

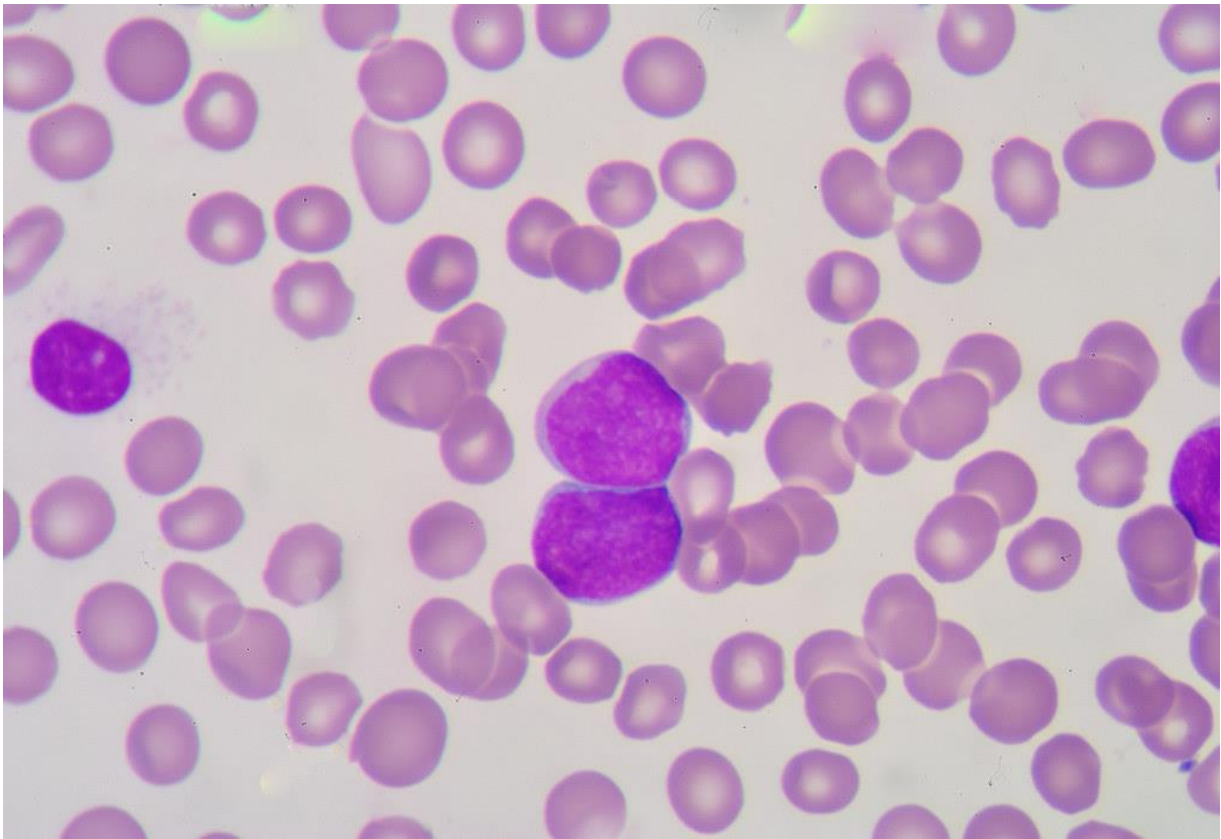
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΕΒΡΥΟΝΙΚΩΝ
ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»**



ΓΚΑΝΑΡΑ ΝΙΚΗ

A.M.: 75

Επιβλέποντες καθηγητές:

Π. Κούκλης & Μ. Σύρρου

Ιωάννινα, 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	6
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.2 ΟΙ ΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	9
1.2.1 ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	9
1.2.2 ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	12
1.2.3 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ	13
1.2.4 ΑΜΝΙΑΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	13
1.2.5 ΕΝΗΛΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	13
1.2.5.1 ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	15
1.2.5.2 ΜΕΣΕΓΧΥΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	16
1.2.5.3 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	17
1.2.5.4 ΝΕΥΡΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	18
1.2.5.5 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	18
1.2.5.6 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η ΒΑΣΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	19
2.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΑΝΕΩΣΗ.....	19
2.2 Η ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	20
2.3 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	21
2.4 ΟΙ ΕΔΡΕΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	23
2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΦΩΛΕΥΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	27
2.6 ΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	30
3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	30
3.2 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	32
3.3 ΒΙΟΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	34
3.4 ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ	38
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	38
4.2.1 ΒΛΑΒΗ DNA	39
4.2.2 DDR.....	40
4.2.3 RS	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	45
5.1 ESCs.....	45
5.2 iPSCs	48
5.3 ASCs.....	49
5.4 ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ.....	50
5.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ.....	51
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά μία βιβλιογραφική επισκόπηση σχετικά με τα βλαστικά κύτταρα και, πιο συγκεκριμένα, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Παράλληλα, γίνεται προσπάθεια μελέτης της γονιδιακής τους αστάθειας.

Αρχικά, περιγράφονται τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων, όπως επίσης και οι διάφοροι τύποι τους (εμβρυικά, εμβρυονικά, ενήλικα, αμνιακά επιθηλιακά και βλαστικά κύτταρα ομφάλιου λώρου). Ιδιαίτερη βάση δίνεται στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα και τις υποκατηγορίες τους, όπου συνοψίζονται οι κύριες ιδιότητές τους. Με αυτόν τον τρόπο, ολοκληρώνεται η περιγραφή των βλαστικών κυττάρων.

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται μία ανάλυση δύο βασικών χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων, της διαφοροποίησης και της αυτό-ανανέωσης, όπως επίσης και της διαίρεσής τους και της πλαστικότητας που εμφανίζουν. Η επισκόπηση της βιολογίας τους ολοκληρώνεται με την περιγραφή των φωλεών και τον ρόλο τους στην στρατολόγηση αυτού του είδους των κυττάρων. Η δε δράση τους αυτή συνδέεται με μια πιο εφαρμοσμένη πρακτική τους χρήση, την αναγέννηση ιστών.

Σκόπιμη θεωρήθηκε και η συμπερίληψη πληροφοριών σχετικά με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Η απόδοση του ορισμού τους και των πιο καλά μελετημένων χαρακτηριστικών τους έδωσε τη δυνατότητα σύγκρισής τους με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα. Η σύγκριση επεκτάθηκε και στην βιοενεργότητά τους και στον τρόπο με τον οποίο διαιρούνται.

Μεγάλο μέρος της παρούσας εργασίας αφορά στην γονιδιακή αστάθεια. Εκτός από την περιγραφή του συγκεκριμένου όρου, παρουσιάζεται και μία λεπτομερής καταγραφή των βλαβών του DNA με τις οποίες σχετίζεται, όπως και οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για την επιδιόρθωσή τους. Τέλος, βάσει της υπάρχουσας διαθέσιμης βιβλιογραφίας, διερευνάται η επίδραση της γονιδιακής αστάθειας στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Η επίδραση αυτή συγκρίνεται με την αντίστοιχη και άλλων τύπων βλαστικών κυττάρων (iPSC, ASCs). Η διπλωματική εργασία ολοκληρώνεται με μία ματιά στην σύγχρονη Αναγεννητική Ιατρική και συνοψίζει τα μέχρι τώρα κατορθώματά της στον τομέα των βλαστικών κυττάρων.

Λέξεις-κλειδιά: τύποι βλαστικών κυττάρων, διαφοροποίηση, αυτοανανέωση, καρκινικά βλαστικά κύτταρα, μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλάβης DNA

ABSTRACT

This dissertation is a literature review on stem cells and, more specifically, embryonic stem cells. At the same time, an attempt is made to study their gene instability.

First, the characteristics of stem cells are described, as well as their different types (fetal, embryonic, adult, amniotic epithelial and umbilical cord stem cells). Particular emphasis is placed on adult stem cells and their subcategories, summarising their main properties. This completes the description of stem cells.

Next, an analysis of two key features of stem cells, differentiation and self-renewal, as well as their division and plasticity, is carried out. The overview of their biology concludes with a description of the niches and their role in the recruitment of this type of cell. This activity is linked to their more practical use, namely tissue regeneration.

It was also considered appropriate to include information on cancer stem cells. Providing their definition and their most well-studied characteristics has made it possible to compare them with normal stem cells. The comparison was extended to their bioactivity and the way they divide.

Much of this work is concerned with gene instability. In addition to a description of this term, a detailed description of the DNA damage to which it is associated and the mechanisms that are activated to restore it is also presented. Finally, based on the existing available literature, the effect of gene instability on embryonic stem cells is investigated. This effect is compared with that of other types of stem cells (iPSC, ASCs). The dissertation concludes with a look at modern Regenerative Medicine and summarizes its achievements so far in the field of stem cells.

Key-words: types of stem cells, differentiation, self-renewal, cancer stem cells, mechanisms to restore DNA damage

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βλαστικά κύτταρα (stemcells) χαρακτηρίζονται από την συνεχούς αυτοανανέωσης και της ασύμμετρης διαίρεσης. Τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν είναιτο ένα πανομοιότυπο με το μητρικό και το άλλο πιο δεσμευμένο προγονικό.Από το δεύτερο θα προκύψουν τα μεταβατικά- πολλαπλασιαστικά κύτταρα ή αλλιώς transit-amplifying cells (TA)(Αμανετοπούλου, 2007).

Αυτά τα κύτταρα συνεχίζουν να έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά αποκτούν περισσότερο διαφοροποιημένες λειτουργίες. Κάποια στιγμή θα χάσουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και θα μετατραπούν σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (terminally differentiated,TD).

Ο κύκλος ζωής των βλαστικών κυττάρων ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό τους ανάλογα με τον ιστό στον οποίο βρίσκονται (tissue turnover). Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι συνήθως αργός, αποφεύγοντας έτσι τη συσσώρευση μεταλλαγών(Αμανετοπούλου, 2007).

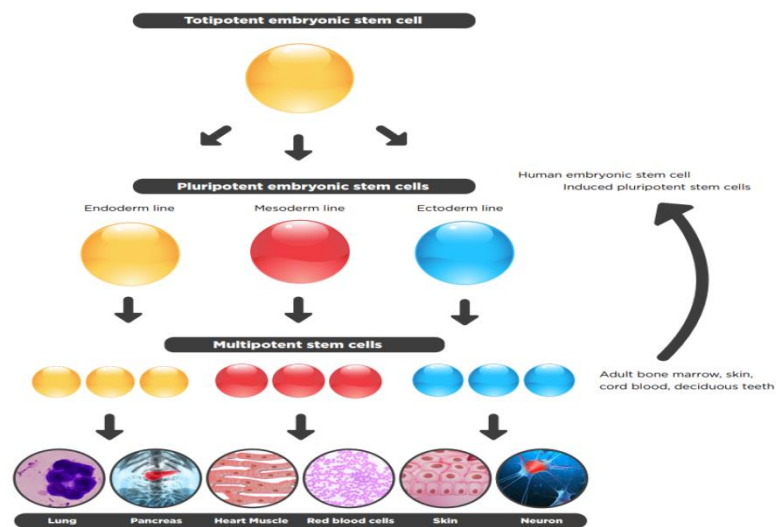
Οι ιδιότητες και τα κριτήρια κατάταξης ενός κυττάρου ως βλαστικό φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 1**):

Πίνακας 1: Ιδιότητες βλαστοκυττάρων

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ
Αδιαφοροποίητος φαινότυπος
Απεριόριστοδυναμικό πολλαπλασιασμού
Ικανότητα αυτοανανέωσης
ΤΑ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ
Μη συχνός πολλαπλασιασμός σε σταθερή κατάσταση
Διακριτόμικροπεριβάλλον

Η πλειονότητα των σωματικών κυττάρων έχουν ένα πολύ συγκεκριμένο λειτουργικό ρόλο. Αντίθετα, τα βλαστικά κύτταρα παραμένουν αδρανή μέχρι να λάβουν ένα συγκεκριμένο εξωκυττάριο σήμα ή σήματα που θα οδηγήσει στη διαφοροποίησή τους. Η οντογένεση παράγει κύτταρα με ετερογένεια όσον αφορά την πολυδυναμία τους. Ακολουθεί μία περιγραφή των «επιπέδων» πολυδυναμίας που εμφανίζουν τα βλαστικά κύτταρα.

Το ζυγωτό (το πρώτο κύτταρο ενός οργανισμού) και τα παράγωγα των δύο πρώτων διαιρέσεων του αποτελούν την κορυφή του δένδρου της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων. Χαρακτηρίζονται ως παντοδύναμα (totipotent) και προκύπτει από αυτά ένα ολόκληρο έμβryo και η τροφοβλάστη. Αυτό σημαίνει πως το καθένα από αυτά έχει την ικανότητα να δώσει γένεση σε όλα τα είδη κυττάρων ενός νέου εμβρύου, καθώς και τα κύτταρα όλων των μη εμβρυϊκών ιστών που χρειάζονται για να περιβάλλουν και να προστατέψουν ένα έμβryo, όπως ο πλακούντας. Ο χαρακτηρισμός ως πολυδύναμα αφορά κυρίως το ζυγωτό και τα πρώιμα εμβρυϊκά βλαστομερίδια, μέχρι και τη δεύτερη κυτταρική διαίρεση (4 κύτταρα). Ο μηχανισμός δημιουργίας φαίνεται παρακάτω (Εικόνα1):



Εικόνα 1: Μηχανισμός παραγωγής βλαστοκυττάρων

Στην πυραμίδα της διαφοροποίησης, ακολουθούν τα ολοδύναμα (pluripotent) κύτταρα. Έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης και προς τα 3 βλαστικά δέρματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα), όχι όμως προς ολόκληρο το έμβryo. Ολοδύναμα είναι τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας που ονομάζονται και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατά την ανάπτυξη

του ζυγωτού, σχηματίζεται η έσω κυτταρική μάζα (innercellmassICM) της βλαστοκύστης από την οποία προέρχονται όλοι οι ιστοί του εμβρύου(Αμανετοπούλου, 2007).Τα ολοδύναμα κύτταρα αποτελούν μία απεριόριστη πηγή κυττάρων για οποιοδήποτε ιστό, καθιστώντας τα ικανά για θεραπεία πολλών ασθενειών (MitalipovandWolf, 2009).

Στη συνέχεια δίνονται τα πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα που μπορούν να παράγουν διαφοροποιημένα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά υπάρχουν στους περισσότερους ενήλικους ιστούς. Διαφοροποιούνται σε πολύ συγκεκριμένα είδη κυττάρων το καθένα, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο ανήκουν (Overturfetal., 1997).

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς και όργανα του σώματος, όπως τον εγκέφαλο, τον μυελό των οστών, το ήπαρ, το αίμα και τα αιμοφόρα αγγεία, το δέρμα και τους σκελετικούς μύες(MitalipovandWolf, 2009). Παρά την ικανότητα αυτό-ανανέωσης του διαθέτουν, δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μεγάλο βαθμό, όπως προαναφέρθηκε. Ο κύριος ρόλος τους είναι η συντήρηση και η επιδιόρθωση των ιστών ή των οργάνων από τα οποία προέρχονται, μιας και δύναται να διαφοροποιηθούν προς τα κύτταρα που απαρτίζουν αυτούς τους ιστούς ή αυτά τα όργανα (YuandThomson, 2008).

Τέλος, η βάση της κλίμακας διαφοροποίησης αποτελείται από τα μονοδύναμα (unipotent) βλαστικά κύτταρα που είναι ικανά να εξελιχθούν μόνο σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Τα τελευταία χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί ορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια στα βλαστικά κύτταρα και αυτά είναι του Notch, του Sonic Hedgehog, του Wnt και τουHox γονιδίου (Chiba, 2009).

Μία σύνοψη σχετικά με την ορολογία των βλαστικών κυττάρων περιλαμβάνεται στον **Πίνακα 2**.

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν σήματα τα οποία καθορίζουν το ρυθμό διαίρεσης των βλαστικών κυττάρων και τη μοίρα των απογόνων τους προέρχονται κυρίως από ιστο-ειδικούς παράγοντες ωστόσο έχουν αναγνωριστεί και κάποια κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Πίνακας 2: Η ορολογία των βλαστικών κυττάρων

Totipotency	Ικανότητα σχηματισμού εμβρύου και τροφοβλάστης	Γονιμοποιημένο κύτταρο ή ζυγώτης
--------------------	--	----------------------------------

Pluripotency	Ικανότητα διαφοροποίησης σε όλα τα κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα	Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα
Multipotency	Ικανότητα διαφοροποίησης σε περιορισμένο εύρος κυτταρικών σειρών ανάλογα με την εντόπιση	Ώριμα, σωματικά ή ιστοειδικά βλαστικά κύτταρα
Unipotency	Ικανότητα διαφοροποίησης σε μια μόνο κυτταρική σειρά	Πνευμονοκύτταρα τύπου II

Μία ακόμα ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων είναι η προστασία των τελομερών και, ως αποτέλεσμα, η αποφυγή της απόπτωσης. Βάσει ερευνών, η τελομεράση στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του ποντικού βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο έκφρασης με αυτήν στα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, και η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl 2 βρέθηκε υπερεκφρασμένη (Chiba, 2009).

Οι αποφάσεις που αφορούν στην κυτταρική μοίρα και παραμονή του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων ελέγχονται από το άμεσο ανατομικό και χημικό περιβάλλον τους, την έδρα. Κύριο ρόλο στην δημιουργία των φωλεών έχουν οι επαφές των βλαστικών κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία, με άλλα κύτταρα και με διαλυτούς παράγοντες, όπως οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες.

1.2 ΟΙ ΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.2.1 ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως προαναφέρθηκε, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ολοδυναμία και έχουν την δυνατότητα γένεσης κυττάρων και από τα τρία βλαστικά δέρματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). Επιπλέον, από αυτά τα κύτταρα προκύπτουν και τα γαμετικά

κύτταρα, δηλαδή στα κύτταρα των γονάδων που είναι εξειδικευμένα για την παραγωγή απλοειδών γαμετών.

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα παράγονται κατά την εμβρυογένεση στην εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (InnerCellMassICM). Η ICM δημιουργείται την 4^η με 5^η ημέρα της γονιμοποίησης, περίοδο κατά την οποία τα κύτταρα που θα αναπτύξουν το τροφοεξώδερμα αρχίζουν να διαχωρίζονται από την εσωτερική κυτταρική (Chiba, 2009). Στις 4-5 μέρες, το έμβρυο συνίσταται από 200-250 περίπου κύτταρα, η πλειονότητα των οποίων συνιστούν το τροφοεξώδερμα. Η ICM, που συνίσταται από 30-34 κύτταρα, αποτελεί την πηγή προέλευσης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Σε αυτή τη διαδικασία διαφαίνεται ή πρώτη εμφανής διαφοροποίηση στο έμβρυο (FongandBongso, 1999).

Παράλληλα, πριν από 25 περίπου χρόνια, οι επιστήμονες άρχισαν τις μελέτες και τις προσπάθειες απομόνωσης και καλλιέργειας *in vitro* των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων από βλαστοκύστες. Μόλις το 1998 ήταν η πρώτη φορά που απομονώθηκαν επιτυχώς εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα από ανθρώπινη βλαστοκύστη (Thomson *et al.*, 1998).

Εάν συντηχθεί ένα ιστοσυμβατό ωάριο με ένα ιστοσυμβατό σπερματοζωάριο ή κλωνοποιηθούν αυτοί οι δύο γαμέτες (μεταφορά πυρήνα από σωματικό κύτταρο σε απύρηνο ωάριο), θα προκύψει η ICM. Η ICM θα εξελιχθεί εν τέλει σε βλαστοκύστη, η οποία αποτελεί την κύρια πηγή των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να παράγουν *in vitro* κύτταρα μεσοδέρματος, ενδοδέρματος και εξωδέρματος, μέσω ειδικών δεικτών, όπως είναι η α-φετοπρωτεΐνη και η α1-αντιθρυσίνη για τα προγονικά κύτταρα του ενδοδέρματος, η ζ-σφαιρίνη, η ενολάση, η καλικρεΐνη, η βαριά αλυσίδα μυοσίνης και η ακτίνη των μυών για τα προγονικά κύτταρα του μεσοδέρματος και τα νευροϊνίδια των 68kd, β-τουμπουλίνη τύπου III και η κερατίνη για τα προγονικά κύτταρα του εξωδέρματος.

