποίων έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης Notch είναι δυνατόν να συμβάλλει στην αναστροφή του φαινομένου της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων.<sup>314</sup> Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού το οποίο ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των δορυφορικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε μέσω της μετάγγισης αίματος απο νεαρά σε ηλικιωμένα ποντίκια. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής έδειξε ότι παράγοντες που υπάρχουν στο αίμα των νεαρών ζώων είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι Notch και επομένως μπορούμε να έχουμε αναγέννηση των σκελετικών μυών των ηλικιωμένων ζώων.<sup>315</sup> Ωστόσο όσο αφορά τον άνθρωπο η εφαρμογή της μεθόδου αυτής βρίσκεται ακόμα υπο διερεύνηση καθώς υπάρχουν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα.<sup>316</sup>

Επιπλέον ένας ακόμη παράγοντας που έχει μελετηθεί με σκοπό την “θεράπεια” της γήρανσης είναι ο SIRT6. Ο συγκεκριμένος παράγοντας ενεργοποιείται σε περίπτωση βλάβης του γενετικού υλικού με σκοπό να καταστείλλει τον L1 παράγοντα. Μέσω πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν αποδείχθηκε ότι η υπερέκφραση του SIRT6 είχε ως συνέπεια την καθυστέρηση την εμφάνισης των συμπτωμάτων που προκαλούνται απο τον L1 παράγοντα σε γηρασμένα κύτταρα. Η αναστολή του

παράγοντα L1 είναι δυνατόν να επιτευχθεί επίσης, με την αναστολή της αντιστροφής μεταγραφάσης, ενός ένζυμου που συμβάλλει στην αντιγραφή του L1, καθώς και μέσω μικρών κωδικοποιητικών μοριών RNA τα οποία στοχεύουν σε αυτό και το καταστέλλουν.<sup>317</sup> Επίσης ένας άλλος τρόπος μέσω του οποίου έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατόν να καθυστερήσει η εμφάνιση των συμπτωμάτων της γήρανσης είναι ο θερμιδικός περιορισμός, ο οποίος ωθεί την ενεργοποίηση του παράγοντα SIRT1.<sup>318</sup> Ακόμη αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι ο θερμιδικός περιορισμός συμβάλλει στην επιβράδυνση της εξέλιξης ασθενειών που σχετίζονται με την γήρανση όπως είναι το Alzheimer.<sup>319</sup> Επι προσθέτως, οι περισσότερες πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην αναστροφή του φαινοτύπου της γήρανσης μέσω του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός αποτελεί μια μέθοδο κατά την οποία τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα μετατρέπονται σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) τα οποία έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η ανακάλυψη της μετατροπής αυτής μέσω της χρήσης τεσσάρων βασικών γονιδίων που είναι τα Oct4, Sox2, Klf4 και Myc, επέτρεψε στους ερευνητές να προβούν στην ανάπτυξη αρκετών θεραπευτικών προσεγγίσεων οι οποίες στοχεύουν στην επιβράδυνση της γήρανσης των κυττάρων και κατεπέκταση του οργανισμού.<sup>320</sup> Ωστόσο οι μελέτες όσο αφορά τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό συνεχίζονται και υπάρχουν αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα ότι στο μέλλον μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου θα είναι δυνατόν να αναζωογονούνται πλήρως τα γηρασμένα βλαστικά κύτταρα καθώς και ότι θα υπάρχει μεγάλη συμβολή στη αντιμετώπιση και θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την γήρανση όπως είναι το Parkinson και το Alzheimer.<sup>321,322</sup>

Τέλος σύμφωνα με αρκετές μελέτες η αύξηση του μήκους των τελομερών πιστεύεται ότι αποτελεί έναν τρόπο επιβράδυνσης της γήρανσης και συνεπώς αύξησης της διάρκειας ζωής. Πειράματα στα οποία έγινε εισαγωγή του γονιδίου της TERT που είναι υπεύθυνο για την αύξηση των τελομερών αναφέρουν ότι υπήρξε αρκετά αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων.<sup>323</sup> Έτσι σήμερα καθώς και στο μέλλον υπάρχουν και θα εξελιχθούν πολύ περισσότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις που θα στοχεύουν στην αύξηση του μήκους των τελομερών με σκοπό την προστασία των κυττάρων από την πρόωρη γήρανση.<sup>324,325</sup>

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Rossi DJ, Jamieson CHM, Weissman IL. Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell*. 2008;132(4):681-696. doi:10.1016/j.cell.2008.01.036
2. Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ. Quiescent Hematopoietic Stem Cells Accumulate DNA Damage during Aging that Is Repaired upon Entry into Cell Cycle. *Cell Stem Cell*. 2014;15(1):37-50. doi:10.1016/j.stem.2014.04.016
3. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007;447(7145):725-729. doi:10.1038/nature05862
4. Flach J, Bakker ST, Mohrin M, et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;512(7513):198-202. doi:10.1038/nature13619
5. Καμπίλανκος Π. Ο διαφαινόμενος ρόλος των stem κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος, στο δέρμα και τα κακοήγη νεοπλάσματα του δέρματος. 2010. <http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/handle/10889/3689>. Accessed March 29, 2019.
6. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009;114:185-199. doi:10.1007/10\_2008\_45
7. Laskey RA, Fairman MP, Blow JJ. S phase of the cell cycle. *Science*. 1989;246(4930):609-614. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683076>.

- Accessed March 29, 2019.
8. Rodgers JT, King KY, Brett JO, et al. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert. *Nature*. 2014;510(7505):393-396. doi:10.1038/nature13255
  9. Dhawan J, Laxman S. Decoding the stem cell quiescence cycle - lessons from yeast for regenerative biology. *J Cell Sci*. 2015;128(24):4467-4474. doi:10.1242/jcs.177758
  10. *Past, Present and Future of Stem Cells in Regenerative Medicine*. [http://www.asiabiotech.com/publication/apbn/16/english/preserved-docs/1603/0024\\_0027.pdf](http://www.asiabiotech.com/publication/apbn/16/english/preserved-docs/1603/0024_0027.pdf). Accessed March 29, 2019.
  11. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu W-S. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2005;100(1):12-27. doi:10.1263/jbb.100.12
  12. Fong CY, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. *Hum Reprod*. 1999;14(3):774-781. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221713>. Accessed March 29, 2019.
  13. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810-813. doi:10.1038/385810a0
  14. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>. Accessed March 29, 2019.
  15. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441(7097):1075-1079. doi:10.1038/nature04957
  16. Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool*. 1999;284(1):67-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368935>. Accessed March 29, 2019.
  17. Zhang J-Q, Yu X-B, Ma B-F, et al. Neural differentiation of embryonic stem cells induced by conditioned medium from neural stem cell. *Neuroreport*. 2006;17(10):981-986. doi:10.1097/01.wnr.0000227977.60271.ca
  18. Perryman S V, Sylvester KG. Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. *J Cell Mol Med*. 10(2):292-308. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796800>. Accessed March 29, 2019.
  19. Shablott MJ, Axelman J, Littlefield JW, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(1):113-118. doi:10.1073/pnas.021537998
  20. Kirschstein RL, Ruffin J. A Call to Action. *Public Health Rep*. 2001;116(6):515-516. doi:10.1093/phr/116.6.515

21. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369-377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348593>. Accessed March 29, 2019.
22. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002;30(8):896-904. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160841>. Accessed March 29, 2019.
23. Burness ML, Sipkins DA. The stem cell niche in health and malignancy. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):107-115. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.006
24. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002;12(11):502-508. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446111>. Accessed March 29, 2019.
25. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
26. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science (80- )*. 2007;318(5858):1917-1920. doi:10.1126/science.1151526
27. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(8):2883-2888. doi:10.1073/pnas.0711983105
28. Park I-H, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-146. doi:10.1038/nature06534
29. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*. 2009;15(2):59-68. doi:10.1016/j.molmed.2008.12.003
30. Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(9):725-729. doi:10.1038/nrm2466
31. Heng B, Glenn WK, Lee JHK, Tan X V, Lawson JS, Whitaker NJ. Reply to Letter to the Editor : Is HPV-18 present in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2010;102(10):1551-1552. doi:10.1038/sj.bjc.6605672
32. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
33. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell*. 2007;1(1):55-70. doi:10.1016/j.stem.2007.05.014
34. Zhong XY, Zhang B, Asadollahi R, Low SH, Holzgreve W. Umbilical cord

- blood stem cells: what to expect. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1205(1):17-22.  
doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05659.x
35. Lee MW, Jang IK, Yoo KH, Sung KW, Koo HH. Stem and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Int J Hematol.* 2010;92(1):45-51.  
doi:10.1007/s12185-010-0619-4
  36. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol.* 2010;25(1):91-98. doi:10.14670/HH-25.91
  37. Colman A. Human embryonic stem cells and clinical applications. *Cell Res.* 2008;18(S1):S171-S171. doi:10.1038/cr.2008.261
  38. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103(5):697-705.  
doi:10.1172/JCI5298
  39. Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):311-324. doi:10.1159/000080341
  40. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000;100(1):143-155.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647939>. Accessed March 29, 2019.
  41. Handgretinger R. The role of graft-versus-host disease in the inhibition of normal B-lymphopoiesis and leukemic control of B-lineage acute lymphocytic leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2006;91(3):292B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531250>. Accessed March 29, 2019.
  42. Erba P, Terenghi G, Kingham PJ. Neural differentiation and therapeutic potential of adipose tissue derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5(2):153-160. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941451>. Accessed March 29, 2019.
  43. Koster MI. Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1170:7-10.  
doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04363.x
  44. Yang C-C, Cotsarelis G. Review of hair follicle dermal cells. *J Dermatol Sci.* 2010;57(1):2-11. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.11.005
  45. Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol.* 2004;39(1):1-6.  
doi:10.1007/s00535-003-1259-8
  46. Williams GC. PLEIOTROPY, NATURAL SELECTION, AND THE EVOLUTION OF SENESCENCE. *Evolution (N Y).* 1957;11(4):398-411.  
doi:10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x
  47. Kirkwood TBL. Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(7):737-745.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869731>. Accessed May 23, 2019.
  48. Harrison DE. Normal Production of Erythrocytes by Mouse Marrow Continuous for 73 Months. *Proc Natl Acad Sci.* 1973;70(11):3184-3188.

- doi:10.1073/pnas.70.11.3184
49. Harrison DE. Mouse erythropoietic stem cell lines function normally 100 months: Loss related to number of transplantations. *Mech Ageing Dev.* 1979;9(5-6):427-433. doi:10.1016/0047-6374(79)90083-6
  50. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, et al. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(12):5465-5470. doi:10.1073/pnas.1000834107
  51. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405
  52. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-Associated Characteristics of Murine Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1273-1280. doi:10.1084/jem.192.9.1273
  53. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2005;106(4):1479-1487. doi:10.1182/blood-2004-11-4282
  54. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(26):9194-9199. doi:10.1073/pnas.0503280102
  55. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004;5(2):133-139. doi:10.1038/ni1033
  56. Guralnik JM. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood.* 2004;104(8):2263-2268. doi:10.1182/blood-2004-05-1812
  57. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 1996;16(6):2027-2033. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604047>. Accessed May 23, 2019.
  58. Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. Neural Stem Cell Detection, Characterization, and Age-Related Changes in the Subventricular Zone of Mice. *J Neurosci.* 2004;24(7):1726-1733. doi:10.1523/JNEUROSCI.4608-03.2004
  59. Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z. Neural Stem and Progenitor Cells Retain Their Potential for Proliferation and Differentiation into Functional Neurons Despite Lower Number in Aged Brain. *J Neurosci.* 2009;29(14):4408-4419. doi:10.1523/JNEUROSCI.6003-08.2009
  60. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell.* 2008;132(4):645-660. doi:10.1016/j.cell.2008.01.033
  61. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, et al. Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science*



- (80- ). 2014;344(6184):630-634. doi:10.1126/science.1251141
62. Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*. 2001;107(4):603-613. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720784>. Accessed May 23, 2019.
  63. Okamoto M, Inoue K, Iwamura H, et al. Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J*. 2011;25(10):3570-3582. doi:10.1096/fj.11-184697
  64. Pineda JR, Daynac M, Chicheportiche A, et al. Vascular-derived TGF- $\beta$  increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol Med*. 2013;5(4):548-562. doi:10.1002/emmm.201202197
  65. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med*. 2014;20(6):659-663. doi:10.1038/nm.3569
  66. Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H. JNK Activity in Somatic Stem Cells Causes Loss of Tissue Homeostasis in the Aging *Drosophila* Gut. *Cell Stem Cell*. 2008;3(4):442-455. doi:10.1016/j.stem.2008.07.024
  67. Park J-S, Kim Y-S, Yoo M-A. The role of p38b MAPK in age-related modulation of intestinal stem cell proliferation and differentiation in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(7):637-651. doi:10.18632/aging.100054
  68. Rera M, Bahadorani S, Cho J, et al. Modulation of Longevity and Tissue Homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 Homolog. *Cell Metab*. 2011;14(5):623-634. doi:10.1016/j.cmet.2011.09.013
  69. Merlos-Suárez A, Barriga FM, Jung P, et al. The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):511-524. doi:10.1016/j.stem.2011.02.020
  70. Keyes BE, Segal JP, Heller E, et al. Nfatc1 orchestrates aging in hair follicle stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(51):E4950-E4959. doi:10.1073/pnas.1320301110
  71. Giangreco A, Qin M, Pintar JE, Watt FM. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging Cell*. 2008;7(2):250-259. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00372.x
  72. Ritti- $\text{\AA}$  L, Stoll SW, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Hedgehog signaling maintains hair follicle stem cell phenotype in young and aged human skin. *Aging Cell*. 2009;8(6):738-751. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00526.x
  73. Doles J, Storer M, Cozzuto L, Roma G, Keyes WM. Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev*. 2012;26(19):2144-2153. doi:10.1101/gad.192294.112

74. Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(3):401-410. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00855.x
75. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of Myoblast Transplantation Reveal a Discrete Minority of Precursors with Stem Cell-like Properties as the Myogenic Source. *J Cell Biol.* 1999;144(6):1113-1122. doi:10.1083/jcb.144.6.1113
76. Mauro A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J Cell Biol.* 1961;9(2):493-495. doi:10.1083/jcb.9.2.493
77. Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, et al. Isolation of Adult Mouse Myogenic Progenitors. *Cell.* 2004;119(4):543-554. doi:10.1016/j.cell.2004.10.021
78. Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE, Partridge TA. A Population of Myogenic Stem Cells That Survives Skeletal Muscle Aging. *Stem Cells.* 2007;25(4):885-894. doi:10.1634/stemcells.2006-0372
79. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, et al. Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science (80- ).* 2007;317(5839):807-810. doi:10.1126/science.1144090
80. Carlson ME, Conboy MJ, Hsu M, et al. Relative roles of TGF- $\beta$ 1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell.* 2009;8(6):676-689. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00517.x
81. Brack AS, Bildsoe H, Hughes SM. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci.* 2005;118(20):4813-4821. doi:10.1242/jcs.02602
82. Bernet JD, Doles JD, Hall JK, Kelly Tanaka K, Carter TA, Olwin BB. p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat Med.* 2014;20(3):265-271. doi:10.1038/nm.3465
83. Luo S, Murphy CT. Caenorhabditis elegans reproductive aging: Regulation and underlying mechanisms. *genesis.* 2011;49(2):53-65. doi:10.1002/dvg.20694
84. Killian DJ, Hubbard EJA. Caenorhabditis elegans germline patterning requires coordinated development of the somatic gonadal sheath and the germ line. *Dev Biol.* 2005;279(2):322-335. doi:10.1016/j.ydbio.2004.12.021
85. Zhao R, Xuan Y, Li X, Xi R. Age-related changes of germline stem cell activity, niche signaling activity and egg production in Drosophila. *Aging Cell.* 2008;7(3):344-354. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00379.x
86. Paul C, Nagano M, Robaire B. Aging Results in Molecular Changes in an Enriched Population of Undifferentiated Rat Spermatogonia1. *Biol Reprod.* 2013;89(6):147. doi:10.1095/biolreprod.113.112995
87. Ryu B-Y, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Effects of Aging

- and Niche Microenvironment on Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*. 2006;24(6):1505-1511. doi:10.1634/stemcells.2005-0580
88. Hsu H-J, Drummond-Barbosa D. Insulin levels control female germline stem cell maintenance via the niche in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(4):1117-1121. doi:10.1073/pnas.0809144106
  89. LaFever L, Drummond-Barbosa D. Direct Control of Germline Stem Cell Division and Cyst Growth by Neural Insulin in *Drosophila*. *Science (80- )*. 2005;309(5737):1071-1073. doi:10.1126/science.1111410
  90. Mair W, McLeod CJ, Wang L, Jones DL. Dietary restriction enhances germline stem cell maintenance. *Aging Cell*. 2010;9(5):916-918. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00602.x
  91. Garg N, Sinclair DA. Oogonial stem cells as a model to study age-associated infertility in women. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(6):969. doi:10.1071/RD14461
  92. Moskalev AA, Shaposhnikov M V, Plyusnina EN, et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):661-684. doi:10.1016/j.arr.2012.02.001
  93. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society foDominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenc. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
  94. Xu C, Wang J, Zhu T, et al. Cross-Talking Between PPAR and WNT Signaling and its Regulation in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(3):247-254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26201865>. Accessed September 12, 2019.
  95. Laschober GT, Brunauer R, Jamnig A, Fehrer C, Greiderer B, Lepperdinger G. Leptin receptor/CD295 is upregulated on primary human mesenchymal stem cells of advancing biological age and distinctly marks the subpopulation of dying cells. *Exp Gerontol*. 2009;44(1-2):57-62. doi:10.1016/j.exger.2008.05.013
  96. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Søreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. 2016. doi:10.1002/bjs.10053
  97. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475-1485. doi:10.1056/NEJMra0804615
  98. Chen K, Kobayashi S, Xu X, Viollet B, Liang Q. AMP activated protein kinase is indispensable for myocardial adaptation to caloric restriction in mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e59682. doi:10.1371/journal.pone.0059682
  99. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

- 2007;8(10):813-824. doi:10.1038/nrm2256
100. Ko E, Lee KY, Hwang DS. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Dev.* 2012;21(11):1877-1886. doi:10.1089/scd.2011.0284
  101. Choo KB, Tai L, Hymavathee KS, et al. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci.* 2014;11(11):1201-1207. doi:10.7150/ijms.8356
  102. Zou X, Li H, Chen L, Baatrup A, Bünger C, Lind M. Stimulation of porcine bone marrow stromal cells by hyaluronan, dexamethasone and rhBMP-2. *Biomaterials.* 2004;25(23):5375-5385. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.041
  103. Chen C-T, Shih Y-R V, Kuo TK, Lee OK, Wei Y-H. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(4):960-968. doi:10.1634/stemcells.2007-0509
  104. Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;35(5):615-621. doi:10.1007/s10571-015-0166-x
  105. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(7):332-340. doi:10.1016/j.tem.2009.04.001
  106. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
  107. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells.* 2004;22(5):675-682. doi:10.1634/stemcells.22-5-675
  108. Tsai W-B, Chung YM, Takahashi Y, Xu Z, Hu MC-T. Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. *Nat Cell Biol.* 2008;10(4):460-467. doi:10.1038/ncb1709
  109. Milani P, Ambrosi G, Gammoh O, Blandini F, Cereda C. SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:836760. doi:10.1155/2013/836760
  110. Jiang Y, Mishima H, Sakai S, Liu Y-K, Ohyabu Y, Uemura T. Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: effect of aging, gender, and age-related disorders. *J Orthop Res.* 2008;26(7):910-917. doi:10.1002/jor.20623
  111. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem.* 2011;112(3):750-755. doi:10.1002/jcb.22994
  112. Molofsky A V., Slutsky SG, Joseph NM, et al. Increasing p16INK4a

- expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 2006;443(7110):448-452. doi:10.1038/nature05091
113. Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol*. 2011;791:11-21. doi:10.1007/978-1-61779-316-5\_2
  114. Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, et al. Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):614-624. doi:10.1038/ncb2735
  115. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol*. 2007;5(5):e110. doi:10.1371/journal.pbio.0050110
  116. Lin T-M, Tsai J-L, Lin S-D, Lai C-S, Chang C-C. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev*. 2005;14(1):92-102. doi:10.1089/scd.2005.14.92
  117. Choi K-M, Seo Y-K, Yoon H-H, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*. 2008;105(6):586-594. doi:10.1263/jbb.105.586
  118. Su Z-Y, Shu L, Khor TO, Lee JH, Fuentes F, Kong A-NT. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Top Curr Chem*. 2013;329:133-162. doi:10.1007/128\_2012\_340
  119. Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 43(3-4):129-138. doi:10.1007/s11626-007-9021-9
  120. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*. 2002;20(6):592-596. doi:10.1038/nbt0602-592
  121. Wei F, Qu C, Song T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012;227(9):3216-3224. doi:10.1002/jcp.24012
  122. Finkel T, Deng C-X, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 2009;460(7255):587-591. doi:10.1038/nature08197
  123. Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM. Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem*. 2012;287(51):42419-42427. doi:10.1074/jbc.R112.378877
  124. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 2004;23(12):2369-2380. doi:10.1038/sj.emboj.7600244
  125. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha

- promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107(2):137-148.  
doi:10.1016/s0092-8674(01)00524-4
126. Yuan H-F, Zhai C, Yan X-L, et al. SIRT1 is required for long-term growth of human mesenchymal stem cells. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(4):389-400.  
doi:10.1007/s00109-011-0825-4
  127. Michishita E, McCord RA, Berber E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. 2008;452(7186):492-496. doi:10.1038/nature06736
  128. Van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. Repairing split ends: SIRT6, mono-ADP ribosylation and DNA repair. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(9):829-835. doi:10.18632/aging.100389
  129. Chen S, Blank MF, Iyer A, et al. SIRT7-dependent deacetylation of the U3-55k protein controls pre-rRNA processing. *Nat Commun*. 2016;7:10734.  
doi:10.1038/ncomms10734
  130. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 2006;20(9):1075-1080. doi:10.1101/gad.1399706
  131. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*. 2008;102(6):703-710. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164558
  132. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120(4):483-495. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001
  133. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell*. 2010;40(6):893-904. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.013
  134. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010;12(6):662-667. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.015
  135. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell*. 2014;159(6):1263-1276. doi:10.1016/j.cell.2014.11.006
  136. Zhang H, Baehrecke EH. Eaten alive: novel insights into autophagy from multicellular model systems. *Trends Cell Biol*. 2015;25(7):376-387.  
doi:10.1016/j.tcb.2015.03.001
  137. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*. 2014;24(1):92-104. doi:10.1038/cr.2013.153
  138. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011;146(5):682-695. doi:10.1016/j.cell.2011.07.030
  139. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest*. 2015;125(1):85-93.  
doi:10.1172/JCI73946

140. Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):842-846. doi:10.1038/ncb0910-842
141. Pérez-Pérez ME, Zaffagnini M, Marchand CH, Crespo JL, Lemaire SD. The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy.* 2014;10(11):1953-1964. doi:10.4161/auto.34396
142. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009;23(7):798-803. doi:10.1101/gad.519709
143. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature.* 2016;529(7584):37-42. doi:10.1038/nature16187
144. Bergamini E. Autophagy: a cell repair mechanism that retards ageing and age-associated diseases and can be intensified pharmacologically. *Mol Aspects Med.* 27(5-6):403-410. doi:10.1016/j.mam.2006.08.001
145. Sohal RS, Forster MJ. Caloric restriction and the aging process: a critique. *Free Radic Biol Med.* 2014;73:366-382. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.015
146. Maegawa S, Lu Y, Tahara T, et al. Caloric restriction delays age-related methylation drift. *Nat Commun.* 2017;8(1):539. doi:10.1038/s41467-017-00607-3
147. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009;325(5937):201-204. doi:10.1126/science.1173635
148. Rhoads TW, Burhans MS, Chen VB, et al. Caloric Restriction Engages Hepatic RNA Processing Mechanisms in Rhesus Monkeys. *Cell Metab.* 2018;27(3):677-688.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.01.014
149. Zhang X, Hirai M, Cantero S, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. *J Cell Biochem.* 2011;112(4):1206-1218. doi:10.1002/jcb.23042
150. Yen W-L, Klionsky DJ. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:248-262. doi:10.1152/physiol.00013.2008
151. Anderson RM, Weindruch R. Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):134-141. doi:10.1016/j.tem.2009.11.005
152. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 2005;8(1):3-5. doi:10.1089/rej.2005.8.3
153. Ferreira-Marques M, Aveleira CA, Carmo-Silva S, Botelho M, de Almeida LP, Cavadas C. Caloric restriction stimulates autophagy in rat cortical neurons

- through neuropeptide Y and ghrelin receptors activation. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(7):1470-1484. doi:10.18632/aging.100996
154. Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon C. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet*. 2008;4(2):e24. doi:10.1371/journal.pgen.0040024
  155. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
  156. Burkewitz K, Morantte I, Weir HJM, et al. Neuronal CRTC-1 governs systemic mitochondrial metabolism and lifespan via a catecholamine signal. *Cell*. 2015;160(5):842-855. doi:10.1016/j.cell.2015.02.004
  157. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, et al. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab*. 2010;11(6):554-565. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.001
  158. Cantó C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(4):214-224. doi:10.1152/physiol.00010.2011
  159. Mammucari C, Milan G, Romanello V, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007;6(6):458-471. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.001
  160. Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-590. doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2
  161. Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab*. 2012;16(1):104-112. doi:10.1016/j.cmet.2012.05.010
  162. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:121-129. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.006
  163. Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan K-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*. 2011;7(6):643-644. doi:10.4161/auto.7.6.15123
  164. Khan SH, Kumar R. Role of an intrinsically disordered conformation in AMPK-mediated phosphorylation of ULK1 and regulation of autophagy. *Mol Biosyst*. 2012;8(1):91-96. doi:10.1039/c1mb05265a
  165. Liang D, Han D, Fan W, et al. Therapeutic efficacy of apelin on transplanted mesenchymal stem cells in hindlimb ischemic mice via regulation of autophagy. *Sci Rep*. 2016;6:21914. doi:10.1038/srep21914
  166. Garg G, Singh S, Singh AK, Rizvi SI. Antiaging Effect of Metformin on Brain in Naturally Aged and Accelerated Senescence Model of Rat. *Rejuvenation Res*. 2017;20(3):173-182. doi:10.1089/rej.2016.1883
  167. Ramot Y, Tiede S, Bíró T, et al. Spermidine promotes human hair growth and



