

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής Καθηγητής: Αθανάσιος Γ. Τζιούφας



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα:
ο ρόλος του HIF-1α/REDD1 μοριακού μονοπατιού**

ΙΩΑΝΝΑ ΣΤΕΡΓΙΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ, ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΙΧΑΗΛ ΒΟΥΛΓΑΡΕΛΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

Διδακτορική διατριβή της Ιωάννας Στεργίου στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα:

«Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα: ο ρόλος του HIF-1α/REDD1 μοριακού μονοπατιού»

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 27/09/2017

Ημερομηνία κατάθεσης πρωτοκόλλου της διδακτορικής διατριβής: 04/12/2019

Ημερομηνία κατάθεσης 1ης έκθεσης προόδου: 20/12/2019

Ημερομηνία κατάθεσης 2ης έκθεσης προόδου: 23/12/2020

Ημερομηνία κατάθεσης 3ης έκθεσης προόδου: 07/04/2021

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Καθηγητής κ. Μιχαήλ Βουλγαρέλης (Επιβλέπων)
2. Καθηγητής κ. Αθανάσιος Τζιούφας
3. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σταυρούλα Γιαννούλη

Μέλη Επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

1. Καθηγητής κ. Μιχαήλ Βουλγαρέλης
2. Καθηγητής κ. Αθανάσιος Τζιούφας
3. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σταυρούλα Γιαννούλη
4. Καθηγητής κ. Παναγιώτης Βλαχογιαννόπουλος
5. Καθηγητής κ. Μενέλαος Μανουσάκης
6. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευσταθία Καψογεώργου
7. Επίκουρος Καθηγητής κ. Ανδρέας Γουλές

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ Ξυγγραφὴν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῶσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ Ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροσήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδίκῃ εἶρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι Ξυμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδίκης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπιῆς κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῶντα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ Ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τὰναντία τουτέων.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

(απόδοση στη Νεοελληνική)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς και τις Θεές επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές Πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο Στεργίου Ιωάννα
Ημερομηνία Γέννησης 4 Μαρτίου 1988

Σπουδές

11/10/2019 Λήψη άδειας χρήσης τίτλου ειδικότητας ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
Σεπτέμβριος 2017 έως σήμερα Υποψήφια Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Κλινική
Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας
Διατριβή: «Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα: Ο
ρόλος του HIF1α/REDD1 μοριακού μονοπατιού»
Φεβρουάριος 2014 Μεταπτυχιακό «Θρόμβωση, Αιμορραγία, Ιατρική των
Ιούνιος 2017 Μεταγίσεων», Ιατρική σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών
Βαθμός: Άριστα «9,70»
Διπλωματική Εργασία: «Μελέτη των πολυμορφισμών του
ενεργοποιούμενου από τη θρομβίνη αναστολέα της ινωδόλυσης
(TAFI) σε θρομβώσεις οφθαλμικών αγγείων»
Σεπτέμβριος 2005 Ιατρική Σχολή
Ιούλιος 2011 Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Βαθμός Πτυχίου: Άριστα « 8,74 »

Επαγγελματική Εμπειρία

14/12/2020 έως σήμερα Επικουρική Επιμελήτρια Αιματολόγος ΕΣΥ, Κλινική
Παθολογικής Φυσιολογίας, ΓΝΑ Λαϊκό
23/1/2020 έως 11/12/2020 Ακαδημαϊκός Υπότροφος Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Κλινική
και Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας
16/6/2019 έως 22/12/2020 Παραμονή μετά τη λήψη τίτλου Ειδικότητας Αιματολογίας
ως βοηθός ΕΣΥ σε παράταση στο Αιματολογικό Τμήμα της
Κλινικής Παθολογικής Φυσιολογίας του ΓΝΑ «Λαϊκό»
16/6/2015 έως 16/6/2019 Ειδικότητα Αιματολογίας - Αιματολογικό Τμήμα Κλινικής
Παθολογικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, ΓΝΑ
«Λαϊκό»

Εκπαίδευση στη Μεταμόσχευση Μυελού: Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό»
Εκπαίδευση σε Αιμοδοσία και Αιμόσταση: Κέντρο Αιμοδοσίας- Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Συγγενών Αιμορραγικών Διαταραχών, ΓΝΑ «Λαϊκό»

01/08/2013 έως 2/6/2015 Ειδικότητα Παθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Θηβών

29/8/2012 έως 11/7/2013 Μερική μετακίνηση στο Τμήμα Αιμοδοσίας του Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας, στα πλαίσια της υπηρεσίας υπαίθρου για εξυπηρέτηση των αναγκών της Αιμοδοσίας.