Στον άνθρωπο, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα συνήθως σχηματίζουν *in vitro* επίπεδες αποικίες και όχι σφαιρικές, διαχωρίζονται πιο εύκολα μεταξύ τους ώστε να απομονωθούν μονήρη κύτταρα και εκφράζουν διαφορετικά εμβρυονικά αντιγόνα. Παράγουν κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων, όπως και τα υπόλοιπα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Wilmut *et al.*, 1997).

Η διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς ώριμα σωματικά κύτταρα καθοδηγείται από τον *in vitro* σχηματισμό τρισδιάστατων μορφών, των εμβρυονικών

σωματίων (embryoidbodies- EBs). Ακολουθεί η ανάπτυξη τους σε καλλιέργειες μίας στιβάδας από κύτταρα που μοιάζουν ενδοδερμικά και σχηματίζουν επίπεδες αποικίες με αδρή εμφάνιση (Scadden, 2006).

Τα εμβρυονικά σωματίδια δεν μπορούν να σχηματίσουν βιώσιμο ανθρώπινο έμβρυο, καθώς δεν έχουν πολικότητα και σχεδιασμό για την δημιουργία σώματος. Η invitro καλλιέργεια σειρών εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ακολουθεί την φυσιολογική in vivo σειρά ανάπτυξής τους (Keller, 1995).

Έτσι, βλαστικά κύτταρα από το μεσόδερμα και το εξώδερμα αναπτύσσονται μέσα σε λίγες μέρες, ενώ του ενδοδέρματος συνήθως εμφανίζονται μετά τη 10η ημέρα, καθώς τότε είναι που τα περισσότερα εμβρυονικά σωματίδια αποκτούν μία συγκεκριμένη μορφή (Perryman and Sylvester, 2006).

Η χρήση προγονικών κυττάρων πλούσια σε εμβρυονικά σωματίδια ως πηγή κύτταρων για μεταμόσχευση και θεραπεία διαφόρων διαταραχών ενέχει κινδύνους in vivo σχηματισμού τερατωμάτων και καρκινωμάτων. Μία πρακτική που συνήθως ακολουθείται σε τέτοιου είδους καταστάσεις είναι η εξάλειψη των πολυδύναμων αδιαφοροποίητων κυττάρων πριν την μεταμόσχευση (Leahy et al., 1999).

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα δύνανται επίσης να αποκαταστήσουν ιστούς και, ως συνέπεια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπεία για την αναδόμηση π.χ. κατεστραμμένων νευρώνων. Η πεποίθηση ότι τα νευρικά κύτταρα στον εγκέφαλο δεν διαιρούνται έχει πάψει να ισχύει.

Σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι στον εγκέφαλο των θηλαστικών υπάρχουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, τα οποία έχουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης σε τρεις συγκεκριμένες νευρωνικές σειρές (νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα). Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αρχικά διαφοροποιούνται σε νευρωνικά βλαστικά κύτταρα και στη συνέχεια invitro και προς τις τρεις μείζονες νευρωνικές σειρές.

Μελέτες σε εγκεφάλους νεογνών τρωκτικών δείχνουν ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν να μεταμοσχευθούν και να διαφοροποιηθούν ανάλογα με την περιοχή στην οποία εισάχθηκαν. Προκύπτει, λοιπόν, το συμπέρασμα πως τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα του περιβάλλοντός τους και συνεπώς συμμετέχουν ενεργά στις διαδικασίες ανάπτυξης και αποκατάστασης βλαβών του εγκεφάλου.

Πειράματα που ακολούθησαν σεποντικούς, απέδειξαν ότι οι νευρώνες που προέκυψαν από τα κύτταρα αυτά ήταν λειτουργικοί. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα είχαν μεταμοσχευτεί στο δικτυωτό σχηματισμό, διαφοροποιήθηκαν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες και αποκατέστησαν την υπάρχουσα βλάβη που οφειλόταν στην νόσο του Parkinson (BjörklundandLindvall, 2000). Τέλος, σε περίπτωση τραυματισμού του εγκεφάλου, φαίνεται ότι βλαστικά κύτταρα από συγκεκριμένες περιοχές μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης.

Μια υποκατηγορία των εμβρυονικών κυττάρων αποτελούν τα εμβρυονικά γαμετικά κύτταρα. Η θέση παραγωγής τους είναι η γενετική ακρολοφία των εμβρύων και εξελίσσονται φυσιολογικά σε ώριμους γαμέτες, δηλαδή σε ωάρια και σπερματοζώαρια (BjörklundandLindvall, 2000).

Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (αυτοανανέωση, πολλαπλασιασμός, διατήρηση φυσιολογικού καρυότυπου και διαφοροποίηση προς και τα τρία βλαστικά δέρματα) (Zhong et al., 2010). Η διαφορά τους έγκειται κυρίως στον ιστό προέλευσής τους και στον μικρότερο χρόνο διατήρησής τους σε καλλιέργειες (Björklundetal., 2002).

1.2.2 ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα πολυδύναμα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα είναι περισσότερο ιστοειδικά από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Απομονώνονται από την 6^η μέχρι την 12^η εβδομάδα της κύησης και μπορούν να μεταμοσχευτούν χωρίς τον κίνδυνο απόρριψής τους όπως συμβαίνει με τα βλαστικά κύτταρα από τον ομφάλιο λώρο ή τον μυελό των οστών. Επίσης δεν δημιουργούν τερατώματα *in vivo* (Zhong et al., 2010).

Ο ρόλος των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων εντοπίζεται στην επιδιόρθωση των ιστών. Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον πλακούντα από και προς τη μητρική κυκλοφορία και να μεταναστεύουν σε περιοχές της βλάβης. Εκεί παράγουν πιο ώριμα προγονικά κύτταρα που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση (Wacharaprechanont, 2005). Ένας αριθμός των εμβρυικών αυτών βλαστικών κυττάρων παραμένουν στην κυκλοφορία και στους ιστούς της μητέρας και μετά την εγκυμοσύνη, φροντίζοντας για την ιστική επιδιόρθωση ή συμμετέχοντας σε παθολογικές καταστάσεις (Shamblott et al., 2001).

1.2.3 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ

Το επιθήλιο του ομφάλιου λώρου προέρχεται από την αμνιακή επιθηλιακή μεμβράνη και αποτελεί εναλλακτική πηγή πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Τα βλαστικά αυτά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικά προγονικά κύτταρα, όπως αιμοποιητικά, δενδριτικά, νευρικά, ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά και κύτταρα του παγκρέατος (Insausti et al., 2010).

Στο αίμα του ομφάλιου λώρου του νεογνού υπάρχει και ένας υποπληθυσμός μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, πιο αρχέγονος από αυτόν του μυελού των οστών. Τα κύτταρα αυτού του υποπληθυσμού μπορούν να διαφοροποιηθούν σε προγονικά κύτταρα με δείκτες διαφοροποίησης οστών, λίπους και νευρικών κυττάρων (Lee et al., 2010).

Ακόμα, περιλαμβάνεται και ένας προγονικός υποπληθυσμός CD34⁺ αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Όταν στο περιβάλλον αυτών των κυττάρων βρίσκονται οι FLT-3 συνδέτης, Kit συνδέτης και θρομβοποιητίνη, σε αντίθεση με τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, η αιμοποιητική δραστηριότητα αυξάνεται (Lee et al., 2010).

1.2.4 ΑΜΝΙΑΚΑ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα αμνιακά επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, απομονώνονται από την αμνιακή μεμβράνη του ανθρώπινου πλακούντα. Σε σύγκριση με τις προαναφερθείσες κατηγορίες βλαστικών κυττάρων, δεν εκφράζουν το ένζυμο τελομεράση και δεν είναι πιθανός ο σχηματισμός τερατωμάτων in vivo μετά από μεταμόσχευση.

Ομοίως με τα υπόλοιπα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, εκφράζουν δείκτες πολυδυναμίας, όπως ο Oct-4, ο Nanog και η αλκαλική φωσφατάση και δύνανται να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα, όπως νευρικά κύτταρα από το εξώδερμα, καρδιακά μυϊκά κύτταρα από το μεσόδερμα και ηπατοκύτταρα από το ενδόδερμα (Lee et al., 2010).

1.2.5 ΕΝΗΛΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Επιπλέον των κατηγοριών που αναφέρθηκαν, έχει πραγματοποιηθεί και απομόνωση βλαστικών κυττάρων από πολλούς εξειδικευμένους ιστούς ενήλικου σταδίου, όπως ο μυελός των οστών, το περιφερικό αίμα, ο κερατοειδής και ο αμφιβληστροειδής, ο εγκέφαλος, οι

σκελετικοί μύες, ο πολφός των οδόντων, το ήπαρ, το δέρμα, το πάγκρεας και το επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος.

Τα κύτταρα αυτά καλούνται ενήλικα βλαστικά κύτταρα μιας και προέρχονται από διαφοροποιημένους ιστούς ενηλίκων. Η βασική διαφορά τους από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα είναι το γεγονός πως χαρακτηρίζονται από πολυδυναμία και όχι από ολοδυναμία, δηλαδή είναι ανίκανα να διαφοροποιηθούν προς όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος (Brazelton et al., 2000).

Εντούτοις, μία καίρια ιδιότητα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων αποτελεί η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται μέσα στο ανθρώπινο σώμα χωρίς να διαφοροποιούνται για μακρά χρονικά διαστήματα. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορούν να δώσουν ώριμα κύτταρα με χαρακτηριστικά και εξειδικευμένες λειτουργίες για κάθε τύπο ιστού στον οποίο ανήκουν. Η ιδιότητα αυτή, όμως, απουσιάζει σε *in vitro* πειράματα, καθώς διαφοροποιούνται πολύ συντομότερα. Ένα άλλο πρόβλημα είναι η δυσκολία αναγνώρισης και απομόνωσής τους, μιας και είναι σχετικά σπάνια.

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα παράγονται κατά την οντογένεση και παραμένουν σε εξειδικευμένες περιοχές στα όργανα, οι οποίες ονομάζονται φωλεές, για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίησή τους ελέγχονται από μεταβολές στο μικροπεριβάλλον τους. Η διαφοροποίησή τους είναι πιο περιορισμένη σε σχέση με τα εμβρυικά και τα βλαστικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου, ενώ η ικανότητα αύξησης και η δραστικότητα της τελομεράσης είναι παρόμοια (Verfaillie, 2002).

Συνήθως η ενεργοποίησή τους επάγεται από παθολογικές καταστάσεις ή αν υπάρχει ανάγκη να ανανεωθεί κάποιος ιστός υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα προέρχονται και από τα τρία βλαστικά δέρματα (Verfaillie, 2002).

Κύρια πηγή τους αποτελεί ο μυελός των οστών. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα κατηγοριοποιούνται σε επιπλέον υποομάδες: τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, από τα οποία προκύπτουν τα κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος, και τα στρωματικά ή μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία δίνουν γένεση σε κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων, κύτταρα του οστίτη ιστού, των μυών, ενώ παράλληλα παρέχουν στήριξη στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.

1.2.5.1 ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μπορούν, επίσης να κατηγοριοποιηθούν σε διακριτούς πληθυσμούς με βάση το φαινότυπο και τη λειτουργία τους. Ο πρώτος είναι τα μακράς διάρκειας αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Αυτά διαθέτουν τη μέγιστη ικανότητα αυτοανανέωσης και δίνουν γένεση σε όλες τις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές.

Τα βραχείας διάρκειας αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν τους άμεσους απόγονους αυτών των κυττάρων και μπορούν να δώσουν κι αυτά γένεση στις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, αλλά η περίοδος στην οποία διαθέτουν αυτήν την ικανότητα είναι περιορισμένη. Στον **Πίνακα 3** παρατηρούμε τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα ανάλογα με το βλαστικό δέρμα προέλευσης.

Πίνακας 3: Ταξινόμηση βλαστικών κυττάρων ανάλογα με το βλαστικό προέλευσης

Ενδοδερμικής προέλευσης		Εξωδερμικής προέλευσης		Μεσοδερμικής προέλευσης	
Πνευμονικά βλαστικά κύτταρα	επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα	Βλαστικά νευρικού συστήματος	κύτταρα	Βλαστικά μυελού των οστών	κύτταρα
				<ul style="list-style-type: none">• Αιμοποιητικά• Στρωματικά	
Βλαστικά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα		Βλαστικά κύτταρα δέρματος		Βλαστικά κύτταρα καρδιάς	
Βλαστικά παγκρέατος	κύτταρα	Βλαστικά κύτταρα οφθαλμού			
Ηπατικά οναι κύτταρα					

Ουρογεννητικού συστήματος

- Μαστός και προστάτης
- Ωοθήκες και όρχεις

Όπως και τα υπόλοιπα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, είναι κι αυτά σπάνια. Όμως, έχουν απομονωθεί από τους επιστήμονες, οι οποίοι στηρίχθηκαν στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων επιφάνειας των κυττάρων. Πιο αναλυτικά, δείχτηκε ότι σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν κύτταρα που εξέφραζαν το μόριο CD 34, η αιμοποίηση αποκαταστάθηκε (Handgretinger, 2006).

Η χρήση των πληθυσμών CD34 έχει καθιερωθεί πλέον στα περισσότερα κλινικά πρωτόκολλα σχετικά με την απομόνωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Για την διαδικασία αυτή απομονώνονται αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα από το μυελό των οστών, το ομφαλοπλακουντιακό αίμα και το περιφερικό αίμα (Makino et al., 1999).

1.2.5.2 ΜΕΣΕΓΧΥΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται επίσης από τον μυελό των οστών και ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1966 από τους Friedenstein και Petrakova, οι οποίοι απομόνωσαν προγόνους οστεοκυττάρων από μυελό αρουραίου.

«Ο όρος μεσέγχυμα υποδηλώνει τον αναπτυσσόμενο χαλαρό συνδετικό ιστό του εμβρύου, προερχόμενο κυρίως από το μεσόδερμα, το οποίο έχει την ικανότητα να δίνει γένεση σε ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων του συνδετικού ιστού του ενήλικου» (Makino et al., 1999). Στα μεσεγχυματικά κύτταρα ανήκουν και τα κύτταρα του συνδετικού ιστού ενήλικου τύπου, όπως μυοβλάστες ή ινοβλάστες, χόνδρο, λιπώδη ιστό, τένοντες, μυς και νευρικούς ιστούς.

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα πολύ μικρό τμήμα των κυττάρων του μυελού των οστών (0.001- 0.01%). Παρά τον περιορισμένο αριθμό τους, είναι εφικτή η απομόνωση και η ανάπτυξή τους, ενώ μέσω παροχής των κατάλληλων επαγωγικών ουσιών διαφοροποιούνται προς διάφορες κυτταρικές σειρές. Πιθανές σειρές προς διαφοροποίηση

είναι οι οστεοβλάστες, τα χονδροκύτταρα, τα λιποκύτταρα, και κύτταρα του εξωδέρματος, όπως τα νευρικά κύτταρα (Makino et al., 1999).

Τα μεσεγχευματικά βλαστικά κύτταρα έχουν βρεθεί και σε άλλους ενήλικους ιστούς, όπως στο λιπώδη ιστό, στο δέρμα, στους μυς, στον συνδετικό ιστό και τον πλακούντα (Peng et al., 2011). Τέλος, έχουν εντοπιστεί μεσεγχευματικά βλαστικά κύτταρα στο περιφερικό και ομφαλοπλακουντιακό αίμα, στο αμνιακό υγρό, καθώς και στο έλυτρο του Wharton στον ομφάλιο λώρο.

1.2.5.3 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα των βλαστικών κυττάρων υποδεικνύουν την ύπαρξη πρόδρομων επιθηλιακών κυττάρων από τον μυελό των οστών ή τα τοιχώματα των αγγείων. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τον δείκτη CD34+ και ο ενδοθηλιακός τους χαρακτήρας εμφανίστηκε έπειτα invitroκαλλιέργεια (Zammaretti and Zisch, 2005).

Επιπλέον μελέτες απέδειξαν ότι ένα υποσύνολο των κυττάρων που εκφράζουν τον δείκτη CD34+, εκφράζουν και τους δείκτες CD133+, VEGF2+ και ευθύνονται για τη δημιουργία ενδοθηλιακών αποικιών invitro. Ο δείκτης VEGF-2 αποτελεί τον υποδοχέα για τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα αύξησης των κυττάρων και συμμετέχει στη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση στο εμβρυικό και στο ενήλικο στάδιο (Shalaby et al., 1997). Ο άλλος δείκτης που προαναφέρθηκε, ο CD133, μαζί με άλλους δείκτες, παίζει ρόλο στη διάκριση μεταξύ προγονικών και ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων (Shalaby et al., 1997).

Ακόμα τα κύτταρα του περιφερικού αίματος που εκφράζουν τον δείκτη CD133+ δύναται να διαφοροποιηθούν προς ενδοθηλιακά κύτταρα invitro. Στα ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα από τις ενδοθηλιακές αποικίες υψηλής πολλαπλασιαστικής ικανότητας προέρχονται οι ενδοθηλιακές αποικίες χαμηλής πολλαπλασιαστικής ικανότητας και τελικά φτάνουμε στα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η σειρά αυτή ομοιάζει με την ιεραρχία που ακολουθείτε από τα βλαστικά κύτταρα στο αιμοποιητικό σύστημα.

1.2.5.4 ΝΕΥΡΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Από τα νευρικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται τρεις σημαντικοί τύποι κυττάρων: τα κύτταρα των νευρώνων και δύο κατηγορίες μη νευρωνικών κυττάρων, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα (Koster, 2009).

1.2.5.5 ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στα τοιχώματα της πεπτικής οδού. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκονται μέσα σε ειδικές κρύπτες και παράγουν πολλούς τύπους κυττάρων του πεπτικού συστήματος, όπως τα απορροφητικά κύτταρα, τα ενδοκρινή κύτταρα του εντέρου, τα κύτταρα goblet και τα κύτταρα Paneth (Okamoto and Watanabe, 2004).

1.2.5.6 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος βρίσκονται στη βάση των θυλάκων των τριχών και στο βασικό στρώμα της επιδερμίδας. Από αυτήν την κατηγορία βλαστικών κυττάρων προκύπτουν τα κερατινοκύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν και δημιουργούν ένα στρώμα προστασίας στην επιφάνεια του δέρματος, τα θυλάκια της τρίχας και επιδερμικά κύτταρα (Erba et al., 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η ΒΑΣΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΥΤΟΑΝΑΝΕΩΣΗ

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες των βλαστικών κυττάρων καθίσταται η ρύθμιση της αυτό-ανανέωσής τους. Η ισορροπία μεταξύ της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης είναι αναγκαία προϋπόθεση για την φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού, καθώς αν η ζυγαριά γείρει προς τη μία μεριά είναι πιθανή η εμφάνιση όγκου, ενώ αν γείρει προς την άλλη θα εξαντληθούν σύντομα τα βλαστικά κύτταρα. Στους παράγοντες που ρυθμίζουν αυτήν την ισορροπία ανήκουν οι LIF, Wnt και bone-morphogeneticprotein 4 (BMP-4), διασφαλίζοντας την αυτοανανέωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών μεταγωγής του STAT 3, της β-κατενίνης και του Smad αντίστοιχα. Τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια ενεργοποιούν γονίδια-στόχους που σχετίζονται με την διατήρηση της πολυδυναμίας, όπως του Oct 4 και του Nanog (Sumeretal., 2010).

Ένας άλλος παράγοντας που επάγει τον πολλαπλασιασμό των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι ο mTOR,. Επίσης, ένας στόχος-κλειδί για τη σηματοδότηση του Wntείναι το c-Myc που παράλληλα δρα και ως μιτογόνο ερέθισμα. Ως αποτέλεσμα, διαθέτει ρόλο στον πολλαπλασιασμό των εμβρυονικών βλαστικών. Επιπρόσθετα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων είναι το Notch και το Sonic hedgehog (Sumeretal., 2010).

Όσον αφορά το μονοπάτι του hedgehog, τα γονίδιά του κωδικοποιούν διαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς και επάγουν την ενεργοποίηση της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα Gli. Αυτή η οικογένεια αποτελείται από 3 παράγοντες, τους Desert, Indian και Sonic, με τον τελευταίο από αυτούς να εκφράζεται σε υψηλότερο βαθμό (Sumeretal., 2010).

Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την καρκινογένεση στον εγκέφαλο, κατέδειξαν την ρύθμιση των νευρικών προγονικών κυττάρων από το μονοπάτι του hedgehog, υπονοώντας τη συμμετοχή του στην καρκινογένεση του συγκεκριμένου ιστού (Sumeretal., 2010).