- is a novel modulator of human epithelial stem cell functions. *PLoS One*. 2011;6(7):e22564. doi:10.1371/journal.pone.0022564
168. Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;26:89-95. doi:10.1016/j.gde.2014.06.009
  169. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello J-M, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J*. 2004;23(13):2554-2563. doi:10.1038/sj.emboj.7600259
  170. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):512-522. doi:10.1038/nrc2440
  171. Alessio N, Bohn W, Rauchberger V, et al. Silencing of RB1 but not of RB2/P130 induces cellular senescence and impairs the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(9):1637-1651. doi:10.1007/s00018-012-1224-x
  172. Alessio N, Capasso S, Ferone A, et al. Misidentified Human Gene Functions with Mouse Models: The Case of the Retinoblastoma Gene Family in Senescence. *Neoplasia*. 2017;19(10):781-790. doi:10.1016/j.neo.2017.06.005
  173. Collin G, Huna A, Warnier M, Flaman J-M, Bernard D. Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):259. doi:10.1038/s41419-018-0300-z
  174. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3213-3218. doi:10.1073/pnas.070034097
  175. Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev*. 2005;14(4):440-451. doi:10.1089/scd.2005.14.440
  176. Barzilai A, Yamamoto K-I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 3(8-9):1109-1115. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.002
  177. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*. 2012;47(4):497-510. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029
  178. Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, et al. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science*. 2016;351(6273):aad4395. doi:10.1126/science.aad4395
  179. Inomata K, Aoto T, Binh NT, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte s...[Cell. 2009] - PubMed Result. *Cell*. 2009;137(6):1088-1099. doi:10.1016/j.cell.2009.03.037
  180. Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome

- maintenance: lessons from the mouse? *Science*. 2003;299(5611):1355-1359. doi:10.1126/science.1079161
181. Schmid TE, Grant PG, Marchetti F, Weldon RH, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older men. *Hum Reprod*. 2013;28(1):274-282. doi:10.1093/humrep/des321
  182. Slotter ED, Marchetti F, Eskenazi B, et al. Frequency of human sperm carrying structural aberrations of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertil Steril*. 2007;87(5):1077-1086. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.112
  183. Templado C, Donate A, Giraldo J, Bosch M, Estop A. Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(2):145-151. doi:10.1038/ejhg.2010.166
  184. K D. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:1-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660387>. Accessed September 12, 2019.
  185. Cadet J, Ravanat J-L, TavernaPorro M, Menoni H, Angelov D. Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer Lett*. 2012;327(1-2):5-15. doi:10.1016/j.canlet.2012.04.005
  186. Flach J, Bakker ST, Mohrin M, et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;512(7513):198-202. doi:10.1038/nature13619
  187. Sotiropoulou PA, Candi A, Mascré G, et al. Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. *Nat Cell Biol*. 2010;12(6):572-582. doi:10.1038/ncb2059
  188. Mohrin M, Bourke E, Alexander D, et al. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):174-185. doi:10.1016/j.stem.2010.06.014
  189. Kalamakis G, Brüne D, Ravichandran S, et al. Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell*. 2019;176(6):1407-1419.e14. doi:10.1016/j.cell.2019.01.040
  190. Pala F, Di Girolamo D, Mella S, et al. Distinct metabolic states govern skeletal muscle stem cell fates during prenatal and postnatal myogenesis. *J Cell Sci*. 2018;131(14). doi:10.1242/jcs.212977
  191. Leeman DS, Hebestreit K, Ruetz T, et al. Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science*. 2018;359(6381):1277-1283. doi:10.1126/science.aag3048
  192. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*. 2014;20(8):870-880. doi:10.1038/nm.3651
  193. Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, Schumacher B. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat Cell Biol*. 2014;16(3):201-207. doi:10.1038/ncb2928

194. Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):10-13. doi:10.1093/ije/dyr184
195. Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature.* 2010;463(7280):563-567. doi:10.1038/nature08683
196. Fan G, Beard C, Chen RZ, et al. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J Neurosci.* 2001;21(3):788-797. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157065>. Accessed May 23, 2019.
197. Fan G, Martinowich K, Chin MH, et al. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development.* 2005;132(15):3345-3356. doi:10.1242/dev.01912
198. Sheaffer KL, Kim R, Aoki R, et al. DNA methylation is required for the control of stem cell differentiation in the small intestine. *Genes Dev.* 2014;28(6):652-664. doi:10.1101/gad.230318.113
199. Trowbridge JJ, Snow JW, Kim J, Orkin SH. DNA Methyltransferase 1 Is Essential for and Uniquely Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell.* 2009;5(4):442-449. doi:10.1016/j.stem.2009.08.016
200. Bröske A-M, Vockentanz L, Kharazi S, et al. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet.* 2009;41(11):1207-1215. doi:10.1038/ng.463
201. Li X, Corsa CAS, Pan PW, et al. MOF and H4 K16 Acetylation Play Important Roles in DNA Damage Repair by Modulating Recruitment of DNA Damage Repair Protein Mdc1. *Mol Cell Biol.* 2010;30(22):5335-5347. doi:10.1128/MCB.00350-10
202. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet.* 2012;44(1):23-31. doi:10.1038/ng.1009
203. Challen GA, Sun D, Mayle A, et al. Dnmt3a and Dnmt3b Have Overlapping and Distinct Functions in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2014;15(3):350-364. doi:10.1016/j.stem.2014.06.018
204. Zhang R-R, Cui Q-Y, Murai K, et al. Tet1 Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognition. *Cell Stem Cell.* 2013;13(2):237-245. doi:10.1016/j.stem.2013.05.006
205. Barreto G, Schäfer A, Marhold J, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature.* 2007;445(7128):671-675. doi:10.1038/nature05515
206. Ma DK, Jang M-H, Guo JU, et al. Neuronal Activity-Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis. *Science (80- ).* 2009;323(5917):1074-1077. doi:10.1126/science.1166859
207. Schmitz K-M, Schmitt N, Hoffmann-Rohrer U, Schäfer A, Grummt I, Mayer C. TAF12 Recruits Gadd45a and the Nucleotide Excision Repair Complex to the Promoter of rRNA Genes Leading to Active DNA Demethylation. *Mol*