23/5/2012 έως 11/7/2013 Ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Ραχούλας του Κέντρου Υγείας Σοφάδων (Γενικού Νοσοκομείου Καρδίτσας)

Διδακτική Εμπειρία

2020 έως σήμερα «Διαγνωστική προσέγγιση ασθενή με διαταραχές αιμόστασης» στα πλαίσια της τρίμηνης εκπαίδευσης των εκτοετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ στην Παθολογία – Κλινική Παθολογικής Φυσιολογίας

2020 έως σήμερα «Διαγνωστική προσέγγιση ασθενή με θρομβοπενία» στα πλαίσια της τρίμηνης εκπαίδευσης των εκτοετών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ στην Παθολογία – Κλινική Παθολογικής Φυσιολογίας

2020 έως σήμερα «Παθοφυσιολογία αναιμίας» στα πλαίσια του μαθήματος «Παθολογική Φυσιολογία» του 5^{ου} εξαμήνου της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

2020 έως σήμερα «Παθοφυσιολογία αναιμίας» στα πλαίσια του μαθήματος «Παθοφυσιολογία των νόσων» της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

2019 έως σήμερα «Συγγενείς και επίκτητες θρομβοπενίες» στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία»

2018 έως σήμερα «Μοριακές βλάβες και αυτοάνοσες διαταραχές-Το μοντέλο της αυτοάνοσης θρομβοπενικής πορφύρας» στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ «Ιατρική Μοριακή Βιοπαθολογία»

Σεπτέμβριος 2014 έως σήμερα Instructor/Course Director στα Advanced Life Support και Immediate Life Support (ALS, ILS – European Resuscitation Council) – Ελληνική Εταιρεία Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης

- Νοέμβριος 2013 – Instructor στο Advanced Cardiac Life Support (eACLS –American Heart Association) – Ελληνική Εταιρεία Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης
- Μάιος 2014
- Μάρτιος 2012 Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός, Μάθημα Ανατομίας Τάξη 2012 Εθελοντών Νοσηλευτικής του Περιφερειακού Τμήματος ΕΕΣ Καρδίτσας

Παρακολούθηση Σεμιναρίων

- Απρίλιος 2017 έως 2019 Παρακολούθηση Σχολείων Αιματολογίας του Ιδρύματος Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας
- 15/1/2014 Airway Management (American Heart Association)
- 30/10/2013 ECG and Pharmacology (American Heart Association)
- 29-30/6/2013 Advanced Cardiac Life Support (eACLS) Instructors Development Course Advanced
- 1-3/3/2013 Cardiac Life Support (eACLS) Provider Course
- 8-9/2/2013 3^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο στη Θρόμβωση και την Αντιθρομβωτική Αγωγή
- 3/11/2012 BLS/AED Provider Course
- 18-22/12/2006 Άσκηση “Εφαρμοσμένη Φυσιολογία – Γενική Ιατρική” στο Κεντρο Υγείας Βύρωνα

Δημοσιεύσεις

Exploiting the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 and Pseudohypoxia in the Myelodysplastic Syndrome Pathophysiology.

Stergiou IE, Kambas K, Poulaki A, Giannouli S, Katsila T, Dimitrakopoulou A, Vidali V, Mouchtouris V, Kloukina I, Xingi E, Pagakis SN, Probert L, Patrinos GP, Ritis K, Tzioufas AG, Voulgarelis M. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 15;22(8):4099. doi: 10.3390/ijms22084099.

Bioenergetic Profiling of the Differentiating Human MDS Myeloid Lineage with Low and High Bone Marrow Blast Counts.

Poulaki A, Katsila T, Stergiou IE, Giannouli S, Gómez-Tamayo JC, Piperaki ET, Kambas K, Dimitrakopoulou A, Patrinos GP, Tzioufas AG, Voulgarelis M. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 26;12(12):3520. doi: 10.3390/cancers12123520

Pathogenetic Mechanisms Implicated in Sjögren's Syndrome Lymphomagenesis: A Review of the Literature.