Η αυτο-ανανέωση και η διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων ρυθμίζονται, επίσης, από το μονοπάτι του Notch. Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν πρωτεΐνες της

κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες ενεργοποιούνται από συνδέτες, με στόχο την πρωτεόλυση της ενδοκυττάριας περιοχής μέσω σύνδεσης με μεταγραφικούς παράγοντες (Liu et al., 2010).

Τέλος, το μονοπάτι Wnt στοχεύει στην αναστολή της πρωτεόλυσης της β-κατενίνης μέσω πρόσδεσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ειδικούς υποδοχείς. Η β-κατενίνη φυσιολογικά αντιδρά με την πρωτεΐνη TCF/LEF και επάγει την γονιδιακή μεταγραφή (Liu et al., 2010). Με τον τρόπο αυτό, το μονοπάτι του Wnt προάγει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων, δρώντας αντίθετα από το μονοπάτι του hedgehog.

Η σηματοδότηση του Wnt ξεκινάει όταν αναστέλλεται το σύμπλοκο APC (Adenomatous polyposis coli) και κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK-3β), μέσω της συμβολής του υποδοχέα του Frizzled. Το σύμπλοκο αυτό ρυθμίζει την φωσφορλίωση και κατ' επέκτασιν την αποδόμηση της β-κατενίνης (Nusse et al., 2008). Προβλήματα στη σηματοδότηση του Wnt κατευθύνουν τα κύτταρα σε συνεχή πολλαπλασιασμό μέσω συσσώρευσης της β-κατενίνης στον πυρήνα τους και προκαλούνται όγκοι, όπως αδενωματώδης πολυποδίαση του εντέρου, όγκοι δέρματος και λευχαιμία (Kirstetter et al., 2006).

Άλλος παράγοντας που ελέγχει την αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων είναι ο Bmi1. Έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη ορισμένων μορφών καρκίνου (Knoblich, 2010). Το ογκογονίδιο Bmi1 από το οποίο παράγεται ρυθμίζει δύο γονίδια του αναστέλλοντος κυτταρικού κύκλου, τα p16 και p19 (Nusse et al., 2008).

Συνοψίζοντας, η κατεύθυνση του βλαστικού κυττάρου είτε προς αυτοανανέωση, είτε προς διαφοροποίηση ρυθμίζεται από τα προαναφερθέντα σηματοδοτικά μονοπάτια και μόρια και από το περιβάλλον του, την έδρα ή θώκο (Kirstetter et al., 2006).

2.2 Η ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαίρεση των βλαστικών κυττάρων μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη. Ο απαραίτητος αριθμός βλαστικών κυττάρων καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών τύπων διαίρεσης. Η ισορροπία αυτή ελέγχεται διεξοδικά από αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά σήματα, ώστε να αποφευχθούν διαταραχές που δύναται να προκαλέσουν την ανάπτυξη καρκίνου (Rizo et al., 2006).

Ασύμμετρη καλείται η διαίρεση που τα δυο θυγατρικά κύτταρα διαφέρουν μεταξύ τους, δηλαδή το ένα θυγατρικό κύτταρο διαθέτει όλες τις ιδιότητες του πατρικού, ενώ το άλλο διαφοροποιείται. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν το είδος της κυτταρικής διαίρεσης είναι δύο, ο εσωτερικός και ο εξωτερικός. Ο πρώτος ορίζει την κυτταρική μοίρα μέσω καταμερισμού στοιχείων, όπως οι παράγοντες πολικότητας, με ασύμμετρο τρόπο (Rizoet al., 2006). Ο εξωτερικός μηχανισμός κυτταρικής διαίρεσης βασίζεται σε εξωτερικά ερεθίσματα, τα οποία διαμορφώνουν την ασύμμετρη τοποθέτηση των θυγατρικών κυττάρων στο περιβάλλον της φωλιάς. Η τοποθέτηση στην έδρα οδηγεί σε διαφορετική ανάπτυξη, καθώς τα ερεθίσματα διαφοροποιούνται ανάλογα με τη θέση (Knoblich, 2010).

Στη συμμετρική διαίρεση τα θυγατρικά κύτταρα είναι όμοια. Είτε θα διαθέτουν τις ίδιες ιδιότητες με τα πατρικά, είτε θα είναι ομοίως διαφοροποιημένα προς μία κυτταρική σειρά. Οι συμμετρικές διαιρέσεις είναι συνήθεις όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται ή προσπαθεί να αποκαταστήσει μία ιστική βλάβη. Δεν είναι, πάντως, ακόμα γνωστό εάν η εναλλαγή συμμετρικών και ασύμμετρων διαιρέσεων διατηρεί τον αριθμό των βλαστικών και διαφοροποιημένων κυττάρων στους ιστούς στα φυσιολογικά επίπεδα (Tomasetti and Levy, 2010). Έρευνες καταδεικνύουν την ασύμμετρη διαίρεση κάποιων σωματικών βλαστικών κυττάρων υπό σταθερές συνθήκες για την διατήρηση του αριθμού τους. Συμμετρική διαίρεση εμφανίζεται σε περιπτώσεις βλάβης ή νόσου, όπου τα βλαστικά κύτταρα προσπαθούν να αποκαταστήσουν τον αριθμό τους (Tomasetti and Levy, 2010).

2.3 ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μια ιδιότητα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων που ανακαλύφθηκε πρόσφατα είναι η πλαστικότητα. Σύμφωνα με αυτήν, ένα ενήλικο βλαστικό κύτταρο ενός συγκεκριμένου ιστού ή οργάνου λαμβάνει τον φαινότυπο ενός κυττάρου από διαφορετικό ιστό ή όργανο, ενώ σε συγκεκριμένες περιπτώσεις δύναται να αλλάξει και τύπο βλαστικού δέρματος, για παράδειγμα από ενδοδερμική κυτταρική σειρά να γίνει μεσοδερμική (Caussinus and Hirth, 2007). Σύμφωνα λοιπόν με αυτή τη θεωρία, το κύτταρο δεν είναι δεσμευμένο σε μία προκαθορισμένη κυτταρική σειρά, αλλά η διαφοροποίησή του χαρακτηρίζεται από ελαστικότητα και αναστρεψιμότητα. Η πλαστικότητα, λοιπόν, επιτρέπει στα βλαστικά κύτταρα να λειτουργούν βέλτιστα κατά την ιστική αναγέννηση, ανταποκρινόμενα στις ανάγκες του οργανισμού, μέσω των ερεθισμάτων που λαμβάνουν (Tomasetti and Levy, 2010).

Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από την τάση του μυελού των οστών να παράγει μη αιμοποιητικά κύτταρα, μόνο όταν έχει ανιχνευτεί κάποια βλάβη σε ιστό. Προφανώς, τα διαφορετικής κυτταρικής σειράς κύτταρα που παράγονται λόγω πλαστικότητας παραμένουν λειτουργικά στον νέο τους φαινότυπο (Caussinus and Hirth, 2007).

Έρευνες σχετικά με την πλαστικότητα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων υπέδειξε την ικανότητα των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων να παράγουν καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, αγγειακές δομές, καθώς και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα λειτουργικά αυτά παράγωγα χρησιμοποιούνται και σε μοντέλα αρτηριακής βλάβης για τη διαμόρφωση των αγγείων.

Για το πως δρα η πλαστικότητα έχουν δοθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί. Ο πρώτος είναι η κυτταρική δια-διαφοροποίηση όπου η μετατροπή ενός κυττάρου συγκεκριμένης σειράς σε διαφορετική σειρά συνδέεται με απώλεια κάποιων δεικτών και λειτουργιών των κυττάρων της σειράς προέλευσης και εμφάνιση δεικτών και λειτουργίας των κυττάρων της νέας σειράς.

Η κυτταρική δια-διαφοροποίηση εξηγεί την ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να παράγουν κύτταρα διαφορετικής κυτταρικής σειράς, μέσω μιας άμεσης μετατροπής τους που πιθανώς οφείλεται στην ενεργοποίηση μονοπατιών διαφοροποίησης που βρίσκονταν σε λήθαργο (Theise, 2010). Ο δεύτερος προτεινόμενος μηχανισμός είναι η αποδιαφοροποίηση, κατά την οποία η μετατροπή από τη μια κυτταρική σειρά σε άλλη προϋποθέτει την επαναφορά του βλαστικού κυττάρου σε αρχέγονο πολυδύναμο και έπειτα την διαφοροποίησή του ξανά προς άλλη κυτταρική σειρά (Theise, 2010). Ο τρίτος μηχανισμός στηρίζεται στο ότι κατά την μεταμόσχευση παρέχονται διάφοροι διακριτοί τύποι βλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα, ο μη κλασματοποιημένος μυελός των οστών και τα μυϊκά sideropulation κύτταρα φαίνεται πως περιέχουν πέρα από βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, ενδοθηλιακά και προγονικά μυϊκά κύτταρα. Ο τέταρτος μηχανισμός υποστηρίζει πως είναι πιθανό να εντοπίζονται αρχέγονα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών, τα οποία κατά τη διαφοροποίησή τους παράγουν κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα. Οπότε, είναι δυνατή η παραγωγή σχεδόν όλων των ιστών αν τέτοιου είδους κύτταρα εισαχθούν σε μία βλαστοκύστη.

Πειράματα έχουν αποδείξει ότι η βάση αυτού του μηχανισμού αληθεύει, καθώς έχουν απομονωθεί αρχέγονα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα από καλλιέργειες μυελού των οστών, εγκεφάλου και μυϊκού ιστού. Βέβαια, η επιστημονική κοινότητα δεν είναι σίγουρη αν υπήρχαν εξ αρχής εκεί ή είναι αποτέλεσμα πολλών σειρών καλλιέργειας.

Συνοψίζοντας, οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί έχουν μία λογική βάση που μέσω πειραμάτων έχει αποδειχθεί. Ο μηχανισμός που εξηγεί καλύτερα την πλαστικότητα φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του ιστού ή/και της βλάβης (Theise, 2010).

2.4 ΟΙ ΕΔΡΕΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι εξειδικευμένες θέσεις εντοπισμού των βλαστικών κυττάρων καλούνται έδρες ή θώκοι. Οι έδρες αποτελούν βασική μονάδα της φυσιολογίας των ιστών. Περιγράφονται ως «διακριτά ανατομικά και λειτουργικά μικροπεριβάλλοντα» και ο ρόλος του είναι η διατήρηση των βλαστικών κυττάρων, ο έλεγχος της ισορροπίας μεταξύ αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης, η ρύθμιση της συμμετοχής τους σε διαδικασίες ιστικής επιδιόρθωσης και αναγέννησης και τέλος, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η αποτροπή της ογκογένεσης.

Παρόλες τις διαφορές των εδρών μεταξύ των διαφόρων ιστών, έχουν εντοπιστεί αρκετοί κοινοί χαρακτήρες. Αρχικά, η έδρα ανεξαρτήτως ιστού αποτελείται από σωματικά υποστηρικτικά κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένη διάταξη και διαθέτουν συγκεκριμένες λειτουργίες όσον αφορά την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων. Η επικοινωνία μεταξύ βλαστικών κυττάρων και εδρών ή βλαστικών κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας πραγματοποιείται μέσω μορίων προσκόλλησης (Nystul and Spradling, 2006).

Επίσης, στην έδρα εντοπίζονται και εξωτερικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τον αριθμό των βλαστικών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Κάποιοι από αυτούς είναι οι hedgehog, Wnt, bonemorphogenicproteins (BMPs) και οι fibroblastgrowthfactors. Όπως έχει προαναφερθεί, ο ρόλος τους εντοπίζεται στην αυτοανανέωση και την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων (Nystul and Spradling, 2006).

Όσον αφορά τους ασπόνδυλους οργανισμούς, η έδρα φαίνεται να ρυθμίζει την ασύμμετρη διαίρεση των βλαστικών κυττάρων, ενώ στα θηλαστικά δεν επιτρέπει την αχαλίνωτη αύξηση του αριθμού των βλαστικών κυττάρων.

Ο έλεγχος της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης ρυθμίζονται μέσω μηχανισμών και παρακρινών σηματοδοτικών μονοπατιών και αρνητικής ανατροφοδότησης (negativeloops) που ως στόχο έχουν την ελάττωση της ευαισθησίας των βλαστικών κυττάρων στα

μιτογόνασήματα (Scadden, 2006). Παράλληλα, μοριακά μονοπάτια επάγουν την απενεργοποίηση του μονοπατιού διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, μέσω καταστολής της μετάφρασης, ή μέσω ρυθμιστών της χρωματίνης, οι οποίοι δεν επιτρέπουν την έκφραση των γονιδίων σχετικών με την διαφοροποίηση (Zhangetal., 2003). Αν και η φυσική πορεία των βλαστικών κυττάρων οδηγεί στη διαφοροποίησή τους, αν βρεθούν στο ειδικό μικροπεριβάλλον της έδρας και ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί που προαναφέρθηκαν, ο έλεγχος μεταξύ αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης αλλάζει (Shaker and Rubin, 2010).

Οι έδρες που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι αυτές του αιμοποιητικού συστήματος, του δέρματος και του εντέρου. Η πορεία των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων ακολουθεί την εξής πορεία: από την οστεοβλαστική έδρα στην επιφάνεια του οστού μεταφέρονται με τα προγονικά κύτταρα στην αγγειακή έδρα, όπου έρχονται σε επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών (Blanpain and Fuchs, 2006).

Οι έδρες που προαναφέρθηκαν επάγουν διαφορετικά μονοπάτια, καθώς η πρώτη είναι περιβάλλον «ηρεμίας» για τα βλαστικά κύτταρα, ενώ η δεύτερη επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Ομοίως, οι φωλιές για τα βλαστικά κύτταρα του δέρματος διαθέτουν παράγοντες, όπως ο Dkk, ο sFRP και ο Wif, οι οποίοι επάγουν την καταστολή της ανάπτυξης (Blanpain and Fuchs, 2006).

Τα βλαστικά κύτταρα του εντέρου έχουν γύρω τους τα κύτταρα Paneth και τα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα των εντερικών κρυπτών. Ο παράγοντας του οποίου η έκφραση υπερτερεί είναι ο sFRP και αναστέλλει την παροδική ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt (Holst, 2008). Ο πολλαπλασιασμός των βλαστικών κυττάρων ελέγχεται αρνητικά από σήματα όπως ο transforming growth factor (TGF- β) και η BMP. Η τελευταία εντοπίζεται συγκεκριμένα στα βλαστικά κύτταρα του εντέρου, ενώ η έκφραση του πρώτου δεν είναι σίγουρο αν σχετίζεται με το είδος των βλαστικών κυττάρων του εντέρου (Seuntjens et al., 2009). Οι παράγοντες BMPs αποτελούν υποκατηγορία των TGF- β και εκτός ορισμένων εξαιρέσεων σταματούν την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων. Το μονοπάτι των BMP2/BMP4 στοχεύει στην ρύθμιση των κατάλληλων γονιδίων-στόχων μέσω των μορίων Bmpr 1A ή Bmpr 1B και μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smad 1, 4, 5 και 8. Μέσω του πρώτου μορίου η αναστολή του πολλαπλασιασμού είναι πιο άμεση για εντερικά και δερματικά κύτταρα, ενώ στα αιμοποιητικά η αναστολή γίνεται μέσω της έδρας (έμμεσα) (Holst, 2008).

Εν τέλει, η ισορροπία μεταξύ αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης ρυθμίζεται μέσω παραγόντων BMP (αναστολή ανάπτυξης) και Wnt (προαγωγή ανάπτυξης). Και τα δύο μονοπάτια σε συνδυασμό με τον ανταγωνιστή Noggin απαιτούνται για την ενεργοποίηση των βλαστικών κυττάρων στο έντερο και στο δέρμα, ενώ ως συνέπεια της υπερέκφρασής τους αναπτύσσεται πολύποδας (Starz-Gaiano et al., 2009).

Τα στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας στην έδρα ρυθμίζουν επίσης τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα, η tenascin C μεταβάλλει αριθμό και τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων στην υποκοιλιακή ζώνη του νευρικού συστήματος (Starz-Gaiano et al., 2009). Άλλοι διαλυτοί μεσολαβητές, όπως παρακρινείς ρυθμιστές, επίσης συμμετέχουν στην οργάνωση του μικροπεριβάλλοντος της έδρας. (Holst, 2008).

Επίσης, στο μικροπεριβάλλον των όρχεων της *Drosophila*, η έδρα επάγει την έκκριση του παράγοντα Unpaired (UPD) από τα υποστηρικτικά σωματικά κύτταρα με στόχο την σηματοδότηση του μονοπατιού JAK-STAT και την ενεργοποίηση της αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων (Podos and Ferguson, 1999). Οι ωοθήκες, αντίστοιχα, χαρακτηρίζονται από την παρουσία των παραγόντων Decapentaplegic (DPP) και Glassbottomboat (GBB), οι οποίοι επάγουν τη σηματοδότηση του μονοπατιού Smad στα γαμετικά βλαστικά κύτταρα, σταματώντας την διαφοροποίησή τους και διατηρώντας την αυτό-ανανέωσή τους. Γενικά, ο πολλαπλασιασμός ή η διαφοροποίηση των γαμετικών βλαστικών κυττάρων ρυθμίζονται παρακρινώς από τους παράγοντες Wnt, Notch, FGFs και Hedgehog, με τους 3 τελευταίους να δρουν ανταγωνιστικά του πρώτου.

Βέβαια, κάποιοι παράγοντες όπως οι Hedgehog διαθέτουν ευρύτερο φάσμα επιρροής και δεν επάγουν τον πολλαπλασιασμό μόνο των βλαστικών κυττάρων, αλλά και άλλων σωματικών κυττάρων στο περιβάλλον της έδρας, ενισχύοντας τη δημιουργία της. Αυτό, για παράδειγμα συμβαίνει στις ωοθήκες της *Drosophila* (Podos and Ferguson, 1999). Ο όρος «ενίσχυση της δημιουργίας της έδρας» έγκειται στην συμβολή των παραγόντων Hedgehog στην οργάνωση και τον σχηματισμό τους. Αντίστοιχα και ο παράγοντας Sonic hedgehog συμβάλει στη δημιουργία της έδρας στα θυλάκια της επιδερμίδας, διαχωρίζοντας παράλληλα και δυο υποπληθυσμούς των υπαρχόντων βλαστικών κυττάρων.

Όσον αφορά το έντερο, η αρχιτεκτονική των εδρών που επηρεάζεται από την παρουσία των Sonic hedgehog και Indian κατά την ανάπτυξη. Οι δύο αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν την πυκνότητα, τις διαστάσεις και τη λειτουργία των εδρών, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο την πορεία των βλαστικών κυττάρων (Pitulescu and Adams, 2010).

Οι εφρίνες αποτελούν μία άλλη κατηγορία παραγόντων που εντοπίζονται κυρίως σε δομικούς νευρικούς και αγγειακούς ιστούς και φαίνεται να επηρεάζουν επίσης τη λειτουργία της έδρας σε κάποιων ειδών βλαστικά κύτταρα. Από μελέτες έχει προκύψει πως η εφρίνη B1 (ephrin B1) και οι υποδοχείς της Eph B2 και B3 εντοπίζονται στα επιθηλιακά του εντέρου συμβάλλοντας στην αρχιτεκτονική τους (Pitulescu and Adams, 2010). Αν αυτοί οι υποδοχείς εκφραστούν διαφορετικά από ότι πρέπει, μεταβάλλεται η αρχιτεκτονική των κρυπτών και των λαχνών του εντέρου και επάγεται η εμφάνιση εκβλαστήσεων πολυπόδων λόγω πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων (Pitulescu and Adams, 2010).

Δεν είναι μόνο οι εξωκυττάριοι παράγοντες που επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον της έδρας. Ακόμα και οι συγκεντρώσεις ιόντων μπορεί να υποβοηθούν ή όχι την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων. Κάτι τέτοιο φαίνεται να συμβαίνει με την υψηλή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στην επιφάνεια των οστών, όπου συνήθως διαφοροποιούνται οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες. Αυτά τα κύτταρα επικοινωνούν με το περιβάλλον τους μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες και έτσι καταλαβαίνουν την παρουσία του ασβεστίου. Τέτοιοι υποδοχείς έχουν υψηλό ρυθμό έκφρασης σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, κύτταρα μυελού των οστών και κάποια πιο ώριμα αιμοποιητικά (Whetton, 2004).