- Cell*. 2009;33(3):344-353. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.015
208. Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature*. 2010;463(7280):563-567. doi:10.1038/nature08683
  209. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. Schübeler D, ed. *PLoS Genet*. 2009;5(8):e1000602. doi:10.1371/journal.pgen.1000602
  210. Yuan T, Jiao Y, de Jong S, Ophoff RA, Beck S, Teschendorff AE. An Integrative Multi-scale Analysis of the Dynamic DNA Methylation Landscape in Aging. Greally JM, ed. *PLoS Genet*. 2015;11(2):e1004996. doi:10.1371/journal.pgen.1004996
  211. Houseman EA, Molitor J, Marsit CJ. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1431-1439. doi:10.1093/bioinformatics/btu029
  212. Beerman I, Bock C, Garrison BS, et al. Proliferation-Dependent Alterations of the DNA Methylation Landscape Underlie Hematopoietic Stem Cell Aging. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):413-425. doi:10.1016/j.stem.2013.01.017
  213. Loizou JI, Oser G, Shukla V, et al. Histone Acetyltransferase Cofactor Trrap Is Essential for Maintaining the Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Pool. *J Immunol*. 2009;183(10):6422-6431. doi:10.4049/jimmunol.0901969
  214. Tapias A, Zhou Z-W, Shi Y, et al. Trrap-Dependent Histone Acetylation Specifically Regulates Cell-Cycle Gene Transcription to Control Neural Progenitor Fate Decisions. *Cell Stem Cell*. 2014;14(5):632-643. doi:10.1016/j.stem.2014.04.001
  215. Perez-Campo FM, Costa G, Lie-a-Ling M, Stifani S, Kouskoff V, Lacaud G. MOZ-Mediated Repression of *p16<sup>INK4a</sup>* Is Critical for the Self-Renewal of Neural and Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*. 2014;32(6):1591-1601. doi:10.1002/stem.1606
  216. Sheikh BN, Dixon MP, Thomas T, Voss AK. Querkopf is a key marker of self-renewal and multipotency of adult neural stem cells. *J Cell Sci*. 2012;125(2):295-309. doi:10.1242/jcs.077271
  217. Turgeon N, Blais M, Gagné J-M, et al. HDAC1 and HDAC2 Restrain the Intestinal Inflammatory Response by Regulating Intestinal Epithelial Cell Differentiation. Mizoguchi E, ed. *PLoS One*. 2013;8(9):e73785. doi:10.1371/journal.pone.0073785
  218. Zimmerlin CD, Lancini C, Sno R, et al. HDAC1 and HDAC2 collectively regulate intestinal stem cell homeostasis. *FASEB J*. 2015;29(5):2070-2080. doi:10.1096/fj.14-257931
  219. Wilting RH, Yanover E, Heideman MR, et al. Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J*.

- 2010;29(15):2586-2597. doi:10.1038/emboj.2010.136
220. Heideman MR, Lancini C, Proost N, Yanover E, Jacobs H, Dannenberg J-H. Sin3a-associated Hdac1 and Hdac2 are essential for hematopoietic stem cell homeostasis and contribute differentially to hematopoiesis. *Haematologica*. 2014;99(8):1292-1303. doi:10.3324/haematol.2013.092643
  221. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(47):16659-16664. doi:10.1073/pnas.0407643101
  222. Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y. Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(39):15282-15287. doi:10.1073/pnas.0704089104
  223. Simic P, Zainabadi K, Bell E, et al. SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating  $\beta$ -catenin. *EMBO Mol Med*. 2013;5(3):430-440. doi:10.1002/emmm.201201606
  224. Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, et al. Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):614-624. doi:10.1038/ncb2735
  225. Li W, Zhang B, Tang J, et al. Sirtuin 2, a Mammalian Homolog of Yeast Silent Information Regulator-2 Longevity Regulator, Is an Oligodendroglial Protein That Decelerates Cell Differentiation through Deacetylating  $\alpha$ -Tubulin. *J Neurosci*. 2007;27(10):2606-2616. doi:10.1523/JNEUROSCI.4181-06.2007
  226. Ming M, Qiang L, Zhao B, He Y-Y. Mammalian SIRT2 inhibits keratin 19 expression and is a tumor suppressor in skin. *Exp Dermatol*. 2014;23(3):207-209. doi:10.1111/exd.12323
  227. Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, et al. The NAD<sup>+</sup>-Dependent SIRT1 Deacetylase Translates a Metabolic Switch into Regulatory Epigenetics in Skeletal Muscle Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2015;16(2):171-183. doi:10.1016/j.stem.2014.12.004
  228. Rimmelé P, Bigarella CL, Liang R, et al. Aging-like phenotype and defective lineage specification in SIRT1-deleted hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem cell reports*. 2014;3(1):44-59. doi:10.1016/j.stemcr.2014.04.015
  229. Singh SK, Williams CA, Klarmann K, Burkett SS, Keller JR, Oberdoerffer P. Sirt1 ablation promotes stress-induced loss of epigenetic and genomic hematopoietic stem and progenitor cell maintenance. *J Exp Med*. 2013;210(5):987-1001. doi:10.1084/jem.20121608
  230. Florian MC, Dörr K, Niebel A, et al. Cdc42 Activity Regulates Hematopoietic Stem Cell Aging and Rejuvenation. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):520-530. doi:10.1016/j.stem.2012.04.007
  231. Sharma GG, So S, Gupta A, et al. MOF and Histone H4 Acetylation at Lysine