Stergiou IE, Poulaki A, Voulgarelis M. *J Clin Med*. 2020 Nov 24;9(12):3794. doi: 10.3390/jcm9123794.

The Metabolomic Status of the Differentiating Myeloid Lineage in MDS with Low and High Bone Marrow Blast Counts

Aikaterini Poulaki, Theodora Katsila, Ioanna E Stergiou, Stavroula Giannouli, Jose Carlos Gómez Tamayo, Konstantinos Kambas, George Patrinos, George Vassilopoulos, Michael Voulgarelis
Blood (2020) 136 (Supplement 1): 32–33. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-140468>

T cell lymphoma in the setting of Sjögren's syndrome: T cells gone bad? Report of five cases from a single centre cohort.

Stergiou IE, Papageorgiou A, Chatzis LG, Tzioufas AG, Voulgarelis M, Goules A. Clin Exp Rheumatol. 2020 Jul-Aug;38 Suppl 126(4):125-129.

Extraordinary extrahaematological manifestations of chronic myelomonocytic leukaemia.

Stergiou IE, Christoforou P, Sypsa G, Skoufias S, Mitropoulos D, Tzioufas AG, Voulgarelis M. Lancet. 2020 Sep 19;396(10254):853. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31905-X.

Leishmaniasis with cryoglobulinaemia and Leishmania infantum in peripheral blood neutrophils.

Poulaki A, Stergiou IE, Voulgarelis M. Br J Haematol. 2020 Jun;189(5):801. doi: 10.1111/bjh.16538.

Τα πολλαπλά αιματολογικά προσωπεία της αυτοανοσίας: Νεοπλασία

Μιχαήλ Βουλγαρέλης, Ιωάννα Στεργίου
Αίμα 2019;10(Suppl 1): 148-154

Autophagy in myelodysplastic syndromes: The role of HIF-1α/REDD1 molecular pathway

Ioanna Stergiou, Konstantinos Kambas, Stavroula Giannouli, Theodora Katsila, Aglaia Dimitrakopoulou, Veroniki Vidali, Evgenia Synolaki, Aristeia Papageorgiou, Andrianos Nezos, George Patrinos, Paschalis Sideras, Konstantinos Ritis, George Vassilopoulos, Athanasios Tzioufas and Michael Voulgarelis
Blood 2018 132:1808; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112813>

Αυτοανοσία, ανοσοανεπάρκεια και λεμφωματογένεση. Υπάρχει συνδετικός κρίκος;

Ιωάννα Στεργίου, Μιχαήλ Βουλγαρέλης
Αίμα 2018;9(Suppl 1): 121-123

Αναρτημένες ανακοινώσεις σε συνέδρια

62nd American Society of Hematology Association Annual Meeting 2020

The Metabolomic Status of the Differentiating Myeloid Lineage in MDS with Low and High Bone Marrow Blast Counts

A. Poulaki, T. Katsila, I.E. Stergiou, S. Giannouli, J. C. Gómez Tamayo, K. Kambas, G. Patrinos, G. Vassilopoulos, M. Voulgarelis

ESC Congress 2019

Severity of lymphoma is associated with aortic FDG uptake assessed by FDG PET/CT imaging

E. Solomou, I. Koutagiari, C. Vlachopoulos, A. Georgakopoulos, A. Sioni, S. Giannouli, S. Hontropoulos, I. Stergiou, P. Kafouris, I. Karakitsios, A. Gaitanis, D. Terentes-Printzios, N. Pianou, A. Pouli, D. Tousoulis

23rd Congress of the European Hematology Association 2018

Autophagy in Myelodysplastic Syndromes: The Role of HIF1α/REDD1 molecular pathway.