Τέτοιου είδους μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ιόντων και άλλων μεταβολικών προϊόντων υποδεικνύουν πως τα βλαστικά κύτταρα επικοινωνούν με τα σήματα του περιβάλλοντός τους και δρουν αναλόγως. Ένας αρνητικός παράγοντας της ανάπτυξής τους για παράδειγμα είναι το οξειδωτικό στρες (Whetton, 2004). Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν πολλές αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου συγκεντρώνονται στο περιβάλλον των κυττάρων. Ειδικά αν ο παράγοντας Ataxiatelangiectasiamutated-ATM απουσιάζει, η συγκέντρωση αυτή υποβοηθείται. Ρόλο επίσης παίζει και η κινάση cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a, η υψηλή έκφραση της οποίας φαίνεται να προκαλεί διαταραχές στα βλαστικά κύτταρα. Η λύση είναι η παροχή αντιοξειδωτικών ουσιών, έτσι ώστε να μειωθεί η έκφρασή της (Whetton, 2004).

2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΜΦΩΛΕΥΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Όντας ένα πολυσύνθετο πρόβλημα, η στρατολόγηση βλαστικών κυττάρων που παράγουν κυτταρικές σειρές του αίματος και από τον μυελό των οστών, καθώς και οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται για την εμφώλευσή τους δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι. Έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις ιστικής βλάβης τα βλαστικά κύτταρα μετακινούνται εντονότερα προς το όργανο ή τον ιστό με το πρόβλημα λόγω μικροαλλαγών στο περιβάλλον τους. Συνήθως απελευθερώνονται χημειοκίνες, οι οποίες συνδέονται σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των βλαστικών κυττάρων. Ένας από τους πιο σημαντικούς υποδοχείς που σχετίζεται με την στρατολόγηση κυττάρων είναι ο CXCR4. Ο CXCR4 είναι ο υποδοχέας της χημειοκίνης CXCL12 (stromal derived factor-1, SDF-1), η διαφορική έκφραση της οποίας δημιουργεί βαθμίδωση απαραίτητη για την εμφώλευση των CXCR4+ κυττάρων (Calandra et al., 2010). Επιπλέον του CXCR4, στην μετακίνηση των βλαστικών κυττάρων έχουν ρόλο και ο CCR7, η χημειοκίνη secondary-lymphoid tissue χημειοκίνη (SLC) και ο CCR2 (Calandra et al., 2010).

Προφανώς ρόλο στην στρατολόγηση έχει και η έδρατροποποιώντας και μεταδίδοντας σήματα από το περιβάλλον. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοποιητικά κύτταρα σε σταθερή κατάσταση πολλαπλασιάζονται και διεγερθούν με επιπλέον χορήγηση κυτταροκινών G-CSF, GM-CSF και IL-8. Ο G-CSF επηρεάζει τη έκφραση της χημειοκίνης CXCL12 των οστεοβλαστών, με αποτέλεσμα να στρατολογούνται τα CXCR4+ κύτταρα. Επίσης, η λειτουργία του συνδέθηκε με το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Μελέτες με ποντίκια που διέθεταν βλάβη στο σύστημα αυτό, έδειξαν ότι δεν ήταν εύκολη η στρατολόγηση βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών από τη φωλιά. Άρα ο G-CSF ασκεί κάποια επίδραση στο νευρικό σύστημα που καταλήγει στην διαφορετική συμπεριφορά των βλαστικών κυττάρων.

Εν κατακλείδι, φαίνεται πως δίκτυα όπως το νευρικό και το κυκλοφορικό, τα οποία αποτελούν οδούς σύνδεσης μεταξύ των οργάνων του οργανισμού, καθίστανται τα μέσα μετάδοσης σημάτων και ερεθισμάτων στα βλαστικά κύτταρα, σχετικά με τις μεταβολές στους διάφορους ιστούς. Εξ ου και η στενή επαφή των βλαστικών κυττάρων με μικρά αγγεία που υπερεκφράζουν CXCL12 και E-selectin. Πάντως, τα στοιχεία που αποδεικνύουν πως αυτές οι περιοχές όντως ρυθμίζουν τα βλαστικά κύτταρα είναι ακόμα ασαφή (Calandra et al., 2010).

2.6 ΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σχεδόν όλοι οι τύποι βλαστικών κυττάρων φαίνεται να είναι ικανοί να χρησιμοποιηθούν σε γενετικές και κυτταρικές θεραπείες. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, η χορήγηση τέτοιων κυττάρων μπορεί να είναι η λύση για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων, όπως εκφυλιστικά, αυτοάνοσα και γενετικά νοσήματα. Καίρια καθίσταται η ανάγκη εύρεσης μιας ασφαλούς και αξιόπιστης πηγής βλαστικών κυττάρων, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα τερατογένεσης κατά την μεταμόσχευση. Στόχος είναι η αναγέννηση και η αποκατάσταση των βλαβών στους ιστούς-στόχους.

Επίσης η θεραπευτική κλωνοποίηση (μεταφορά πυρήνα από ένα σωματικό κύτταρο δότη σε ένα ωοκύτταρο δέκτη από το οποίο έχει προηγουμένως αφαιρεθεί ο πυρήνας) αποτελεί μια ακόμα εναλλακτική πηγή αρχέγονων βλαστικών κυττάρων για θεραπείες κυτταρικής αποκατάστασης όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα όργανα για μεταμόσχευση»(Yoshida and Yamanaka, 2010). Πρακτικά μία τέτοια τεχνική απαιτεί την ενδοφλέβια ή την υποδόρια χορήγηση βλαστικών κυττάρων στην περιοχή-στόχο. Παρόλα τα πλεονεκτήματα, όμως, είναι πολύ πιθανό να εμφανιστούν επιπλοκές σε αυτού του είδους την θεραπεία, όπως η εμφάνιση των παρακάτω ασθενειών: διαβήτη, οξεία ηπατική και καρδιακή ανεπάρκεια, μυϊκές διαταραχές, αρθρίτιδες, εγκεφαλικές διαταραχές ή βλάβη, διαταραχές όρασης, νεφρικές διαταραχές, νοσήματα του αιμοποιητικού συστήματος ή του συστήματος ανοσίας και νεοπλασματικά νοσήματα, όπως οξεία λευχαιμία, λέμφωμα και διάφοροι όγκοι συμπαγών οργάνων (Yoshida and Yamanaka, 2010).

Καθώς τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα και μεταναστεύουν με ευκολία, η ιστική αναγέννηση καθίσταται άμεση, καθώς μετά από έγχυσή τους, μεταναστεύουν γρήγορα στον ιστό-στόχο και πολλαπλασιάζονται (Yoshida and Yamanaka, 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, τα βλαστικά κύτταρα έχουν πιθανή εφαρμογή και στη γονιδιακή θεραπεία γενετικών και ανιάτων νοσημάτων όπου ένα ελλατωματικό γονιδιακό προϊόν αντικαθίσταται. Έχουν όμως εντοπιστεί αρκετά προβλήματα σε αυτό το πεδίο, που αφορούν την γονιδιακή θεραπείά τους αναγνώριση των φορέων από το σύστημα ανοσίας, η μη ειδική

συσσώρευση των φορέων σε φυσιολογικούς ιστούς και η φτωχή διείσδυση των φορέων στους ιστούς-στόχους. Ένας τρόπος να επιλυθεί αυτό το πρόβλημα είναι να χρησιμοποιηθούν τα βλαστικά κύτταρα στους ιστούς-στόχους σαν φορείς, μέσω των οποίων να χορηγούνται οι θεραπευτικοί παράγοντες (Yoshida and Yamanaka, 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μελέτες χρόνων έχουν υποδείξει την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου σε ιστούς με μεγάλη διάρκεια ζωής και αυξημένους ρυθμούς αυτοανανέωσης, όπως ο πνεύμονας, το έντερο και το αίμα, ενώ οι κακοήθειες συνδέονται με τον νευρικό ιστό (μυελοβλάστωμα, νευροβλάστωμα) και τα όργανα που συνεχίζουν να αναπτύσσονται και μετά τη γένεση (ηπατοβλάστωμα, νεφροβλάστωμα).

Πειράματα σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς έφερε στην επιφάνεια κάποια κύτταρα που είχαν την ιδιότητα να προκαλούν καρκίνο όταν μεταμοσχεύθηκαν στους συγκεκριμένους ποντικούς. Η εμφάνιση του καρκίνου έγινε αρχικά στο περιφερικό αίμα (οξεία μυελογενής λευχαιμία) και έπειτα εγκαταστάθηκε σε πιο συμπαγή όργανα. Αυτά τα αποτελέσματα έδωσαν την απαιτούμενη ώθηση για την διεύρυνση της μελέτης του καρκίνου προς την κατεύθυνση των κυττάρων υπεύθυνων για την εμφάνιση και τη συντήρηση ενός όγκου (Jordan et al., 2006).

Όπως έχει προαναφερθεί, οι όγκοι συνίστανται από κύτταρα με μεγάλη ετερογένεια σχετικά με τον φαινότυπο και την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι ένα πολύ μικρό ποσοστό τους και δύναται πέρα από τη δημιουργία του να συμβάλλουν και στην διατήρησή του και στην μετάστασή του. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν τις ίδιες ιδιότητες με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα.

Η προέλευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα είτε από διαφοροποιημένα κύτταρα. Η μεταστροφή προς καρκινικά κύτταρα προκαλείται από την εμφάνιση μεταλλαγών σταγονίδια των φυσιολογικών κυττάρων (Jordan et al., 2006).

Στην πρώτη περίπτωση προκαλούνται ογκογενετικές μεταλλαγές, οι οποίες δημιουργούν πρόβλημα στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού τους (Jordan et al., 2006). Μία συνήθης περίπτωση είναι η στρατολόγηση των κυττάρων της φωλιάς στην περιοχή του όγκου, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την αυτό-ανανέωσή τους. Αυτή η στρατολόγηση επάγεται από μεταλλαγές σε γονίδια που ρυθμίζουν την έκκριση παραγόντων ικανών να προσελκύσουν τα κύτταρα της φωλιάς.

Μία άλλη περίπτωση είναι η πιθανότητα ενεργοποίησης συγκεκριμένων μονοπατιών αυτό-ανανέωσης σε φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα λόγω μεταλλάξεων σε αντίστοιχα γονίδια. Έτσι, μπορούν να ανταποκρίνονται σε σήματα στα οποία φυσιολογικά δεν θα αποτελούσαν ερέθισμα για αυτά, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται μονοπάτια που κανονικά θα ρυθμιζόνταν από την έδρα και να μετατρέπονται σε καρκινικά.

Οι μεταλλαγές αυτές στα γονίδια θα μπορούσαν να επιφέρουν την έκφραση κάποιων μορίων που φυσιολογικά εντοπίζονται στα κύτταρα των εδρών μόνο ή την έκφραση υποδοχέων για μόρια που ελέγχουν την αυτό-ανανέωσή τους (Jiang and Nie, 2010).

Στην δεύτερη περίπτωση, τα διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα υπόκεινται μεταλλαγές, οι οποίες ωθούν τον πολλαπλασιασμό τους, προσπερνώντας την μετα-μιτωτική φάση. Έτσι, δημιουργείται ένα συσσωμάτωμα πολλών νέων αυτο-ανανεούμενων κυττάρων που, λόγω του ταχέως πολλαπλασιασμού τους, συγκεντρώνουν κι άλλες μεταλλάξεις στο γονιδιώμα τους και καταλήγουν σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα.

Οι πιθανότερες συνέπειες των μεταλλαγών αυτών στα γονιδιώματα των βλαστικών κυττάρων είναι η καταστροφή συγκεκριμένων αλληλουχιών που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, η αλλαγή γονιδίων σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο ή την απόπτωση (π.χ. ογκοκατασταλτικά γονίδια) και η καταστροφή των μηχανισμών ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Jiang and Nie, 2010).

Έχουν σχηματιστεί δύο θεωρίες – μοντέλα σχετικά με την προέλευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Η πρώτη είναι το ιεραρχικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο ο ετερογενής όγκος προέρχεται από μία μικρή υποομάδα καρκινικών βλαστικών κυττάρων, η οποία διαφοροποιείται προς όλα τα είδη κυττάρων του όγκου (Jiang and Nie, 2010). Η δεύτερη θεωρία περιλαμβάνει το στοχαστικό μοντέλο ογκογένεσης στο οποίο κάθε κύτταρο έχει την ικανότητα να σχηματίσει έναν όγκο κάτω από ορισμένες συνθήκες και δεν απαιτείται η ύπαρξη κάποιου αρχικού καρκινικού κυττάρου.

Η ετερογένεια η οποία χαρακτηρίζει τους όγκους επάγεται κυρίως από τα ερεθίσματα που ποικίλουν στο περιβάλλον του όγκου και την ύπαρξη κάποιων τυχαίων σωματικών μεταλλαγών. Άρα η τρισδιάστατη δομή του ετερογενούς όγκου είναι αποτέλεσμα διαφοροποιήσεων στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων (Jiang and Nie, 2010). Μελέτες με κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων έχουν υποδείξει τον «αθάνατο» χαρακτήρα των κυττάρων αυτών. Με άλλα λόγια, τα κύτταρα αυτά αποκτούν απεριόριστο δυναμικό

πολλαπλασιασμού. Για να φτάσει ένα κύτταρο σε αυτήν την φάση, θα πρέπει να αποφύγει την απόπτωση. Η επίτευξη αυτού ικανοποιείται αν καταφέρει να διατηρήσει το μήκος των τελομερών των χρωμοσωμάτων του. Το κύτταρο το επιτυγχάνει αυτό μέσω του ενζύμου τελομεράση. «Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικόενζυμικό σύμπλεγμα το οποίο αντirroπεί την προοδευτική μείωση του μήκους των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών των τελομερών και δεν ανιχνεύεται συνήθως στους φυσιολογικούς ιστούς». Στα καρκινικά κύτταρα, μεταλλαγές αλλάζουν την έκφραση της τελομεράσης, ενεργοποιώντας και την αντίστροφη μεταγραφάση για την επέκταση των άκρων των χρωμοσωμάτων. Ένα γονίδιο που επηρεάζει θετικά την έκφραση της τελομεράσης στα επιθηλιακά κύτταρα είναι το Bmi-1.

Απαιτούνται ακόμα αρκετά πειράματα για να γίνει σαφής ο μοριακός μηχανισμός πίσω από τη λειτουργία της τελομεράσης. In vivo, η έκφρασή της είναι επίσης διαφορετική από καρκινικό κύτταρο σε καρκινικό κύτταρο. Υπάρχουν όμως μελέτες που υποδεικνύουν τον μικρό ρυθμό έκφρασης της τελομεράσης στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, ο οποίος εκμηδενίζεται αν αυτά διαφοροποιηθούν (Jiang and Nie, 2010).

3.2 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα βλαστικά κύτταρα, είτε είναι φυσιολογικά είτε καρκινικά, διαθέτουν ομοιότητες σχετικά με τον φαινότυπό τους και τους μοριακούς μηχανισμούς που επιστρατεύουν για τη δράση τους. Παραδείγματος χάριν, καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον εγκέφαλο εξέφραζαν ίδιους δείκτες με τα φυσιολογικά νευρικά βλαστικά κύτταρα και ο πολλαπλασιασμός τους εξαρτιόνταν από τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η επίδραση των ίδιων παραγόντων, για παράδειγμα των σηματοδοτικών μονοπατιών Hedgehog, Wnt και Notch, προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αλλά στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα ρυθμίζει την αυτοανανέωση (Dominguez-Braueretal., 2010).

Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες που προέρχονται από την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως τα p53, p16INK4a και p19ARF σταματούν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αυτο-ανανέωση των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων. Οπότε, το θέμα

που προκύπτει είναι το αν μπορεί να πραγματοποιηθεί αναγνώριση των διαφορών μεταξύ αυτών των δύο ειδών βλαστικών κυττάρων σε μοριακό επίπεδο.

Το PTEN (phosphatase and tensin homologue) είναι μία φωσφατάση, η οποία αναστέλλει τη σηματοδοτική οδό του PI3K/Akt, σταματώντας τον πολλαπλασιασμό και κατ' επέκτασιν την επιβίωση των κυττάρων. Σε καρκινικά κύτταρα, η συγκεκριμένη φωσφατάση είναι απενεργοποιημένη (Dominguez-Brauer et al., 2010).

Το 2005, ο Goszer και οι συνεργάτες του επικεντρώθηκαν στο ρόλο του PTEN και πιο συγκεκριμένα, ανέστειλαν τη συγκεκριμένη φωσφατάση στο γλοιοβλάστωμα. Το αποτέλεσμα της έρευνας έδειξε ότι ο PTEN συγκρατεί τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων *in vivo* (Dominguez-Brauer et al., 2010). Όταν απαλείφθηκε στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, η αυτοανάνεωση των κυττάρων αυξήθηκε δραματικά, και πιο συγκεκριμένα η μετάβαση από τη φάση G0 στη G1 του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιούνταν πολύ πιο γρήγορα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα δεν εξαρτιόνταν πλέον άμεσα από διάφορους αυξητικούς παράγοντες.

Ένα χρόνο αργότερα, το 2006, ο Yilmaz και συνεργάτες του, ταυτόχρονα με τον Zhang και την ομάδα του, εστίασαν στην απαλοιφή της ίδιας φωσφατάσης (PTEN) σε λευχαιμικά και φυσιολογικά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια: η απουσία του PTEN οδήγησε στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτή τη φορά, τα αποτελέσματα συνδέθηκαν με κάποιες επιπλέον παρατηρήσεις σχετικά με την συγκέντρωση των βλαστικών κυττάρων. Αρχικά, φάνηκε πως άλλαξε η θέση των κυττάρων, αφού περισσότερα κύτταρα βρέθηκαν στο αίμα και στον σπλήνα, ενώ δεν μπορούσαν να παραμείνουν στο μυελό των οστών. Έπειτα, παρατηρήθηκε πως τα βλαστικά κύτταρα δεν κατευθυνόντουσαν προς διαφοροποίηση για κύτταρα της λευκής σειράς και, τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του άκριτου πολλαπλασιασμού τους, ο αριθμός της δεξαμενής των βλαστικών κυττάρων μειώθηκε. Αυτές οι παρατηρήσεις συνδέθηκαν με την ενεργοποίηση δύο παραγόντων, των mTOR και Akt (Groszer et al., 2006).

Συνοψίζοντας όσα προαναφέρθηκαν, η φωσφατάση PTEN αποτελεί σημείο ελέγχου του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων, λαμβάνοντας μέρος στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς του. Οι δοθείσες μελέτες υπέδειξαν τα συμπεράσματα της απαλοιφής του PTEN σε φυσιολογικά και καρκινικά βλαστικά κύτταρα.

3.3 ΒΙΟΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Βάσει των δεδομένων των μελετών των τελευταίων χρόνων, φαίνεται ότι η εμφάνιση του καρκίνου προϋποθέτει την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που καταστέλλουν την αύξηση του αριθμού των κυττάρων.

Η μελέτη του καρκίνου διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες την βιοενεργητική των όγκων και την υπόθεση πρόκλησης καρκίνου μέσω των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Ο συνδυασμός των δύο αυτών προσεγγίσεων ίσως άλλαζε τα δεδομένα μας σχετικά με την αντιμετώπισή του. Ούτως ή άλλως ήδη υπάρχουν ενδείξεις πως αυτές οι προσεγγίσεις συνδέονται μεταξύ τους.

Το 1931 το βραβείο Νόμπελ δόθηκε στον Otto Warburg για την έρευνά του πάνω στην αναπνευστική δυσλειτουργία στον καρκίνο. Φυσιολογικά, στους ιστούς η πηγή ενέργειας των κυττάρων είναι τα μιτοχόνδρια όπου παρουσία οξυγόνου πραγματοποιείται ο μεταβολισμός της γλυκόζης προς ATP με ταυτόχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και νερού. Αντίθετα, ο Warburg έδειξε ότι καρκινικά κύτταρα λαμβάνουν το ATP που χρειάζονται μέσω αναερόβιο μεταβολισμού της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ και έτσι δεν εξαρτώνται από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, παρόλο που υπάρχει οξυγόνο στο περιβάλλον τους.

Παρόλα αυτά, η θεωρία του αργότερα αποδείχθηκε λανθασμένη καθώς ανακαλύφθηκε πως στα καρκινικά κύτταρα τα μιτοχόνδρια υπερλειτουργούν, παράγοντας μεγάλες ποσότητες ATP απουσία οξυγόνου. Την ίδια περίοδο αναπτύχθηκε ταχύτητα η μοριακή βιολογία και το ενδιαφέρον των επιστημόνων στράφηκε προς τις γενετικές διαφοροποιήσεις των βλαστικών κυττάρων, αφήνοντας στην άκρη την βιοενεργητική και τον Warburg (Garber, 2006).