- 16 Are Critical for DNA Damage Response and Double-Strand Break Repair. *Mol Cell Biol.* 2010;30(14):3582-3595. doi:10.1128/MCB.01476-09
232. Kerényi MA, Shao Z, Hsu Y-J, et al. Histone demethylase Lsd1 represses hematopoietic stem and progenitor cell signatures during blood cell maturation. *Elife.* 2013;2:e00633. doi:10.7554/eLife.00633
233. Cellot S, Hope KJ, Chagraoui J, et al. RNAi screen identifies Jarid1b as a major regulator of mouse HSC activity. *Blood.* 2013;122(9):1545-1555. doi:10.1182/BLOOD-2013-04-496281
234. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(50):21931-21936. doi:10.1073/pnas.1016071107
235. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell.* 2007;130(1):77-88. doi:10.1016/j.cell.2007.05.042
236. Liu L, Cheung TH, Charville GW, et al. Chromatin Modifications as Determinants of Muscle Stem Cell Quiescence and Chronological Aging. *Cell Rep.* 2013;4(1):189-204. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.043
237. Sun D, Luo M, Jeong M, et al. Epigenomic Profiling of Young and Aged HSCs Reveals Concerted Changes during Aging that Reinforce Self-Renewal. *Cell Stem Cell.* 2014;14(5):673-688. doi:10.1016/j.stem.2014.03.002
238. Kamminga LM, Bystrykh L V, de Boer A, et al. The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood.* 2006;107(5):2170-2179. doi:10.1182/blood-2005-09-3585
239. Woodhouse S, Pugazhendhi D, Brien P, Pell JM. *Ezh2* maintains a key phase of muscle satellite cell expansion but does not regulate terminal differentiation. *J Cell Sci.* 2013;126(2):565-579. doi:10.1242/jcs.114843
240. Juan AH, Derfoul A, Feng X, et al. Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells. *Genes Dev.* 2011;25(8):789-794. doi:10.1101/gad.2027911
241. Zhang J, Ji F, Liu Y, et al. *Ezh2* Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Memory. *J Neurosci.* 2014;34(15):5184-5199. doi:10.1523/JNEUROSCI.4129-13.2014
242. Xie H, Xu J, Hsu JH, et al. Polycomb Repressive Complex 2 Regulates Normal Hematopoietic Stem Cell Function in a Developmental-Stage-Specific Manner. *Cell Stem Cell.* 2014;14(1):68-80. doi:10.1016/j.stem.2013.10.001
243. Shen X, Liu Y, Hsu Y-J, et al. EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency. *Mol Cell.* 2008;32(4):491-502. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.016
244. Hidalgo I, Herrera-Merchan A, Ligos JM, et al. *Ezh1* Is Required for Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Prevents Senescence-like Cell

- Cycle Arrest. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):649-662.  
doi:10.1016/j.stem.2012.08.001
245. Ezhkova E, Lien W-H, Stokes N, Pasolli HA, Silva JM, Fuchs E. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes Dev*. 2011;25(5):485-498.  
doi:10.1101/gad.2019811
  246. Kinkel SA, Galeev R, Flensburg C, et al. Jarid2 regulates hematopoietic stem cell function by acting with polycomb repressive complex 2. *Blood*. 2015;125(12):1890-1900. doi:10.1182/blood-2014-10-603969
  247. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2014;1839(12):1362-1372. doi:10.1016/j.bbagr.2014.02.007
  248. Brinkman AB, Gu H, Bartels SJJ, et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*. 2012;22(6):1128-1138. doi:10.1101/gr.133728.111
  249. Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson SC, Mann M, Kouzarides T. Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation. *Cell*. 2010;143(3):470-484. doi:10.1016/j.cell.2010.10.012
  250. Neri F, Krepelova A, Incarnato D, et al. Dnmt3L Antagonizes DNA Methylation at Bivalent Promoters and Favors DNA Methylation at Gene Bodies in ESCs. *Cell*. 2013;155(1):121-134. doi:10.1016/j.cell.2013.08.056
  251. Neri F, Incarnato D, Krepelova A, et al. Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol*. 2013;14(8):R91. doi:10.1186/gb-2013-14-8-r91
  252. Challen GA, Sun D, Mayle A, et al. Dnmt3a and Dnmt3b Have Overlapping and Distinct Functions in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(3):350-364. doi:10.1016/j.stem.2014.06.018
  253. Dhayalan A, Rajavelu A, Rathert P, et al. The Dnmt3a PWWP Domain Reads Histone 3 Lysine 36 Trimethylation and Guides DNA Methylation. *J Biol Chem*. 2010;285(34):26114-26120. doi:10.1074/jbc.M109.089433
  254. Morselli M, Pastor WA, Montanini B, et al. In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. *Elife*. 2015;4:e06205. doi:10.7554/eLife.06205
  255. Will B, Zhou L, Vogler TO, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood*. 2012;120(10):2076-2086. doi:10.1182/blood-2011-12-399683
  256. Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood*. 2002;100(8):2957-

2964. doi:10.1182/blood.V100.8.2957
257. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(3):152-165. doi:10.1038/nrc3895
  258. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-278. doi:10.1016/j.cell.2012.06.023
  259. Watanabe Y, Maekawa M. Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem*. 2010;52:145-167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21275343>. Accessed May 23, 2019.
  260. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*. 2012;22(2):180-193. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.032
  261. Wahlestedt M, Norrdahl GL, Sten G, et al. An epigenetic component of hematopoietic stem cell aging amenable to reprogramming into a young state. *Blood*. 2013;121(21):4257-4264. doi:10.1182/blood-2012-11-469080
  262. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005;433(7027):760-764. doi:10.1038/nature03260
  263. Sinha M, Jang YC, Oh J, et al. Restoring Systemic GDF11 Levels Reverses Age-Related Dysfunction in Mouse Skeletal Muscle. *Science (80- )*. 2014;344(6184):649-652. doi:10.1126/science.1251152
  264. Fernández AF, Bayón GF, Urduñigo RG, et al. H3K4me1 marks DNA regions hypomethylated during aging in human stem and differentiated cells. *Genome Res*. 2015;25(1):27-40. doi:10.1101/gr.169011.113
  265. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80- )*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829
  266. Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*. 2012;491(7422):114-118. doi:10.1038/nature11537
  267. SIMINOVITCH L, MCCULLOCH EA, TILL JE. THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *J Cell Comp Physiol*. 1963;62:327-336. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14086156>. Accessed May 23, 2019.
  268. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126-139. doi:10.1038/nrm2632
  269. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610. doi:10.1038/nrg2843



270. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906. doi:10.1038/35002607
271. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*. 2003;5(2):351-358. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919684>. Accessed May 23, 2019.
272. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401-1414. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040
273. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*. 2004;5(3):R13. doi:10.1186/gb-2004-5-3-r13
274. Suh M-R, Lee Y, Kim JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*. 2004;270(2):488-498. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.019
275. Kanellopoulou C. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*. 2005;19(4):489-501. doi:10.1101/gad.1248505
276. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(34):12135-12140. doi:10.1073/pnas.0505479102
277. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2007;39(3):380-385. doi:10.1038/ng1969
278. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2009;137(4):647-658. doi:10.1016/j.cell.2009.02.038
279. Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2010;463(7281):621-626. doi:10.1038/nature08725
280. Ivey KN, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA Regulation of Cell Lineages in Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):219-229. doi:10.1016/j.stem.2008.01.016
281. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005;436(7048):214-220. doi:10.1038/nature03817
282. Delaloy C, Liu L, Lee J-A, et al. MicroRNA-9 Coordinates Proliferation and Migration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors. *Cell Stem Cell*. 2010;6(4):323-335. doi:10.1016/j.stem.2010.02.015