I. Stergiou, K. Kambas, S. Giannouli, A. Dimitrakopoulou, K. Ritis, A. Tzioufas, M. Voulgarelis

European Society of Clinical Cell Analysis 2018 Conference	Autophagy in Myelodysplastic Syndromes: The Role of HIF1 α /REDD1 molecular pathway. I. Stergiou, A. Dimitrakopoulou, P. Gasouka, K. Kambas, N. Kafassi, S. Giannouli, M. Voulgarelis, A. Tzioufas
5 th Aegean Hematology Oncology Symposium 2018	Autophagy in Myelodysplastic Syndromes: The Role of HIF1 α /REDD1 molecular pathway. I. Stergiou, K. Kambas, S. Giannouli, T.Katsila, A. Dimitrakopoulou, V.i Vidali, E. Synolaki, A. Papageorgiou, A. Nezos, G. Patrinos, P.Sideras, K. Ritis, A.Tzioufas, M. Voulgarelis
5 th Aegean Hematology Oncology Symposium 2018	HLA-G gene and protein expression in patients with primary myelodysplastic syndrome. S. Giannouli, A. Nezos, E. Zintzaras, A.Papageorgiou, K. Kambas, I.Stergiou, M. Voulgarelis
29 ^o Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2018	Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου και της πρωτεΐνης του HLA-G σε ασθενείς με πρωτοπαθή μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. I. Στεργίου, Σ. Γιαννούλη, Α. Νέζος, Η. Ζινζαράς, Α. Παπαγεωργίου, Κ. Καμπάς, Μ. Βουλγαρέλης
60th American Society of Hematology Association Annual Meeting 2018	Autophagy in Myelodysplastic Syndromes: The Role of HIF1 α /REDD1 molecular pathway. I. Stergiou, K. Kambas, S.Giannouli, T.Katsila, A. Dimitrakopoulou, V. Vidali, E. Synolaki, A. Papageorgiou, A. Nezos, G. Patrinos, P.Sideras, K. Ritis, G. Vassilopoulos, A. Tzioufas, M. Voulgarelis
21st Congress of the European Hematology Association 2016	Is limited stage follicular lymphoma (FL) a truly curable disease? A retrospective analysis on 79 patients M. Angelopoulou, P. Tsirkinidis, S.Kokoris, M. Dimopoulou, M. Siakantaris, P.Tsaftaridis, F.Kontopidou, V. Komninaka, M.C Kyrtsionis, E. Plata, M.Dimou, G. Boutsikas, V. Telonis, A. Zannou, G.Gainarou, J. V. Asimakopoulos, P. Flevari, G.s Dryllis, M. Arapaki, T. Giannikos, E. Konstantinou, I.Stergiou, G.Pangalis, C. Kalpadakis, M. Moschogiannis, S.Sachanas, X. Giakoumis, P. Panayiotidis, K. Konstantopoulos, T.Vassilakopoulos
21st Congress of the European Hematology Association 2016	The impact of histologic grading on the outcome of follicular lymphoma: is grade 3 for better or for worse? M.Angelopoulou, P.Tsirkinidis, S.Kokoris, M.Siakantaris, P.Tsaftaridis, F.Kontopidou, M.C. Kyrtsionis, M.Dimopoulou, E. Plata, M. Dimou, G. Boutsikas, V. Telonis, A. Zannou, G. Gainarou, J.V. Asimakopoulos, P. Flevari, G. Dryllis, M. Arapaki, T. Giannikos, E. Konstantinou, I. Stergiou, G. Pangalis, K. Christina, M. Moschogiannis, S. Sachanas, X.Giakoumis, P. Panayiotidis, K. Konstantopoulos, T. Vassilakopoulos
21st Congress of the European Hematology Association 2016	Prognostic relevance of serum ferritin levels in Hodgkin Lymphoma (HL) under treatment with ABVD or equivalent regimens with or without radiotherapy (RT) T. P. Vassilakopoulos, M. N. Dimopoulou, M. Arapaki, M.P. Siakantaris, G. Boutsikas, E. Variami, J.V. Asimakopoulos, M. Dimou, M.C. Kyrtsionis, X. Yiakoumis, M. Moschogiannis, G. Dryllis, T. Giannikos, M. Efstathopoulou, E. Konstantinou, I. Stergiou, T. Tzenou, T. Iliakis, G. Gainarou, V. Telonis, K.A. Petevi, K. Zervakis, E. Pessach, P. Tsirkinidis, N.A. Viniou, V.Komninaka, P. Tsaftaridis, E. Plata, S. Sachanas, G.A. Pangalis, P. Panayiotidis, K.Konstantopoulos, M.K. Angelopoulou