Οι νέες μελέτες όμως αρχίζουν να υπογραμμίζουν την δουλειά του Warburg στην ογκογένεση τονίζοντας την σημαντικότητα της βιοενεργητικής στην εμφάνιση όγκων. Η λειτουργία του γονιδίου p53, ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στον καρκίνο, φαίνεται να συνδέεται με την υπόθεση του Warburg, υποδεικνύοντας ότι η ογκογένεση απαιτεί γλυκόλυση και ταυτόχρονη μείωση της αναπνοής (Garber, 2006).

Η υποξία στο περιβάλλον των όγκων δρα ρυθμιστικά για τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών, διατηρώντας τις λειτουργίες τους, ελέγχοντας τον κυτταρικό κύκλο τους και τον μεταβολισμό τους, επιτρέποντάς τα να επιβιώσουν ακόμα και υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (Garber, 2006).

Παρά τα στοιχεία που έχουν συγκεντρωθεί η υπόθεση του Warburg για την εμφάνιση του καρκίνου αποτελεί ένα αντιμαχόμενο σημείο στην επιστημονική κοινότητα. Πάντως δεν έχουν λείψει οι προσπάθειες σύνδεσης της βιοενεργότητας του καρκίνου με την καρκινογένεση με σκοπό την αξιολόγηση αντικαρκινικών φαρμάκων.

Το 1937 οι Furth και Kahn εισήγαγαν ένα ογκογόνο κύτταρο σε ποντικούς και προκλήθηκε σε αυτούς λευχαιμία. Άρα, όλα τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα δύναται να προκαλέσουν καρκίνο αν μετατραπούν σε ογκογόνα. Καρκινικά κύτταρα βρέθηκαν σε λευχαιμικούς όγκους, σε όγκους στον εγκέφαλο, στους μαστούς και στο γαστρεντερικό σύστημα (Garber, 2006).

Σίγουρα ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων στον όγκο δεν παίζει και τόσο μεγάλο ρόλο, καθώς και λίγα μόνο κύτταρα μπορεί να αποδειχθούν δύσκολα στην αντιμετώπιση μέσω χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας.

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα διαθέτουν εξειδικευμένους επιφανειακούς δείκτες όπως «*musashi-1 (Msi-1)*, *hairyandenhancerofsplithomolog-1 (Hes-1)*, *CD133 (prominin-1, Prom1)*, *epithelialcellularadhesionmolecule (Epcam)*, *claudin-7*, *CD44 variantisoforms* και *Lgr5*» (Giordano et al., 2007). Ακόμα δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για τους δείκτες αυτούς που επάγουν την διαφοροποίηση σε πιο συμπαγείς όγκους, όπως οι όγκοι του γαστρεντερικού συστήματος (Giordano et al., 2007).

Σύμφωνα με μελέτες, η υποξία και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αν και με την πρώτη ματιά δεν συνδέονται κάπως φυσιολογικά στα κύτταρα, είναι πιθανό να συνυπάρχουν κατά την ανάπτυξη του όγκου. Μία μελέτη, μάλιστα, συνέδεσε την εξοκινάση 2 και τον μιτοχονδριακό της υποδοχέα voltage-dependent anion channel (Vdac), με τα χαρακτηριστικά που πρότεινε ο Warburg για την ανάπτυξη του καρκίνου.

Εφόσον η γλυκόλυση αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό και των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, είναι λογικό το ότι ελέγχεται από γονίδια όπως οι *Myc*, *Hif-1* και *p53*. Προφανώς η επίτευξη της αθανатоποίησης και της προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων στο νέο

αφιλόξενο περιβάλλον (υποξία, οξειδωτικό στρες) απαιτεί αυξημένους ρυθμούς γλυκόλυσης (Giordano et al., 2007).

Μπορεί η προσέγγιση της βιοενεργητικής των καρκινικών βλαστικών κυττάρων με τις αντίστοιχες μελέτες να βοήθησε στην βαθύτερη κατανόηση του καρκίνου, αλλά ο στόχος συνεχίζει να είναι η διάγνωση και η θεραπεία του. Σίγουρα όμως οι μελέτες σχετικά με τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι αναγκαίες για την αντίληψη των δυνατοτήτων των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

3.4 ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Έχει αναφερθεί ότι τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μια ισορροπία μεταξύ συμμετρικής και ασύμμετρης διαίρεσης. Η συμμετρική διαίρεση αποτελεί μία προϋπόθεση για την μεταλλαγή των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων σε καρκινικά και την ανάπτυξη ενός όγκου.

Γενικά οι ασύμμετρες διαιρέσεις καταστέλλουν την ανάπτυξη ενός όγκου, μιας και έχουν συντηρητική λειτουργία για τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα, ένα γονίδιο που συνδέεται με την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση είναι το γονίδιο της αδενωματώδους πολυποδίασης του εντέρου (adenomatous polyposis coli, APC) και αποτελεί ογκοκατασταλτικό γονίδιο για τα εντερικά βλαστικά κύτταρα στη *Drosophila*. Δεν είναι σαφές αν αυτό το γονίδιο επάγει την ασύμμετρη διαίρεση, αλλά οι ομοιότητες μεταξύ καρκίνου του εντέρου και εντερικών βλαστικών κυττάρων είναι αξιοσημείωτες. Αντίθετα, έχουν εντοπιστεί γονίδια που ενεργοποιούν την συμμετρική διαίρεση και έχουν ρόλο ογκογονιδίου στα θηλαστικά (Giordano et al., 2007).

Ένα παράδειγμα αποτελεί η atypical protein kinase (aPKC), «η οποία φυσιολογικά εντοπίζεται στο κορυφαίο τμήμα του κυτταρικού φλοιού των νευροβλαστών ως τμήμα του συμπλέγματος PAR-aPKC και η ενεργοποιημένη μορφή της προκαλεί εξαιρετικά μεγάλη αύξηση στις συμμετρικές διαιρέσεις των νευροβλαστών». Οι συμμετρικές διαιρέσεις είναι ικανές να προκαλέσουν την εμφάνιση ανευπλοειδίας (Morrison and Kimble, 2006)

Ο ίδιος μηχανισμός που ρυθμίζει την μιτωτική άτρακτο παίζει ρόλο και στην ασύμμετρη διαίρεση. Η ανευπλοειδία μπορεί να προέλθει από λανθασμένη δομή ή λειτουργικότητα του

κεντροσωματίου, όπως αποδείχτηκε σε νευροβλάστες της *Drosophila*, που έχει ως αποτέλεσμα το λανθασμένο μοίρασμα των χρωμοσωμάτων.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμβάλλουν στην ορθή λειτουργία του κεντροσωματίου και στα θηλαστικά. Σε μία τάση να αποφευχθεί η γονιδιακή αστάθεια, διενεργείται αυστηρή ρύθμιση της μιτωτικής ατράκτου και του κεντροσωματίου. Με αυτόν τον τρόπο το κύτταρο σιγουρεύει πως τα θυγατρικά όντως θα κατευθυνθούν προς διαφορετικές κυτταρικές σειρές, έχοντας όμως τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων (Morrison and Kimble, 2006).

Συνοψίζοντας, οι συμμετρικές διαιρέσεις αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης όγκου, καθώς επάγουν τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και είναι πιο πιθανές οι μεταλλαγές που θα βγάλουν εκτός ελέγχου τις μιτωτικές ατράκτους και των κεντροσωματίων (Morrison and Kimble, 2006).

Μπορεί τα παραπάνω να αποτελούν ακόμα μη εμπειριστατωμένες θεωρίες, αλλά η σημαντικότητα τέτοιων μελετών είναι τεράστια για την προσπάθεια κατανόησης των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του είδους της διαίρεσης που θα υποστεί ένα κύτταρο μία δεδομένη χρονική στιγμή (Morrison and Kimble, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ

Η γονιδιωματική αστάθεια συνίσταται στην τάση των κυττάρων να συσσωρεύουν μεταλλάξεις που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη δομή του γονιδιώματος, όπως διαγραφές, μετατοπίσεις, διακυμάνσεις στον αριθμό αντιγραφής των χρωμοσωμάτων (CNVs).

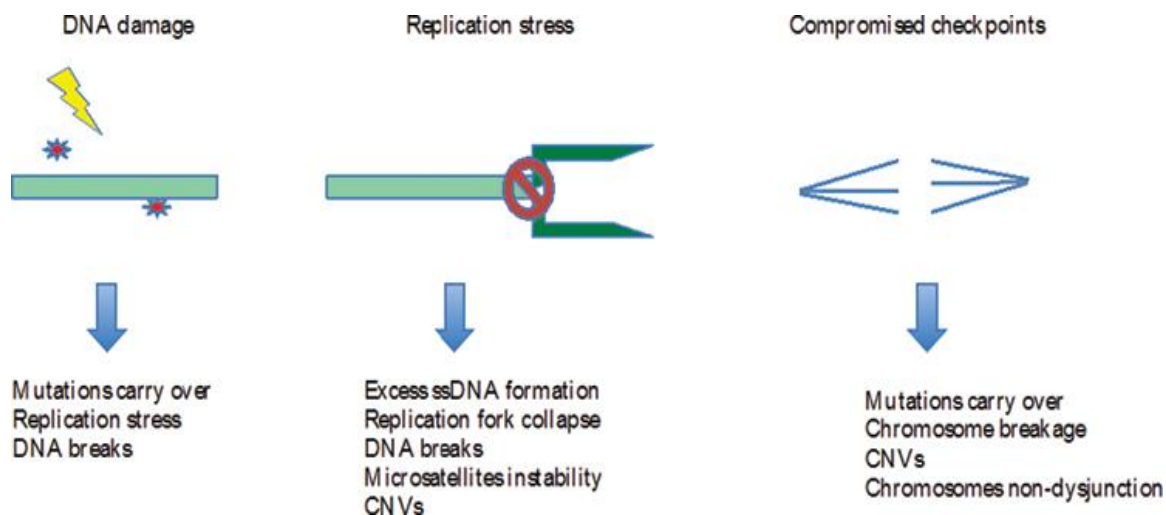
Η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος εξαρτάται από τις κυτταρικές διεργασίες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό του DNA, όπως η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή, η επισκευή, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και ο συντονισμός όλων με τον κυτταρικό κύκλο. Ο συντονισμός αυτός ενορχηστρώνεται από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Bai et al., 2015).

Μόλις ενεργοποιηθούν, οι σηματοδοτικές οδοί επιβραδύνουν τον κυτταρικό κύκλο, ενεργοποιούν την επισκευή του DNA και προωθούν την ανάκτηση του πολλαπλασιασμού, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι οι γενετικές πληροφορίες μεταδίδονται πιστά στα θυγατρικά κύτταρα. Για παράδειγμα, το σημείο ελέγχου S-φάσης περιορίζει την έναρξη της φάσης M, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι όλο το DNA έχει αναπαραχθεί πριν τα κύτταρα εισέλθουν στη διαίρεση.

Από την άλλη πλευρά, το σημείο ελέγχου M-φάσης καθυστερεί, ώστε να διασφαλιστεί ότι τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα μεταδίδονται πιστά στο θυγατρικό κύτταρο. Είναι σημαντικό ότι τα σημεία ελέγχου διατηρούν, επίσης, την ομοιότητα των ιστών, καθώς μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο για να αποφύγουν τη διάδοση των κυττάρων με ασταθή και/ή ιδιαίτερα κατεστραμμένα γονιδιώματα (Avery et al., 2013).

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος είναι πρωταρχική για τα βλαστοκύτταρα, δεδομένης της δυνατότητάς τους να δημιουργούν πολλαπλές διακεκριμένες κυτταρικές γενεές. Οι μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν στην κληρονομικότητα των ασυνεχειών του DNA σε διαφοροποιημένα κύτταρα με δυνητικά καταστροφικές συνέπειες, όπως χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και διαγραφές.



Εικόνα 2: DNA damage mechanism

Οι γενετικές ανωμαλίες μπορούν να επηρεάσουν την συγκέντρωση βλαστικών κυττάρων ή να αυξήσουν τις πιθανότητες κακοήθους μετασχηματισμού, καθώς αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση των ογκογόνων ή / και καταστολέων όγκων. Παραδόξως, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESC) και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) εμφανίζουν σημάδια γενωμικής αστάθειας, σε επίπεδο συγκρίσιμο με αυτό που παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα (Wood, 1996).

Αντίθετα, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (ASCs), τα οποία έχουν έντονα μειωμένη πολυδυναμία, φαίνεται να έχουν πιο σταθερά γονιδιώματα. Η εμφάνιση γονιδιωματικής αστάθειας υπονομεύει επίσης τη χρήση των PSC στην αναγεννητική ιατρική δεδομένου ότι αυτά τα κύτταρα είναι γνωστό ότι προκαλούν όγκους μόλις εγχυθούν στον οργανισμό (Pera, 2011).

4.2.1 ΒΛΑΒΗ DNA

Εξωγενείς παράγοντες, όπως χημικά και ακτινοβολίες, αλλά και η γονιδιακή έκφραση του ίδιου του DNA, παράγουν βλάβες στο DNA, οι οποίες απειλούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Οι μηχανισμοί επισκευής DNA εξασφαλίζουν ότι οι βλάβες του DNA διορθώνονται έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η απώλεια ή η τροποποίηση των γενετικών πληροφοριών. Μεταξύ αυτών των μηχανισμών είναι η επισκευή νουκλεοτιδίωνεκτομής (NER), η επιδιόρθωση βάσης εκτομής (BER), η επιδιόρθωση αναντιστοιχίας (MMR), η

επισκευή μετά την αναπαραγωγή (PRR) και η επισκευή διασταυρώσεων (ICL). Ένα ελάττωμα σε οποιαδήποτε από αυτές τις οδούς επισκευής DNA μπορεί να υπονομεύσει άμεσα τη σταθερότητα του γονιδιώματος, επηρεάζοντας τη δομή του χρωμοσώματος, ή έμμεσα δημιουργώντας μεταλλάξεις σε γονίδια σημαντικά για τη διατήρηση της γονιδιοματικής σταθερότητας. Ως εκ τούτου, η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια που ελέγχουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, προάγουν την ισχυρή αστάθεια των χρωμοσωμάτων (Bai et al., 2015).

Παρά ταύτα, δεν προάγουν όλα αυτά τα μονοπάτια την πιστή επισκευή των βλαβών του DNA. Για παράδειγμα, η επισκευή των θραύσεων της διπλής αλυσίδας (DSBs) από το NHEJ, η οποία περιλαμβάνει σύντηξη σπασμένων ελίκων του DNA τελειώνει μετά την επεξεργασία χωρίς τη βοήθεια του άλλου κλώνου του DNA, ενώ είναι επιρρεπής σε σφάλματα, σε αντίθεση με το HR το οποίο απαιτεί καλούπι του DNA για επισκευή και δεν παρουσιάζει τόσα σφάλματα. Παρομοίως, οι επισκευές ICL και PRR, που αφορούν επίσης την επισκευή της βλάβης στο DNA, είναι ομοίως επιρρεπείς σε σφάλματα (Avery et al., 2013).

4.2.2 DDR

Με την ύπαρξη βλαβών DNA προκαλείται ενεργοποίηση μηχανισμού σηματοδότησης που αποκρίνεται στις βλάβες DNA (DNA Damage Response-DDR). Το DDR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κορυφαίων πρωτεϊνικών κινασών PI3KK DNA-PKcs, ATR και ATM. Το ATR σχετίζεται περισσότερο με την ATM, μία πρωτεϊνική κινάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο που έχει μεταλλαχθεί στο σύνδρομο αταξίας τελαγγειεκτασίας (Matsuoka, Ballif, Smogorzewska, McDonald, 2007).

Αυτή η διαταραχή χαρακτηρίζεται από μια πολύ μειωμένη ικανότητα για επιδιόρθωση των επαγόμενων από ακτινοβολία DSBs και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Η ενεργοποίηση του PI3KK ακολουθεί έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης, ο οποίος οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού υποστρωμάτων μεταξύ των οποίων οι πρωτεΐνες καταστολής όγκων p53, BRCA1 και CHK1 (Matsuoka et al., 2007).

Αυτές οι πρωτεΐνες, επίσης, συγκεντρώνονται σε θέσεις βλάβης DNA και αναστέλλουν την αντιγραφή DNA και την κυτταρική διαίρεση εκτός από την προαγωγή της επιδιόρθωσης του DNA, του ανασυνδυασμού ή της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η ενεργοποιημένη CHK1 (η

φωσφορυλιωμένη μορφή της) καθυστερεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, σταθεροποιεί τις διχάλες αναδιπλασιασμού και προκαλεί τον έλεγχο της φάσης S (Van et al., 2010).

Το ATR ενεργοποιείται μετά από διάφορες μορφές βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένων των κατεστραμμένων νουκλεοτιδίων, των τεταμένων (stressed) διχάλων αναδιπλασιασμού και έμμεσα από τα DSB [14]. Το ATM αντ' αυτού είναι πιο εξειδικευμένο στην απάντηση στα DSB και στην ανίχνευση των τροποποιήσεων της κατάστασης της χρωματίνης (Vidal-Eychenié et al., 2013).

Το DNA-PKcs εμπλέκεται στην επιδιόρθωση DSBs με μη ομόλογο ανασυνδυασμό και πιο πρόσφατα, έχει επίσης βρεθεί ότι εμπλέκεται στη σηματοδότηση βλάβης του DNA συνεργιστικά με το ATR. Η φωσφορυλίωση CHK1 και / ή CHK2 μεσολαβεί στον κυτταρικό κύκλο επιβραδύνοντας ή σταματώντας επηρεάζοντας τη σταθερότητα και την μεταμεταφραστική κατάσταση κύριων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως οι πρωτεΐνες CDC25 (A, B και C) και CDKs (Vidal-Eychenié et al., 2013).

Στην φάση S, το ATR δεσμεύεται με χρωματίνη για την παρακολούθηση της εξέλιξης της αντιγραφής και ενεργοποιείται μετά την δημιουργία επιπλέον μονόκλωνης έλικας DNA (ssDNA) ως αποτέλεσμα της καθυστέρησης ή της παύσης της αντιγραφής όπου έχουν υποστεί βλάβη οι διχάλες (Ashley et al., 2014).

Η ενεργοποίηση του ATR απαιτεί σύνθεση ενδιάμεσων αντιγραφής επί ssDNA που ακολουθείται από την πρόσληψη συγκεκριμένων πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν αυτό το υπόστρωμα, όπως το Rad17 και το σφιγκτήρα ελέγχου 9-1-1 (Lee and Dunphy, 2013).

Η εξαρτώμενη από ATR φωσφορυλίωση της παραλλαγής ιστόνης H2AX (γ H2AX) αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη του στρες αντιγραφής (RS) και της γονιδιωματικής αστάθειας (Bakkenist and Kastan, 2003). Το ATR μπορεί επίσης να στρατολογηθεί και να ενεργοποιηθεί σε καταστάσεις DSBs μετά την παραγωγή του ssDNA με εκτομή (Cimprich and Cortez, 2008).

Το ATM συναρμολογείται στα DSB αμέσως μετά το σχηματισμό τους. Η στρατολόγηση εξαρτάται από το τριμερές σύμπλεγμα MRN (αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες Mre11, Rad50 και Nbs1), το οποίο συγκρατεί μαζί δύο άκρα DNA, αλληλοεπιδρώντας με το Nbs1 (Cimprich and Cortez, 2008).

Η βλάβη του DNA έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του ATM από ένα αδρανές ομοδιμερές σε ένα ενεργό μονομερές με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, το οποίο φωσφορυλιώνει μόρια τελεστές που διεξάγουν το DDR συμπεριλαμβανομένων των H2AX, p53, BRCA1, CHK2, RAD17, RAD9, NBS1(J. Lukasetal., 2011).

Η πρωτεΐνη MDC1 προσλαμβάνεται από την ιστόνη γH2AX μέσω των περιοχών BRCT και φωσφορυλιώνεται από το ATM, μεσολαβώντας στον εντοπισμό της λιγάσης RNF8 της ουβικουΐτινης που ενεργοποιεί την μονοουκλιτίνωση του H2AX. Η RNF168, μια δεύτερη λιγάση ουβικουΐτινης, προσλαμβάνεται και ενισχύει την απόκριση ουβικουΐτινης που καταλήγει σε πολυβιοκτινική γH2AX, η οποία οδηγεί στην πρόσληψη των Rad18, πρωτεΐνης σύνδεσης p53 (53BP1) και BRCA1, μεταξύ άλλων πρωτεϊνών, προωθώντας έτσι την αποκατάσταση των DBS είτε με HR είτε με NHEJ.