283. Cui K, Zang C, Roh T-Y, et al. Chromatin Signatures in Multipotent Human Hematopoietic Stem Cells Indicate the Fate of Bivalent Genes during Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):80-93. doi:10.1016/j.stem.2008.11.011
284. Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness.' *Nature*. 2008;452(7184):225-229. doi:10.1038/nature06642
285. Mills AA, Zheng B, Wang X-J, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):708-713. doi:10.1038/19531
286. Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. *Cell*. 2007;129(3):523-536. doi:10.1016/j.cell.2007.02.045
287. Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999;398(6729):714-718. doi:10.1038/19539
288. Cheng L-C, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci*. 2009;12(4):399-408. doi:10.1038/nn.2294
289. Chen J-F, Tao Y, Li J, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol*. 2010;190(5):867-879. doi:10.1083/jcb.200911036
290. Chen J, Astle CM, Harrison DE. Hematopoietic senescence is postponed and hematopoietic stem cell function is enhanced by dietary restriction. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1097-1103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585375>. Accessed May 23, 2019.
291. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science (80- )*. 2007;316(5824):608-611. doi:10.1126/science.1139253
292. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blalock R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*. 2008;40(12):1478-1483. doi:10.1038/ng.250
293. Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, et al. Erratum: A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(9):998-998. doi:10.1038/nsmb0908-998b
294. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, et al. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(3):259-267. doi:10.1038/nsmb.1391

295. Greene SB, Gunaratne PH, Hammond SM, Rosen JM. A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 4):606-618. doi:10.1242/jcs.056812
296. Zhang L, Stokes N, Polak L, Fuchs E. Specific MicroRNAs Are Preferentially Expressed by Skin Stem Cells To Balance Self-Renewal and Early Lineage Commitment. *Cell Stem Cell.* 2011;8(3):294-308. doi:10.1016/j.stem.2011.01.014
297. Liu N, Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell.* 2010;18(4):510-525. doi:10.1016/j.devcel.2010.03.010
298. Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. Hmga2 Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in Young but Not Old Mice by Reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell.* 2008;135(2):227-239. doi:10.1016/j.cell.2008.09.017
299. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the Pairing Between let-7 and Hmga2 Enhances Oncogenic Transformation. *Science (80- ).* 2007;315(5818):1576-1579. doi:10.1126/science.1137999
300. Passegué E, Wagner EF, Weissman IL. JunB Deficiency Leads to a Myeloproliferative Disorder Arising from Hematopoietic Stem Cells. *Cell.* 2004;119(3):431-443. doi:10.1016/j.cell.2004.10.010
301. Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell.* 2005;122(4):553-563. doi:10.1016/j.cell.2005.07.031
302. Bork S, Horn P, Castoldi M, Hellwig I, Ho AD, Wagner W. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is down-regulated by microRNA-369-5p and up-regulated by microRNA-371. *J Cell Physiol.* 2011;226(9):2226-2234. doi:10.1002/jcp.22557
303. Lee S, Jung J-W, Park S-B, et al. Histone deacetylase regulates high mobility group A2-targeting microRNAs in human cord blood-derived multipotent stem cell aging. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(2):325-336. doi:10.1007/s00018-010-0457-9
304. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(4):884S-890S. doi:10.3945/ajcn.110.001917
305. Corton JC, Brown-Borg HM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1 in Caloric Restriction and Other Models of Longevity. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2005;60(12):1494-1509. doi:10.1093/gerona/60.12.1494
306. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, et al. Calorie Restriction Promotes Mitochondrial Biogenesis by Inducing the Expression of eNOS. *Science (80- ).* 2005;310(5746):314-317. doi:10.1126/science.1117728
307. Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest

- ages. *Genomics*. 2005;85(2):258-263. doi:10.1016/j.ygeno.2004.11.003
308. Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, et al. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell*. 2010;9(2):291-296. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00549.x
  309. Olive V, Bennett MJ, Walker JC, et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev*. 2009;23(24):2839-2849. doi:10.1101/gad.1861409
  310. Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2005;16(8):797-803. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096426>. Accessed May 25, 2019.
  311. Minamino T, Komuro I. Vascular Cell Senescence. *Circ Res*. 2007;100(1):15-26. doi:10.1161/01.RES.0000256837.40544.4a
  312. Drummond MJ, McCarthy JJ, Sinha M, et al. Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis. *Physiol Genomics*. 2011;43(10):595-603. doi:10.1152/physiolgenomics.00148.2010
  313. Zhao T, Li J, Chen AF. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am J Physiol Metab*. 2010;299(1):E110-E116. doi:10.1152/ajpendo.00192.2010
  314. C PS, Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ. Nature03260. 2005;433(February). doi:10.1038/nature03260
  315. Brack AS, Muñoz-Cánoves P. The ins and outs of muscle stem cell aging. *Skelet Muscle*. 2016;6(1). doi:10.1186/s13395-016-0072-z
  316. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, et al. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab*. 2015;22(1):164-174. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.010
  317. Goodier JL. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA*. 2016;7:16. doi:10.1186/s13100-016-0070-z
  318. Scheibye-Knudsen M, Mitchell SJ, Fang EF, et al. A high-fat diet and NAD(+) activate Sirt1 to rescue premature aging in cockayne syndrome. *Cell Metab*. 2014;20(5):840-855. doi:10.1016/j.cmet.2014.10.005
  319. Braidy N, Jayasena T, Poljak A, Sachdev PS. Sirtuins in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry*. 2012;25(3):226-230. doi:10.1097/YCO.0b013e32835112c1
  320. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front cell Dev Biol*. 2015;3:2. doi:10.3389/fcell.2015.00002
  321. Freije JMP, López-Otín C. Reprogramming aging and progeria. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(6):757-764. doi:10.1016/j.ceb.2012.08.009
  322. Liu G-H, Barkho BZ, Ruiz S, et al. Recapitulation of premature ageing with

- iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2011;472(7342):221-225. doi:10.1038/nature09879
323. Ramunas J, Yakubov E, Brady JJ, et al. Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *FASEB J*. 2015;29(5):1930-1939. doi:10.1096/fj.14-259531
324. Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):691-704. doi:10.1002/emmm.201200245
325. Bernardes de Jesus B, Schneeberger K, Vera E, Tejera A, Harley CB, Blasco MA. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell*. 2011;10(4):604-621. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00700.x