4.2.3 RS

Το RS, που ορίζεται ως μια περισσότερο ή λιγότερο έντονη επιβράδυνση ή διακοπή της διαδικασίας αντιγραφής του DNA, αποτελεί σημαντική πηγή γενωμικής αστάθειας στα διαιρούμενα κύτταρα (LambertandCarr, 2013).

Πολλά εμπόδια μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση DNA. Αυτά μπορεί να είναι εξειδικευμένες δομές DNA ή χρωματίνης ή βλάβες DNA.Ο μεταβολισμός του κυττάρου μπορεί επίσης να επάγει το RS επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα των νουκλεοτιδίων ή / και των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA, καθώς και με την παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) που δημιουργούν μεγάλη ποσότητα βλαβών του DNA (περίπου 100.000 ανά κύτταρο ανά ημέρα σε έναν οργανισμό).

Το RS παράγεται επίσης από παρεμβολή μεταξύ σύνθεσης DNA και μεταγραφής DNA που προκαλείται, για παράδειγμα, από μη προγραμματισμένη επανεισαγωγή στον κυτταρικό κύκλο, κατάσταση παρατηρούμενη κατά τη διάρκεια κακοήθους μετασχηματισμού και κατά τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων σε iPSCs(ZemanandCimprich, 2014).

Οι συγκρούσεις μεταξύ του αναδιπλασιασμού του DNA και της μεταγραφής μπορεί να οδηγήσουν σε υποδιπλασιασμό του γονιδιώματος ως αποτέλεσμα της διακοπής της σύνθεσης του DNA ή σε υπερδιπλασιασμό, ως αποτέλεσμα της ανώμαλης επανέναρξης της σύνθεσης DNA που επάγεται από ορισμένα ογκογονίδια(Neelsen et al., 2013).

Το RS επάγει βλάβη στο DNA (των οποίων οι μοριακές βάσεις δεν είναι πλήρως κατανοητές) και έτσι δημιουργεί μια κυτταρική απόκριση παρόμοια με αυτή που παρατηρείται όταν τα κύτταρα έρχονται σε επαφή με παράγοντες που καταστρέφουν το DNA (R. M. Jones et al., 2013).

Σε μοριακό επίπεδο, οι συνέπειες του RS μπορεί να είναι:

- Η δημιουργία περίσσειας ssDNA εάν διαταράσσεται η εξέλιξη των DNA πολυμερασών και όχι εκείνης της ελικάσης του DNA. Σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη πρόσδεσης ssDNA, RPA, προσλαμβάνεται και η διχάλα αναδιπλασιασμού μπορεί να υποβληθεί σε αναδιαμόρφωση σε μια διαδικασία γνωστή ως παλινδρόμηση, εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη Rad51, για περιορισμό της έκτασης του ssDNA.
- Η παύση ή μόνιμη ανασχεση της διχάλας αντιγραφής χωρίς περίσσεια σχηματισμού ssDNA λόγω παρεμπόδισης τόσο των DNA πολυμερασών όσο και της δράσης της ελικάσης. Σε αυτή την περίπτωση, οι διχάλες αναδιπλασιασμού μπορούν να επανεκκινήσουν μέσω της δημιουργίας DSB, ακολουθούμενης από εκτομή και HR που διαμεσολαβείται από το ένζυμο PARP-1.
- Η παραγωγή επιπλέον αντιγράφων του DNA ως αποτέλεσμα της υπερδιπλασιασμού του γονιδιώματος που οδηγεί σε σύγκρουση μεταξύ των διχαλών αναδιπλασιασμού.

Πρόσφατα αποδεικτικά στοιχεία υπογραμμίζουν την παρουσία διχαλών αναδιπλασιασμού σε φάσεις G2 / M που παράγονται από μη προγραμματισμένη ενεργοποίηση των κυκλίνης E και CDC25A. Σε αυτό το στάδιο, η ενδονουκλεάση Mus81 μπορεί να διασπάσει το DNA και η αντιγραφή μπορεί να συμβεί για την ελαχιστοποίηση της απώλειας γενετικών πληροφοριών (Neelsen et al., 2013).

Παρ' όλα αυτά, η βλάβη του DNA που δεν μπορούσε να διορθωθεί πριν από την είσοδο από τη μίτωση, παραμένει στον επόμενο κυτταρικό κύκλο, οδηγώντας στον σχηματισμό πυρηνικών σωμάτων που περιέχουν 53BP1 στη φάση G1 (C. Lukas et al., 2011).

Αυτά τα πυρηνικά σώματα εμφανίζονται συμμετρικά στα δύο θυγατρικά κύτταρα υποδηλώνοντας ότι πιθανώς σηματοδοτούν αδελφούς τόπους από την προηγούμενη S-φάση, όπου εξακολουθούν να υπάρχουν ανεπίλυτες βλάβες στην αντιγραφή (Furno et al., 2016). Αυτή η εξαρτώμενη από το ATM διαδικασία υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του ATM με RS είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος στους επόμενους κυτταρικούς κύκλους.

Η αστάθεια γονιδιώματος που προκαλείται από RS είναι χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των ανθρώπινων καρκίνων που μπορούν να προκύψουν από μεταλλάξεις γονιδίων επιδιόρθωσης DNA, όπως δηλώνεται από την υπόθεση του μεταλλάκτη (Halazonetis et al., 2008).

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η γονιδιωματική αστάθεια είναι παρούσα σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και προκαλεί ανάπτυξη όγκου, αυξάνοντας τον ρυθμό αυθόρμητης μετάλλαξης (Al-Tassan et al., 2002). Στη συνέχεια, οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα γονίδια που ελέγχουν το σημείο ελέγχου της βλάβης του DNA θα επέτρεπαν τον άναρχο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν τεταμένες διχάλες αναδιπλασιασμού και ασταθή γονιδιώματα (Furno et al., 2016).

Η κύρια αστάθεια που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα είναι η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) ή η CNVs, όπου η δομή και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων μεταβάλλονται σημαντικά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Kinzler and Vogelstein, 1997).

Τα κύτταρα του καρκίνου μπορούν να παρουσιάσουν άλλες μορφές γενωμικής αστάθειας, συμπεριλαμβανομένης της αστάθειας των μικροδορυφόρων (MSI ή MIN), όπου ο αριθμός των επαναλήψεων DNA που υπάρχουν στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες αυξάνεται ή μειώνεται επιπλέον των αυξημένων συχνοτήτων των μεταλλάξεων ζεύγους βάσης (Nowell, 1976).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η γονιδιωματική αστάθεια έχει αναφερθεί εκτενώς για τα ESC, ενώ τα ASC φαίνεται να έχουν πολύ πιο σταθερό γονιδίωμα. Προβλήματα στα χρωμοσώματα 8 και 11 των ESC και η τρισωμία των χρωμοσωμάτων 12 και 17 σε hESCs έχουν εντοπιστεί (Maitraetal., 2005). Αυτές οι αλλαγές φαίνεται ότι προσφέρουν ένα πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, αναφέρθηκε ότι τα hESCs έχουν την τάση να γίνονται ανευπλοειδή. Πολύ πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν τώρα ότι η ανευπλοειδία στα hESCs προκύπτει ως συνέπεια των ανωμαλιών συμπύκνωσης RS και χρωμοσωμάτων (Lefortetal., 2008). Η ανίχνευση διαφόρων δεικτών RS έχει αναφερθεί σε ESC (αν και χωρίς πλήρη ενεργοποίηση του DDR) σε σύγκριση με σωματικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ESC έχουν ισχυρή προδιάθεση για γενετική αστάθεια (Bakeretal., 2007). Μία εξήγηση για αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να είναι ότι τα ESCs εμφανίζουν μια συγκεκριμένη δομή κυτταρικού κύκλου, που αποτελείται από μια σύντομη φάση G1 και G2 και μια μεγάλη αναλογία κυττάρων σε φάση S (Furnoetal., 2016; Lammetal., 2016). Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται επίσης από δομή ετεροχρωματίνης και από αφθονία παραγόντων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (Bakeretal., 2007).

5.1 ESCs

Λόγω του πολύ συρρικνωμένου κυτταρικού κύκλου, τα mESCs έχουν ένα αναποτελεσματικό σημείο ελέγχου G1 / S, το οποίο δεν τους επιτρέπει να σταματήσουν στη φάση G1 παρουσία βλάβης DNA [56-58], ενώ το σημείο ελέγχου της φάσης S ενεργοποιείται κανονικά (Ruiz et al., 2011). Η συνέπεια αυτού του φαινομένου είναι ότι οι βλάβες που παράγονται στο G1 δεν ανιχνεύονται και συνεπώς δεν μπορούν να επιδιορθωθούν αποτελεσματικά κι έτσι θα παραμείνουν στη φάση S (Yamanaka, 2008). Για παράδειγμα, οι μη επαναλαμβανόμενες θραύσεις ssDNA που παράγονται στο G1 μπορεί να εισαχθούν και στη φάση S, δημιουργώντας έτσι DSBs που με τη σειρά τους μπορούν να επάγουν γονιδιωματικές αναδιατάξεις (Furno et al., 2016). Περιέργως, η κατάσταση φαίνεται να αντιστρέφεται στα hESCs, όπου το σημείο ελέγχου G1 / S έχει προταθεί να είναι λειτουργικό, ενώ το σημείο

ελέγχου της φάσης S φαίνεται να είναι αναποτελεσματικό (Weissbein et al., 2014). Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί ως πιθανές διαφορές στα μοριακά κυκλώματα που ρυθμίζουν την πολυτροπικότητα μεταξύ βλαστικών κυττάρων ποντικού και ανθρώπου. Η απουσία ενός σημείου ελέγχου G1 / S στα mESCs προτάθηκε αρχικά να οφείλεται σε ανεπαρκή λειτουργία p53. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η p53 μπορεί να ενεργοποιεί γονίδια-στόχους σε αυτά τα κύτταρα (Gore et al., 2011).

Τα μοριακά βάρη του αναποτελεσματικού σημείου ελέγχου G1 / S στα mESCs εξηγούνται πιο πρόσφατα από την παρουσία υψηλών επιπέδων της φωσφατάσης CDC25A λόγω της σταθεροποίησης της από την υδροξυλάση της ουβικουΐτινης DUB3, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε mESCs (Furno et al., 2016; Kinoshita et al., 2011). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της CDK2 κινάσης, η οποία ωθεί τα κύτταρα σε S-φάση ακόμη και παρουσία βλάβης του DNA, παρόμοια με ότι παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το CDC25A (Delgado-Díaz et al., 2014). Είναι ενδιαφέρον ότι το DUB3 έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την ουβικιτίνη τόσο των H2AX όσο και γH2AX σε σωματικά κύτταρα. Εάν αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση των mESCs, τότε μπορεί να εξηγηθεί γιατί αυτά τα κύτταρα αποκαθιστούν αναποτελεσματικά DSB [64], εκτός από την έκφραση χαμηλών επιπέδων DNA-PKcs (Delgado-Díaz et al., 2014).

Η καταστολή του σημείου ελέγχου G1 / S δεν συνδέεται με την πολυδυναμία. Η έκφραση του γονιδίου DUB3 στα mESCs και εκείνη του γονιδίου CDC25A στο hESCs είναι υπό τον έλεγχο των παραγόντων πολυδυναμίας (Delgado-Díaz et al., 2014). Πράγματι, η μείωση της ρύθμισης του CDC25A επάγει μια καθυστέρηση G1 / S μετά από βλάβη του DNA και τα κύτταρα διαφοροποιούνται αυθόρμητα. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, το DUB3 ρυθμίζεται πιο γρήγορα από το OCT4 κατά την έναρξη της διαφοροποίησης (ξεκινώντας από την 1η ημέρα), καθιστώντας αυτό το γονίδιο ένα νέο και ιδιαίτερα εξειδικευμένο δείκτη για τα mESCs (Bañuelos et al., 2008).

Μια άλλη μελέτη έχει δείξει ότι η συστολή της φάσης G1 είναι κρίσιμη για την καταστολή της διαφοροποίησης των mESCs. Συλλογικά αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η συστολή του κυτταρικού κύκλου είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό στα mESCs (Bañuelos et al., 2008).

Τα mESCs εμφανίζουν αυθόρμητο σχηματισμό των ιστονών γH2AX, RPA και Rad51, αλλά δεν φαίνεται να εμφανίζουν συσσώρευση DSB σύμφωνα με την απουσία 53BP1, αν και η εμφάνιση μετατοπιστών DDR (CHK1 / 2, CDC25A) μπορεί να επηρεαστεί (Ahuja et al.,

2016). Είναι δυνατόν να προβλεφθεί η παρουσία πολλαπλών επιπέδων ρύθμισης του σημείου ελέγχου της φάσης S από διάφορους παράγοντες, όπως οι τελεστές σηματοδοτικών μονοπατιών, μοναδικοί στα βλαστοκύτταρα. Ένα παράδειγμα παρέχεται από την παρατήρηση ότι η κινάση CHK2 φαίνεται να απομονώθηκε στο κεντρόσωμα σε mESCs, έτσι ώστε να μην ενεργοποιηθεί μετά την επαγωγή των DSB (Furno et al., 2016). Νέα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση των H2AX σε καλλιεργημένα ESCs δεν είναι ούτε εξαρτώμενη από το DNA-PKcs ούτε εξαρτάται από το ATM, αλλά εξαρτάται εν μέρει από την ATR. Αυτό συσχετίζεται με τη συσσώρευση κενών ssDNA, την μειωμένη ταχύτητα περόνης και την συχνή αναστροφή των περονών (Ahuja et al., 2016).

Το RS φαίνεται να συνδέεται με τη διατήρηση της αυτοανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Ακόμη, έχει καταδειχθεί ότι το επίπεδο γH2AX μειώνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των mESCs, ενώ αυξάνεται κατά τη θεραπεία με μικρά μόρια ενίσχυσης της αυτοανανέωσης, όπως ο αναστολέας των GSK και MEK, που συσχετίζονται με αυξημένη έκφραση Oct4 και Nanog (Bañuelo et al., 2008).

Περαιτέρω, ένα γονίδιο πολυδυναμίας, το FILIA, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι είναι σημαντικό για γονιδιωματική σταθερότητα σε mESCs. Αυτή η πρωτεΐνη εντοπίζεται συγκεκριμένα στα κεντροσώματα, προσλαμβάνεται σε θέσεις βλαβών του DNA, όπου διεγείρει την ενζυμική δραστηριότητα PARP1 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση της CHK2 ανεξάρτητα από την ATM (Zhao et al., 2015).

Το κύριο είδος των αυθόρμητων μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα mESCs είναι η απώλεια ετεροζυγωτίας ως συνέπεια της απώλειας / αναγωγής του χρωμοσώματος. Ωστόσο, ο ρυθμός μετάλλαξης των mESCs βρέθηκε να είναι 100 φορές χαμηλότερος από αυτόν των σωματικών κυττάρων (Zhao et al., 2015).

Αυτό είναι εκπληκτικό, δεδομένου του υψηλού επιπέδου RS που παρατηρείται στα mESCs και μπορεί να υποδηλώνει ότι αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν την γενετική αστάθεια με αυξημένη απόδοση επισκευής DNA (Zhao et al., 2015).

Ένα από αυτό θα μπορούσε να μειώσει την αποτελεσματικότητα του μιτωτικού ανασυνδυασμού σε ESCs σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα όπως παρατηρήθηκε. Ένας επιπλέον λόγος είναι ότι τα mESCs έχουν ένα αναποτελεσματικό σημείο ελέγχου G1 / S (Zhao et al., 2015).

5.2 iPSCs

Τα σωματικά κύτταρα που εκφράζουν ορισμένους παράγοντες πολυδυναμίας μπορούν να επαναπρογραμματιστούν σε iPSCs. Αυτά τα κύτταρα μοιράζονται αρκετές ομοιότητες με ESCs όπως έναν παρόμοιο συμβατικό κυτταρικό κύκλο, την ικανότητα να υποβάλλονται σε αυτοανανέωση και διαφοροποίηση, καθώς επίσης και την έκφραση δεικτών πολυδυναμίας όπως NANOG, OCT4, SOX2 και SSE-4 μεταξύ άλλων (Lister et al., 2011).

Ο επαναπρογραμματισμός αυξάνει τα επίπεδα γH2AX και προκαλεί συσσώρευση γονιδιωματικών ανωμαλιών που κυμαίνονται από ολόκληρες χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, CNVs σε σημειακές μεταλλάξεις, καθώς και επιγενετικές ανωμαλίες. Η συχνότητα μετάλλαξης των iPSCs επίσης αυξάνεται και εκτιμάται ότι είναι 10 φορές υψηλότερη από αυτή των ESC (Lister et al., 2011). Κάτι τέτοιο δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς το πρωτόκολλο επαναπρογραμματισμού περιλαμβάνει την υπερέκφραση γονοτόκων, όπως το c-myc, που εισάγει RS. Μειωμένη γονιδιωματική αστάθεια μπορεί να επιτευχθεί με υπερέκφραση της CHK1 κινάσης ή με συμπλήρωση νουκλεοτιδίων κατά τον επαναπρογραμματισμό. Το ATM είναι επίσης σημαντικό για τον επαναπρογραμματισμό (Kinoshita et al., 2011). Απ' την άλλη, τα διαγραμμένα iPSCs του ATM επαναπρογραμματίζονται λιγότερο αποτελεσματικά και έχουν αυξημένη γονιδιωματική αστάθεια. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν προφίλ γονιδιακής έκφρασης παρόμοια με ESC άγριου τύπου και διατηρούν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και στα τρία στρώματα βλαστών (Furno et al., 2016; Kinoshita et al., 2011).

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, τα iPSCs παρουσιάζουν διακοπή κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 / M και αποδοτική επισκευή DSB, εάν ενεργοποιείται το σημείο ελέγχου από την ATM με ιονίζουσα ακτινοβολία (Momcilovic et al., 2010).

Οι iPSCs αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο σε φάση G2 και επιδιορθώνουν το DSB από την HR πιθανώς με υπερέκφραση γονιδίων επιδιόρθωσης DNA. Συμπαιρένεται λοιπόν πως το σημείο ελέγχου βλάβης του DNA επηρεάζει τη διατήρηση του επαναπρογραμματισμού, υποδηλώνοντας ότι η εξαναγκασμένη διέγερση του πολλαπλασιασμού προκαλεί RS και τα κύτταρα χρειάζονται ένα λειτουργικό DDR για να το αντιμετωπίσουν (Momcilovic et al., 2010).

5.3 ASCs

Τα ASC χαρακτηρίζονται από μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης από τα ESC. Αυτά τα κύτταρα αυτοανανεώνονται για να διατηρήσουν και την ειδική ομοιόσταση ιστού και οργάνων καθόλη τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Αν και τα ASCs παρουσιάζουν πολύ λιγότερα σημάδια γονιδιακής αστάθειας από ότι τα ESCs, εξαρτώνται σημαντικά από τον ηλικιακό παράγοντα (Liu and Rando, 2011). Είναι πιθανό η συσσώρευση βλαβών και μεταλλάξεων που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της γήρανσης των βλαστικών κυττάρων οφείλεται στην απόκτηση ελαττωμάτων κατά την επισκευή του DNA, που μειώνουν το δυναμικό των βλαστικών κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι η ελαττωματική επισκευή του DNA συνδέεται στενά με αποτυχία αναγέννησης σε ορισμένους ιστούς (Furnoetal., 2016; LiuandRando, 2011).

Οι ασθενείς με αναιμία Fanconi, οι οποίοι είναι ανεπαρκείς στην αποκατάσταση του ICL, χαρακτηρίζονται από πρόωρη αποτυχία αιματοποίησης μυελού των οστών. Αυτό το γεγονός προκαλείται από τη συσσώρευση αλλοιώσεων του DNA που οδηγούν σε υπερβολική ενεργοποίηση DDR στα αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs) και τους προγόνους τους (Didieretal., 2012). Επιπλέον, το NER απαιτείται για τη διατήρηση των HSC και την πρόληψη της πρόωρης γήρανσης. Το NHEJ είναι κρίσιμο για τη διατήρηση των σκελετικών μυϊκών και μυϊκών βλαστικών κυττάρων, καθώς η μειωμένη έκφραση Ku80 (μια υπομονάδα του ετεροδιμερούς συμπλέγματος που λειτουργεί με το DNA-PKcs στο NHEJ) προκαλεί επιτάχυνση της εξάντλησης των βλαστοκυττάρων και γήρανση (Rossietal., 2007).

Στις HSCs και τους προγόνους τους, η συσσώρευση ROS μπορεί να προκληθεί από απώλεια ATM, επηρεάζοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η υπό όρους εξάντληση του ATR ή του CHK1 είναι υπεύθυνη για την πρόωρη γήρανση των φαινοτύπων στο δέρμα, τα οστά, το λεπτό έντερο και το αιμοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα την απόπτωση και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου λόγω της ταχείας συσσώρευσης αλλοιώσεων DNA. Είναι ενδιαφέρον ότι τα γερασμένα HSCs έχουν υψηλότερο ποσοστό γονιδιακής αστάθειας από ότι τα νεαρά HSC, που τροφοδοτούνται από υψηλό επίπεδο RS που παράγεται από την μειωμένη έκφραση της ελικάσης MCM2-7 (Ruzankina et al., 2009).

Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου MCM3 αποδείχθηκε επαρκής για την πρόκληση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων λόγω RS. Μια πρόσφατα αναγνωρισμένη πρωτεΐνη, το NUCLEOSTEMIN, ρυθμίζει μια πρωταρχική λειτουργία στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας των νευρικών βλαστικών κυττάρων (Alvarez et al., 2015). Αυτή η πρωτεΐνη

προάγει την πρόσληψη των RAD51 σε εστίες καταστροφής DNA που προκαλούνται από αντιγραφή και ενεργοποιεί την αναστολή ανάπτυξης ανεξάρτητα από την p53 (Furno et al., 2016).

Ο κυτταρικός κύκλος των ASC είναι αξιοσημείωτα διαφορετικός από εκείνον των ESC. Τα ASC εμφανίζουν πολύ αργό κυτταρικό κύκλο (Alvarez et al., 2015). Δεδομένου ότι το NHEJ μπορεί επίσης να δράσει κατά τη διάρκεια της φάσης G0 / G1, οι HSCs επιχειρούν να αποφύγουν τις αλλοιώσεις του DNA διατηρώντας υποξική κατάσταση και μειώνοντας την παραγωγή ROS (Nombela-Arrieta et al., 2013). Σε αυτές τις συνθήκες, το ATP παράγεται κυρίως μέσω της γλυκόλυσης αντί της μιτοχονδριακής αναπνοής. Δεδομένου ότι η τελευταία ενεργοποιείται μόνο μετά την καταχώρηση του κυτταρικού κύκλου, εξηγεί γιατί η πρώτη διαδικασία χρησιμοποιείται κυρίως από HSCs (Nombela-Arrieta et al., 2013).

5.4 ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Όλη η διαθέσιμη βιβλιογραφία δείχνει ότι τα πολυδύναμα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα είναι συχνά γονιδιακά ασταθή. Οι επιλεκτικές πιέσεις κατά την καλλιέργεια οδηγούν σε μετατοπίσεις πληθυσμών, στις οποίες τελικά θα επικρατήσουν ορισμένες πλεονεκτικές επικαλύψεις ή διαγραφές (J. C. Jones et al., 2013).

Η επιλογή αρχίζει όταν ορισμένοι κλώνοι ευδοκιμούν κατά τη διάρκεια της αρχικής παραγωγής hPSC και συνεχίζουν όταν τα κύτταρα επεκτείνονται σε καλλιέργεια και όταν οι συνθήκες καλλιέργειας αλλάζουν για να οδηγήσουν συγκεκριμένες μορφές διαφοροποίησης. Το γεγονός ότι τα κύτταρα πρέπει να διευρυνθούν και να διαφοροποιηθούν για να είναι κλινικά χρήσιμα σημαίνει ότι θα είναι δύσκολο να αναπτυχθούν συνθήκες καλλιέργειας που διατηρούν γονιδιωματικά ομοιογενείς, σταθερούς πληθυσμούς. Ωστόσο, οι αυξανόμενες ενδείξεις φυσιολογικού σωματικού μωσαϊκισμού στο ανθρώπινο σώμα δείχνουν ότι η ίδια η παραλλαγή δεν είναι απαραίτητως επιβλαβές χαρακτηριστικό και μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ζωτικής σημασίας για την κανονική ανθρώπινη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Lee et al., 2013).

Το άθροισμα της αναθεωρημένης βιβλιογραφίας δείχνει ότι παρά τους φόβους για τη γονιδιωματική αστάθεια, υπάρχουν λίγες ενδείξεις ότι πολλές από τις αλλαγές γονιδιώματος που ανιχνεύονται στα hPSC είναι πιθανό να είναι επιβλαβείς. Ωστόσο, είναι επίσης σαφές ότι ορισμένες μεταλλάξεις θα αποδειχθούν επικίνδυνες και δεν γνωρίζουμε ακόμη ποιες μεταλλάξεις εμπίπτουν σε αυτήν την κατηγορία (J. C. Jonesetal., 2013). Οι αναφορές μέχρι στιγμής δείχνουν ότι εάν ακολουθούνται αυστηρά οι προφυλάξεις όπως αυτές που περιγράφονται παραπάνω, είναι ελάχιστες οι πιθανότητες να μεταμοσχευθούν κύτταρα με κακοήθες δυναμικό (J. C. Jonesetal., 2013). Έρευνες που διεξήχθησαν την προηγούμενη δεκαετία αναφέρουν πως κανένας από τους ασθενείς που έχουν μεταμοσχευθεί με παράγωγα hPSC δεν έχει αναπτύξει όγκους. Ωστόσο, αυτό δεν πρέπει να ερμηνεύεται ως πράσινο φως για όλες τις μεταμοσχεύσεις που προέρχονται από hPSC, επειδή οι δοκιμές της Φάσης 1 (Stolberg, 1999) χρησιμοποιούν χαμηλές δόσεις κυττάρων. Όταν οι αριθμοί κυττάρων αυξηθούν σε θεραπευτικά επίπεδα (για καρδιακή νόσο, πολλά εκατομμύρια κύτταρα), η πιθανότητα εμφάνισης όγκου σε έναν ασθενή θα αυξηθεί (Leeetal., 2013).

Παρόλο που η πιθανότητα μιας κυτταρικής θεραπείας που έχει εγκριθεί από τον FDA και προκαλεί βλάβη σε έναν ασθενή φαίνεται να είναι χαμηλή, οι συνέπειες των ανεπιθύμητων ενεργειών μπορεί να είναι σημαντικές. Εάν ακόμη και ένας ασθενής υποστεί βλάβη σε μια δοκιμή εγκεκριμένη από την FDA χρησιμοποιώντας παράγωγα hPSC, όλες οι περαιτέρω δοκιμές θα υποστούν σοβαρό κίνδυνο και η υπόσχεση της θεραπείας με βλαστοκύτταρα θα τεθεί σε απεριόριστη αναμονή (J. C. Jonesetal., 2013).

5.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Από την αρχική τους ανακάλυψη, η κατανόηση της βιολογίας των hPSC έχει προχωρήσει σημαντικά. Επίσης η αύξηση του αριθμού των κυτταρικών τύπων που είναι διαθέσιμοι για διαφοροποίηση είχαν ως αποτέλεσμα τεράστια πρόοδο στον τομέα συνολικά. Ταυτόχρονα με την πρόοδο αυτή έχουν αυξηθεί οι προκλήσεις που αφορούν την γονιδιωματική αστάθεια που εμφανίζουν τα κύτταρα αυτά.

Ωστόσο, είναι σαφές ότι τα εμπόδια αυτά δεν είναι ανυπέρβλητα και ότι η καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των hPSC θα οδηγήσει σε καινοτόμες λύσεις στα ζητήματα που παρουσιάζονται. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές που περιλαμβάνουν hPSC έχουν δείξει ότι τα κύτταρα είναι γενικά ασφαλή (DaCruz, L. Fynes K, etal, 2018), (Mandai, M. Watanabe, A. etal, 2017), (Schweitzer, J.S. Song, B, etal, 2012) και οι μελλοντικές κλινικές δοκιμές θα συνεχίσουν να βασίζονται στις προόδους που έχουν σημειωθεί μέχρι σήμερα. Αυτό εγείρει το ερώτημα του κινδύνου που σχετίζεται με προϊόντα για κυτταρικές θεραπείες που προέρχονται από hPSC. Υπάρχει ήδη σημαντική γενετική ποικιλομορφία στον πληθυσμό, με παραλλαγές στον αριθμό hPSC αντιγράφων που έχουν αναφερθεί σε πολλούς διαφορετικούς τύπους ιστών (Abyzon, A. etal, 2012),(Duncan, A.W etal, 2010),(Duncan, A.W etal, 2012),(Knouse, K.A etal, 2014), (Noto, F.K etal, 2014) και έχει αναφερθεί ότι τα άτομα μπορούν να φέρουν σημαντικό αριθμό μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, χωρίς αυτά να γίνονται παθογόνα (Martincorena, I. etal, 2015),(Yokoyama, A. etal, 2019). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι πολλοί καρκίνοι προέρχονται από συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Amplification of the 20q chromosomal arm Blain, C. Tracing the cellular origin of cancer. Nat. Cell Biol. 2013). Μια μετάλλαξη ή CNV σε ένα γονίδιο που προκαλεί καρκίνο μπορεί να μην οδηγήσει τελικά σε σχηματισμό όγκου, εάν εκδηλωθεί σε έναν κυτταρικό τύπο που δεν σχετίζεται με τον συγκεκριμένο καρκίνο. Η τελική διαφοροποίηση των προϊόντων που προέρχονται από hPSC μειώνει τον συνολικό κίνδυνο, καθώς οι κακοήθεις μετασχηματισμοί τείνουν να συνδέονται με τύπους προγονικών κυττάρων. Μια πιθανή στρατηγική ελέγχου θα ήταν να διενεργείται έλεγχος για παράγοντες που σχετίζονται με τον καρκίνο μόνο στους κυτταρικούς τύπους από τους οποίους μπορούν να παραχθούν και όχι σε κάθε σχετιζόμενη με τον καρκίνο μετάλλαξη σε κάθε κυτταρικό τύπο.

Σε κάθε περίπτωση, ενώ η πιθανότητα ενός καρκινικού γεγονότος μπορεί τελικά να είναι αναπόφευκτη, αναπτύσσονται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπιση του προβλήματος. Για παράδειγμα, σε μια μελλοντική κλινική δοκιμή έχει προταθεί η χρήση hPSC ασύμβατων με HLA, σε συνδυασμό με ανοσοκαταστολή, ώστε με αυτόν τον τρόπο, σε περίπτωση δυσμενούς έκβασης να μπορεί να δράσει το ανοσοποιητικό σύστημα (Yamanaka, S., 2020). Επιπλέον, σε εξέλιξη βρίσκονται βελτιώσεις που αφορούν την επαγόμενη αυτοκτονία γονιδίων (Kojima, K. Etal, 2019), όπως και στρατηγικές ενθυσάλωσης των κυττάρων, όπως στο παράδειγμα των παγκρεατικών νησιδίων. Ενώ οι αρχικές προσπάθειες για τον εντοπισμό δεικτών που χαρακτηρίζουν μετασχηματισμένα hPSC δεν αποδείχθηκαν επιτυχείς (Herszfeld,

D. Etal, 2006), (Mateizel, I. etal, 2009), αυτό παραμένει ένα ανοιχτό ζήτημα, το οποίο οι σύγχρονες τεχνολογίες θα μπορούσαν να διερευνήσουν περαιτέρω. Είναι σαφές, λοιπόν, ότι, ενώ μπορεί να μην είναι δυνατόν να ελεγχθεί κάθε κύτταρο πριν από τη μεταμόσχευση, ο συνδυασμός στοχευμένου ελέγχου με στρατηγικές επαγόμενου κυτταρικού θανάτου είναι πιθανότατα η βέλτιστη επιλογή.

Εκτός από το ενδεχόμενο σχηματισμού όγκων, όλο και περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν το γεγονός ότι τα hPSC με χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν άμεσο αντίκτυπο στη διαφοροποίηση, γεγονός που μπορεί να έχει άμεσο αντίκτυπο στα ερευνητικά αποτελέσματα. Ενδεχομένως, ασυνέπειες μεταξύ δημοσιευμένων εργασιών ή ευρήματα που δεν μπόρεσαν να αναπαραχθούν να οφείλονται στην έλλειψη ελέγχου ως προς μωσαϊκισμό κυτταρικών καλλιιεργειών hPSC με επαναλαμβανόμενες CNV. Ακόμη και σε κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν με τεχνικές ζώνης, ενδέχεται να μην έχουν εντοπιστεί τα μικρά τμηματικά κέρδη. Ωστόσο, αυτό δεν μπορεί να ελεγχθεί εύκολα και σε κάθε περίπτωση, οι τυπικές τεχνικές ζωνοποίησης εξακολουθούν να ανιχνεύουν την πλειονότητα των CNVs που παρατηρούνται στα hPSC (Baker, D., 2016). Καθώς το κόστος και η ευκολία του ελέγχου συνεχίζουν να βελτιώνονται, θα πρέπει να γίνεται έλεγχος ρουτίνας για επαναλαμβανόμενες CNV, ώστε να λυθεί αυτό το ζήτημα.

Καθώς η κατανόησή μας για τη γονιδιωματική αστάθεια βελτιώνεται, θα μπορούσαν να βρεθούν μέθοδοι για να μειώσουν τη συχνότητά της. Για παράδειγμα, η προσθήκη νουκλεοσιδίων σε ένα θρεπτικό μέσο καλλιέργειας έχει αποδειχθεί ότι μετριάζει εν μέρει το στρες της αντιγραφής (Halliwell, J.A etal, 2020). Επίσης, ο στοχευμένος θάνατος των χρωμοσωμικά ανώμαλων κυττάρων που προκαλείται από μικρά μόρια έχει καταδειχθεί (Halliwell, J.A etal, 2014),(Cho, S. Etal, 2018). Εάν αξιοποιηθούν, τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας με τον καθαρισμό των κυτταρικών καλλιιεργειών και τη μείωση της εμφάνισης de novo CNV.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η παρούσα διπλωματική εργασία συγκέντρωσε στοιχεία σχετικά με τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων και παρείχε μια εκτενή περιγραφή των υποκατηγοριών τους. Όσον αφορά τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, προέρχονται κυρίως από τον μυελό των οστών, βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, αλλά παρόλα αυτά αποτελούν μία άκρως σημαντική ομάδα κυττάρων, καθώς δίνουν γένεση σε κύτταρα που απαραίτητως ανανεώνονται στον ανθρώπινο οργανισμό (π.χ. νευρικά, επιθηλιακά, αιμοποιητικά, κ.α.).

Η βιβλιογραφική έρευνα σχετικά με τη βιολογία των βλαστικών κυττάρων οδήγησε, επίσης, στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την ανάπτυξή τους (π.χ. Notch, Sonic hedgehog, Wnt), στα γονίδια που σχετίζονται με την έκφραση της πολυδυναμίας τους (Oct 4 και Nanog), καθώς και στους παράγοντες που επάγουν την αυτοανανέωσή τους (LIF, Wnt, BMP-4). Παράλληλα, επισημάνθηκε η σημαντικότητα της ισορροπίας μεταξύ συμμετρικής και ασύμμετρης διαίρεσης και η πλαστικότητα που εμφανίζουν τα βλαστικά κύτταρα. Τέλος, οι φωλεές φαίνεται να διαδραματίζουν δραστικό ρόλο στην διατήρηση και στρατολόγηση των βλαστικών κυττάρων, στον έλεγχο της ισορροπίας μεταξύ αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης, στην αποτροπή της ογκογένεσης και της ασύμμετρης διαίρεσης και στη ρύθμιση της συμμετοχής τους σε διαδικασίες ιστικής επιδιόρθωσης και αναγέννησης.

Η προσέγγιση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ως μία προέκταση του θέματος οδήγησε στον χαρακτηρισμό των ιστών με υψηλούς ρυθμούς αυτοανανέωσης (π.χ. πνεύμονας, έντερο, αίμα, κ.α.) ως πιθανότερους ιστούς για εμφάνιση κακοηθούς όγκου. Προέκυψε, επίσης, και το συμπέρασμα πως παρά την προέλευση των καρκινικών κυττάρων (από φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα ή από διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα με ιδιότητες βλαστικών), η βασική αιτία δημιουργίας τους είναι οι μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των φυσιολογικών κυττάρων που επάγουν την διαφορετική απόκρισή τους σε ερεθίσματα ή σήματα από το περιβάλλον τους.

Έχοντας διερευνήσει και τα καρκινικά κύτταρα, κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση μίας σύγκρισης μεταξύ των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων και των καρκινικών. Τα βασικά συμπεράσματα στα οποία κατέληξε η σύγκριση βάσει της διαθέσιμης βιβλιογραφίας είναι η

διαφορετικού είδους επίδραση των παραγόντων Hedgehog, Wnt και Notch στα δύο διαφορετικά είδη βλαστικών κυττάρων (επαγωγή αυτό-ανανέωσης στα φυσιολογικά και επαγωγή πολλαπλασιασμού στα καρκινικά), η τάση των προϊόντων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (p53, p16INK4a και p19ARF) να αναστέλλουν την αυτό-ανανέωση των φυσιολογικών και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και η συμβολή του παράγοντα PTEN, που φαίνεται συμβάλλει στην μετατροπή των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων σε καρκινικά.

Όσον αφορά την γονιδιακή αστάθεια των βλαστικών κυττάρων, παρά τις προσπάθειές τους να μειώσουν ή να εκμηδενίσουν τις συνέπειες των βλαβών στο DNA τους μέσω επιστράτευσης πληθώρας μηχανισμών επιδιόρθωσης, οι εξωγενείς παράγοντες (χημικά, ακτινοβολία) απειλούν τη σταθερότητα του DNA, προκαλώντας καταστροφές στις αλυσίδες του και στην σύνθεσή του. Αποτελεί εμπειριστατωμένο γεγονός πως η γονιδιακή αστάθεια οδηγεί σε εμφάνιση όγκου.

Παρόλα αυτά, τα είδη βλαστικών κυττάρων διαφέρουν ως προς την επιρρέπειά τους στην γονιδιακή αστάθεια. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ισχυρή προδιάθεση, καθώς έχουν σύντομο κυτταρικό κύκλο και οι βλάβες στην φάση G1 δεν προλαβαίνουν να επιδιορθωθούν με συνέπεια να περνάνε στην φάση S και να καθιερώνονται στα θυγατρικά κύτταρα. Αντίστοιχα, τα iPSCs διαθέτουν 10 φορές μεγαλύτερο ρυθμό μετάλλαξης, ενώ τα ASCs έχουν μικρότερη γονιδιακή αστάθεια λόγω του αργού κυτταρικού τους κύκλου.

Ολοκληρώνοντας, τα πολυδύναμα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα θεωρούνται γονιδιακά ασταθή, δυσκολεύοντας την καλλιέργεια κυτταρικών σειρών. Στην Αναγεννητική Ιατρική και στις μεταμοσχεύσεις πραγματοποιείται πρόοδος, με τις δοκιμές να βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο αναφορικά με την πρώτη, αλλά ο κίνδυνος παρενεργειών και ανάπτυξης όγκου ελλοχεύει.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahuja, A.K., Jodkowska, K., Teloni, F., Bizard, A.H., Zellweger, R., Herrador, R., Ortega, S., Hickson, I.D., Altmeyer, M., Mendez, J., Lopes, M., 2016. A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun* 7, 10660. <https://doi.org/10.1038/ncomms10660>
- Abyzov, A., Mariani, J., Palejev, D., Zhang, Y., Haney, M.S., Tomasini, L., Ferrandino, A.F., Rosenberg Belmaker, L.A., Szekely, A., Wilson, M., et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012, 492,438–442.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A.L., Williams, G.T., Hodges, A.K., Davies, D.R., David, S.S., Sampson, J.R., Cheadle, J.P., 2002. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30, 227–232. <https://doi.org/10.1038/ng828>
- Alvarez, S., Díaz, M., Flach, J., Rodriguez-Acebes, S., López-Contreras, A.J., Martínez, D., Cañamero, M., Fernández-Capetillo, O., Isern, J., Passegué, E., Méndez, J., 2015. Replication stress caused by low MCM expression limits fetal erythropoiesis and hematopoietic stem cell functionality. *Nat Commun* 6, 8548. <https://doi.org/10.1038/ncomms9548>
- Amplification of the 20q chromosomal arm Blanpain, C. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat. Cell Biol.* 2013, 15, 126–134.
- Ashley, A.K., Shrivastav, M., Nie, J., Amerin, C., Troksa, K., Glanzer, J.G., Liu, S., Opiyo, S.O., Dimitrova, D.D., Le, P., Sishc, B., Bailey, S.M., Oakley, G.G., Nickoloff, J.A., 2014. DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic catastrophe. *DNA Repair* 21, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.04.008>
- Avery, S., Hirst, A.J., Baker, D., Lim, C.Y., Alagaratnam, S., Skotheim, R.I., Lothe, R.A., Pera, M.F., Colman, A., Robson, P., Andrews, P.W., Knowles, B.B., 2013. BCL-XL Mediates the Strong Selective Advantage of a 20q11.21 Amplification Commonly Found in Human Embryonic Stem Cell Cultures. *Stem Cell Reports* 1, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.005>
- Bai, Q., Ramirez, J.-M., Becker, F., Pantesco, V., Lavabre-Bertrand, T., Hovatta, O., Lemaître, J.-M., Pellestor, F., De Vos, J., 2015. Temporal Analysis of Genome Alterations Induced by Single-Cell Passaging in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development* 24, 653–662. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0292>
- Baker, D.E.C., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., Andrews, P.W., 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25, 207–215. <https://doi.org/10.1038/nbt1285>
- Baker, D., Hirst, A.J., Gokhale, P.J., Juarez, M.A., Williams, S., Wheeler, M., Bean, K., Allison, T.F., Moore, H.D., Andrews, P.W., et al. Detecting Genetic Mosaicism in Cultures of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 2016, 7, 998–1012.

- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Bañuelos, C.A., Banáth, J.P., MacPhail, S.H., Zhao, J., Eaves, C.A., O'Connor, M.D., Lansdorp, P.M., Olive, P.L., 2008. Mouse but not human embryonic stem cells are deficient in rejoining of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 7, 1471–1483. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.05.005>
- Ben-David, U., Arad, G., Weissbein, U., Mandefro, B., Maimon, A., Golan-Lev, T., Narwani, K., Clark, A.T., Andrews, P.W., Benvenisty, N., et al. Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2014, 5, 4825.
- Björklund, A., Lindvall, O., 2000. Self-repair in the brain. *Nature* 405, 893–895. <https://doi.org/10.1038/35016175>
- Björklund, L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y.C., McNaught, K.S.P., Brownell, A.-L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.-S., Isacson, O., 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *PNAS* 99, 2344–2349. <https://doi.org/10.1073/pnas.022438099>
- Blanpain, C., Fuchs, E., 2006. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 339–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357>
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M.V., Keshet, G.I., Blau, H.M., 2000. From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. *Science* 290, 1775–1779. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1775>
- Calandra, G., Bridger, G., Fricker, S., 2010. CXCR4 in Clinical Hematology, in: Bruserud, O. (Ed.), *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 173–191. https://doi.org/10.1007/82_2010_26
- Caussinus, E., Hirth, F., 2007. Asymmetric Stem Cell Division in Development and Cancer, in: Macieira-Coelho, A. (Ed.), *Asymmetric Cell Division, Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 205–225. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69161-7_9
- Chiba, S., 2009. Concise Review: Notch Signaling in Stem Cell Systems - Chiba - 2006 - STEM CELLS - Wiley Online Library. *STEM CELLS* 24, 2437–2447.
- Cho, S., Kim, K., Jeong, H., Park, J., Kwon, O., Song, Y., Shin, J., Kang, S., Kim, W., Shin, H.D., et al. Selective Elimination of Culture-Adapted Human Embryonic Stem Cells with BH3 Mimetics. *Stem Cell Rep.* 2018, 11, 1244–1256.
- Cimprich, K.A., Cortez, D., 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 616–627. <https://doi.org/10.1038/nrm2450>
- Da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y.H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J.T., Nommiste, B., Hasan, S.M., et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat. Biotechnol.* 2018, 36, 1–10.
- Delgado-Díaz, M.R., Martín, Y., Berg, A., Freire, R., Smits, V.A.J., 2014. Dub3 controls DNA damage signalling by direct deubiquitination of H2AX. *Molecular Oncology* 8, 884–893. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.003>

- Didier, N., Hourdé, C., Amthor, H., Marazzi, G., Sassoon, 2012. Loss of a single allele for Ku80 leads to progenitor dysfunction and accelerated aging in skeletal muscle. *EMBO Molecular Medicine* 4, 910–923. <https://doi.org/10.1002/emmm.201101075>
- Dominguez-Brauer, C., Brauer, P.M., Chen, Y.-J., Pimkina, J., Raychaudhuri, P., 2010. Tumor suppression by ARF: Gatekeeper and caretaker. *Cell Cycle* 9, 86–89. <https://doi.org/10.4161/cc.9.1.10350>
- Duncan, A.W. Taylor, M.H. Hickey, R.D. Hanlon Newell, A.E. Lenzi, M.L., Olson, S.B., Finegold, M.J., Grompe, M. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 2010, 467, 707–710.
- Duncan, A.W., Hanlon Newell, A.E., Smith, L., Wilson, E.M., Olson, S.B., Thayer, M.J., Strom, S.C., Grompe, M., Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology* 2012, 142, 25–28.
- Erba, P., Terenghi, G., J. Kingham, P., 2010. Neural Differentiation and Therapeutic Potential of Adipose Tissue Derived Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy* 5, 153–160. <https://doi.org/10.2174/157488810791268645>
- Fong, C.-Y., Bongso, A., 1999. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. *Human Reproduction* 14, 774–781. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.3.774>
- Furno, E.L., Laan, S. van der, Maiorano, D., 2016. Genomic Instability of Pluripotent Stem Cells: Origin and Consequences, *Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62906>
- Garber, K., 2006. Energy Deregulation: Licensing Tumors to Grow. *Science* 312, 1158–1159. <https://doi.org/10.1126/science.312.5777.1158>
- Giordano, A., Fucito, A., Romano, G., Marino, I.R., 2007. Carcinogenesis and environment: the cancer stem cell hypothesis and implications for the development of novel therapeutics and diagnostics. *Frontiers in Bioscience* 12, 3475–3482.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., Lee, J.-H., Loh, Y.-H., Manos, P.D., Montserrat, N., Panopoulos, A.D., Ruiz, S., Wilbert, M.L., Yu, J., Kirkness, E.F., Belmonte, J.C.I., Rossi, D.J., Thomson, J.A., Eggan, K., Daley, G.Q., Goldstein, L.S.B., Zhang, K., 2011. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63–67. <https://doi.org/10.1038/nature09805>
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Dougherty, J.D., Belle, J.L., Zack, J.A., Geschwind, D.H., Liu, X., Kornblum, H.I., Wu, H., 2006. PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *PNAS* 103, 111–116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509939103>
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., Bartek, J., 2008. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319, 1352–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>
- Halliwell, J.A., Frith, T.J.R., Laing, O., Price, C.J., Bower, O.J., Stavish, D., Gokhale, P.J., Hewitt, Z., El-Khamisy, S.F., Barbaric, I., et al. Nucleosides Rescue Replication-Mediated Genome Instability of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 2020, 14, 1009–1017.
- Handgretinger, R., 2006. 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* 91, 292B.

- Herszfeld, D., Wolvetang, E., Langton-Bunker, E., Chung, T.-L., Filipczyk, A., Houssami, S., Jamshidi, P., Koh, K., Laslett, A.L., Michalska, A., et al. CD30 is a survival factor and a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 351–357.
- Holst, A. von, 2008. Tenascin C in Stem Cell Niches: Redundant, Permissive or Instructive? *CTO* 188, 170–177. <https://doi.org/10.1159/000112848>
- Insausti, C.L., BlanquerBlanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Majado Martínez, M.J., Castellanos, G., Moraleda Jiménez, J.M., 2010. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histology and histopathology*.
- Jiang, H., Nie, D., 2010. Cancer stem cell and niche. *Frontiers in Bioscience S2* 184–193.
- Jones, J.C., Sabatini, K., Liao, X., Tran, H.T., Lynch, C.L., Morey, R.E., Glenn-Pratola, V., Boscolo, F.S., Yang, Q., Parast, M.M., Liu, Y., Peterson, S.E., Laurent, L.C., Loring, J.F., Wang, Y.-C., 2013. Melanocytes Derived from Transgene-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J Invest Dermatol* 133, 2104–2108. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.139>
- Jones, R.M., Mortusewicz, O., Afzal, I., Lorvellec, M., García, P., Helleday, T., Petermann, E., 2013. Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 32, 3744–3753. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.387>
- Jordan, C.T., Guzman, M.L., Noble, M., 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355, 1253–1261. <https://doi.org/10.1056/NEJMra061808>
- Keller, G.M., 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 862–869. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80071-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80071-9)
- Kinoshita, T., Nagamatsu, G., Kosaka, T., Takubo, K., Hotta, A., Ellis, J., Suda, T., 2011. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.013>
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1997. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761–763. <https://doi.org/10.1038/386761a0>
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B.T., Jacobsen, S.E.W., Nerlov, C., 2006. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol* 7, 1048–1056. <https://doi.org/10.1038/ni1381>
- Knoblich, J.A., 2010. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 849–860. <https://doi.org/10.1038/nrm3010>
- Knouse, K.A., Wu, J., Whittaker, C.A., Amon, A. Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 13409–13414.
- Kojima, K., Miyoshi, H., Nagoshi, N., Kohyama, J., Itakura, G., Kawabata, S., Ozaki, M., Iida, T., Sugai, K., Ito, S., et al. Selective Ablation of Tumorigenic Cells Following Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl. Med.* 2019, 8, 260–270.
- Koster, M.I., 2009. Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 7–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04363.x>
- Lambert, S., Carr, A.M., 2013. Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* 122, 33–45. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0398-9>

- Lamm, N., Ben-David, U., Golan-Lev, T., Storchová, Z., Benvenisty, N., Kerem, B., 2016. Genomic Instability in Human Pluripotent Stem Cells Arises from Replicative Stress and Chromosome Condensation Defects. *Cell Stem Cell* 18, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.003>
- Leahy, A., Xiong, J.-W., Kuhnert, F., Stuhlmann, H., 1999. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *Journal of Experimental Zoology* 284, 67–81. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990615\)284:1<67::AID-JEZ10>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990615)284:1<67::AID-JEZ10>3.0.CO;2-O)
- Lee, A.S., Tang, C., Rao, M.S., Weissman, I.L., Wu, J.C., 2013. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med* 19, 998–1004. <https://doi.org/10.1038/nm.3267>
- Lee, J., Dunphy, W.G., 2013. The Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex has a specific role in the activation of Chk1 in response to stalled replication forks. *MBoC* 24, 1343–1353. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-01-0025>
- Lee, M.W., Jang, I.K., Yoo, K.H., Sung, K.W., Koo, H.H., 2010. Stem and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Int J Hematol* 92, 45–51. <https://doi.org/10.1007/s12185-010-0619-4>
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., Perrier, A.L., 2008. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364–1366. <https://doi.org/10.1038/nbt.1509>
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., Downes, M., Yu, R., Stewart, R., Ren, B., Thomson, J.A., Evans, R.M., Ecker, J.R., 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73. <https://doi.org/10.1038/nature09798>
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., Wagers, A., 2010. Chapter Twelve - Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation, in: Kopan, R. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology, Notch Signaling*. Academic Press, pp. 367–409. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92012-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92012-7)
- Liu, L., Rando, T.A., 2011. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *Journal of Cell Biology* 193, 257–266. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010131>
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Sølvhøj Pedersen, R., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., Lukas, J., 2011. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 13, 243–253. <https://doi.org/10.1038/ncb2201>
- Lukas, J., Lukas, C., Bartek, J., 2011. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 13, 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/ncb2344>
- Maitra, A., Arking, D.E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D.J., Liu, Y., Brimble, S.N., Noaksson, K., Hyllner, J., Schulz, T.C., Zeng, X., Freed, W.J., Crook, J., Abraham, S., Colman, A., Sartipy, P., Matsui, S.-I., Carpenter, M., Gazdar, A.F., Rao, M., Chakravarti, A., 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/ng1631>
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., Ogawa, S., 1999. Cardiomyocytes can be

- generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103, 697–705.
<https://doi.org/10.1172/JCI5298>
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiram, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2017, 376, 1038–1046.
- Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., Wedge, D.C., Fullam, A., Alexandrov, L.B., Tubio, J.M., et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* (80-.) 2015, 348, 880–886.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., Elledge, S.J., 2007. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* 316, 1160–1166. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>
- Mitalipov, S., Wolf, D., 2009. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming | SpringerLink, in: *Engineering of Stem Cells. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg., pp. 185–199.
- Momcilovic, O., Knobloch, L., Fornasaglio, J., Varum, S., Easley, C., Schatten, G., 2010. DNA Damage Responses in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 5, e13410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013410>
- Morrison, S.J., Kimble, J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068–1074.
<https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Neelsen, K.J., Zanini, I.M.Y., Mijic, S., Herrador, R., Zellweger, R., Chaudhuri, A.R., Creavin, K.D., Blow, J.J., Lopes, M., 2013. Deregulated origin licensing leads to chromosomal breaks by rereplication of a gapped DNA template. *Genes Dev.* 27, 2537–2542.
<https://doi.org/10.1101/gad.226373.113>
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., Silberstein, L.E., 2013. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 15, 533–543. <https://doi.org/10.1038/ncb2730>
- Noto, F.K., Determan, M.R., Cai, J., Cayo, M.A., Mallanna, S.K., Duncan, S.A. Aneuploidy is permissive for hepatocyte-like cell differentiation from human induced pluripotent stem cells. *BMC Res. Notes* 2014, 7, 437.
- Nowell, P.C., 1976. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science* 194, 23–28.
<https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., Berge, D. ten, Kalani, Y., 2008. Wnt Signaling and Stem Cell Control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 59–66. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.035>
- Nystul, T.G., Spradling, A.C., 2006. Breaking out of the mold: diversity within adult stem cells and their niches. *Current Opinion in Genetics & Development, Differentiation and gene regulation* 16, 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.08.003>
- Okamoto, R., Watanabe, M., 2004. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 39, 1–6.
<https://doi.org/10.1007/s00535-003-1259-8>
- Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., Grompe, M., 1997. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 151, 1273–1280.

- Peng, J., Wang, Y., Zhang, L., Zhao, B., Zhao, Z., Chen, J., Guo, Q., Liu, S., Sui, X., Xu, W., Lu, S., 2011. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Res Bull* 84, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.12.013>
- Pera, M.F., 2011. The dark side of induced pluripotency. *Nature* 471, 46–47. <https://doi.org/10.1038/471046a>
- Perryman, S.V., Sylvester, K.G., 2006. Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10, 292–308. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00400.x>
- Pitulescu, M.E., Adams, R.H., 2010. Eph/ephrin molecules—a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev.* 24, 2480–2492. <https://doi.org/10.1101/gad.1973910>
- Podos, S.D., Ferguson, E.L., 1999. Morphogen gradients: new insights from DPP. *Trends in Genetics* 15, 396–402. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01854-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01854-5)
- Rizo, A., Vellenga, E., de Haan, G., Schuringa, J.J., 2006. Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Human Molecular Genetics* 15, R210–R219. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl175>
- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., Weissman, I.L., 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725–729. <https://doi.org/10.1038/nature05862>
- Ruiz, S., Panopoulos, A.D., Herrerías, A., Bissig, K.-D., Lutz, M., Berggren, W.T., Verma, I.M., Izpisua Belmonte, J.C., 2011. A High Proliferation Rate Is Required for Cell Reprogramming and Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Identity. *Current Biology* 21, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.049>
- Ruzankina, Y., Schoppy, D.W., Asare, A., Clark, C.E., Vonderheide, R.H., Brown, E.J., 2009. Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Trp53. *Nat Genet* 41, 1144–1149. <https://doi.org/10.1038/ng.441>
- Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075–1079. <https://doi.org/10.1038/nature04957>
- Seuntjens, E., Umans, L., Zwijsen, A., Sampaolesi, M., Verfaillie, C.M., Huylebroeck, D., 2009. Transforming Growth Factor type β and Smad family signaling in stem cell function. *Cytokine & Growth Factor Reviews, Bone Morphogenetic Proteins, Stem Cells and Regenerative Medicine* 20, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.005>
- Shaker, A., Rubin, D.C., 2010. Intestinal stem cells and epithelial–mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. *Translational Research, Stem Cells: Medical Promises and Challenges* 156, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2010.06.003>
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.-D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., Rossant, J., 1997. A Requirement for Flk1 in Primitive and Definitive Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Cell* 89, 981–990. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80283-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80283-4)
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Littlefield, J.W., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Cui, Y., Cheng, L., Gearhart, J.D., 2001. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *PNAS* 98, 113–118. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.113>
- Starz-Gaiano, M., Melani, M., Meinhardt, H., Montell, D., 2009. Interpretation of the UPD/JAK/STAT morphogen gradient in *Drosophila* follicle cells. *Cell Cycle* 8, 2918–2926. <https://doi.org/10.4161/cc.8.18.9547>

- Sumer, H., Liu, J., Verma, P.J., 2010. The use of signalling pathway inhibitors and chromatin modifiers for enhancing pluripotency. *Theriogenology* 74, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.030>
- Schweitzer, J.S., Song, B., Herrington, T.M., Park, T.-Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., et al. Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2020**, 382, 1926–1932.
- Theise, N.D., 2010. Stem cell plasticity: Recapping the decade, mapping the future. *Experimental Hematology*, SPECIAL ISSUE 38, 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.04.013>
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tomasetti, C., Levy, D., 2010. Role of symmetric and asymmetric division of stem cells in developing drug resistance. *PNAS* 107, 16766–16771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007726107>
- Van, C., Yan, S., Michael, W.M., Waga, S., Cimprich, K.A., 2010. Continued primer synthesis at stalled replication forks contributes to checkpoint activation. *Journal of Cell Biology* 189, 233–246. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909105>
- Verfaillie, C.M., 2002. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology* 12, 502–508. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02386-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02386-3)
- Vidal-Eychenié, S., Décaillot, C., Basbous, J., Constantinou, A., 2013. DNA structure-specific priming of ATR activation by DNA-PKcs. *Journal of Cell Biology* 202, 421–429. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304139>
- Wacharaprechanont, T., 2005. Fetal stem cell: from research to clinical use. *J Med Assoc Thai* 88 Suppl 2, S133-137.
- Weissbein, U., Benvenisty, N., Ben-David, U., 2014. Genome maintenance in pluripotent stem cells. *Journal of Cell Biology* 204, 153–163. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310135>
- Whetton, A.D., 2004. Stem cells bank on ATM machine. *Nat Med* 10, 1166–1168. <https://doi.org/10.1038/nm1104-1166>
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Wood, R.D., 1996. Dna Repair in Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 65, 135–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001031>
- Yamanaka, S., 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Proliferation* 41, 51–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2008.00493.x>
- Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 2020, 27, 523–531.
- Yokoyama, A., Kakiuchi, N., Yoshizato, T., Nannya, Y., Suzuki, H., Takeuchi, Y., Shiozawa, Y., Sato, Y., Aoki, K., Kim, S.K., et al. Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature* 2019, 565, 312–317.
- Yoshida, Y., Yamanaka, S., 2010. Recent Stem Cell Advances: Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Stem Cell-Based Regeneration. *Circulation* 122, 80–87. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.881433>
- Yu, J., Thomson, J.A., 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes & Dev.* 22, 1987–1997.

- Zammaretti, P., Zisch, A.H., 2005. Adult 'endothelial progenitor cells': Renewing vasculature. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 493–503.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.06.018>
- Zeman, M.K., Cimprich, K.A., 2014. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., Li, L., 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.
<https://doi.org/10.1038/nature02041>
- Zhao, B., Zhang, W., Duan, Y., Lu, Y., Cun, Y., Li, C., Guo, K., Nie, W., Li, L., Zhang, R., Zheng, P., 2015. Filia Is an ESC-Specific Regulator of DNA Damage Response and Safeguards Genomic Stability. *Cell Stem Cell* 16, 684–698.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.03.017>
- Zhong, X.Y., Zhang, B., Asadollahi, R., Low, S.H., Holzgreve, W., 2010. Umbilical cord blood stem cells: what to expect. *Ann N Y Acad Sci* 1205, 17–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05659.x>
- Αμανετοπούλου, Σ., 2007. Βλαστικά κύτταρα και ο ρόλος τους στη βιολογία και παθολογία του πνεύμονα (Thesis).