Προφορικές ανακοινώσεις σε συνέδρια

31 ^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2020	Το μεταβολικό προφίλ της διαφοροποιούμενης μυελικής σειράς σε ΜΔΣ με χαμηλό και υψηλό αριθμό βλαστών μυελού των οστών Μ. Βουλγαρέλης, Α. Πουλάκη, Θ. Κατσίλα, Ι.Η. Στεργίου, Σ. Γιαννούλη, J.C. Gómez Tamayo, Κ. Καμπάς, Γ.Π. Πατρινός
7 th Summer School of Immunology 2019	1 ^ο βραβείο καλύτερης ανακοίνωσης Autophagy in Myelodysplastic Syndromes: The Role of HIF1α/REDD1 molecular pathway. I. Stergiou, K. Kambas, S. Giannouli, T. Katsila, A. Dimitrakopoulou, V. Vidali, E. Synolaki, A. Papageorgiou, A. Nezos, G. Patrinos, P. Sideras, K. Ritis, A. Tzioufas, M. Voulgarelis
8 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας 2019	Μη παρεμβατική μελέτη αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας της ισαμβουκοναζόλης στη θεραπεία ασθενών με διηθητική ασπεργίλλωση ή μουκορμύκωση. Α. Αναστασοπούλου, Μ. Αραπάκη, Α. Χατζής, Ε. Αθανασοπούλου, Ι. Στεργίου, Ν. Ζαπανιώτης, Α. Μαργογιαννάκης, Μ. Σαμάρκος, Ν.Β. Σύψας, Μ.Ν. Γκαμαλέτσου
20 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταμοσχεύσεων 2019	Λεμφούπερπλαστικά νοσήματα μετά τη μεταμόσχευση νεφρού: Αναδρομική μελέτη παρατήρησης ενός κέντρου. Μ. Δαρεμά, Σ. Τσιάκας, Μ. Βουλγαρέλης, Ι. Στεργίου, Κ. Βαλλιάνου, Σ. Βερναδάκης, Ι. Μπόκος, Γ. Ζαββός, Ι. Μπολέτης
11 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας 2019	Έπαινος προφορικής ανακοίνωσης Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα: ο ρόλος του HIF1A/REDD1 μοριακού μονοπατιού Ι. Στεργίου, Κ. Καμπάς, Θ. Κατσίλα, Π. Γκασούκα, Α. Δημητρακοπούλου, Στ. Γιαννούλη, Ν. Καφάση, Μ. Βουλγαρέλης
29 ^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2018	Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα: Ο ρόλος του HIF1α/REDD1 μοριακού μονοπατιού. Ι. Στεργίου, Κ. Καμπάς, Σ. Γιαννούλη, Θ. Κατσίλα, Α. Δημητρακοπούλου, Β. Βιδάλη, Ε. Συνολάκη, Α. Παπαγεωργίου, Α. Νέζος, Γ. Πατρινός, Π. Σιδεράς, Κ. Ρίτης, Α. Τζιούφας, Μ. Βουλγαρέλης

Εισηγήσεις σε συνέδρια/ημερίδες

Αιματολογικό Διήμερο Κεντρικής Ελλάδας «Αναδυόμενες θεραπευτικές επιλογές στην Αιματολογία» 5-6/2/2021	Αυτοάνοση εικόνα σε ασθενή μετά από ΗΜΑ θεραπεία για ΜΔΣ
Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας 19-21/11/2020	Στρογγυλό Τραπέζι: Λεμφούπερπλαστικές Νεοπλασίες. Νεότερα Δεδομένα

6η Δημερίδα με θέμα: Αγγεΐτιδες:
Σύγχρονες προκλήσεις 18-19/9/2020

Αιματολογικό Διήμερο Κεντρικής Ελλάδας
«Αναδυόμενες θεραπευτικές επιλογές στην
Αιματολογία» 7-8/2/2020

Επίκαιρα Θέματα Φλεγμονής και
Αυτοανοσίας
20-21/9/2019

Δημερίδα «Κλινικά Προβλήματα στην
Αιματολογία» 19-20/10/2018

Αιματολογικό Διήμερο Κεντρικής Ελλάδας
«Αναδυόμενες θεραπευτικές επιλογές στην
Αιματολογία» 8-9/2/2019

Στόχευση του CD-30: Νεότερα δεδομένα στη
θεραπεία του Λ. Hodgkin
Παρουσίαση περιπτώσεων ασθενών με
αγγεΐτιδες
Ασθενής με χρόνια μυελομονοκυτταρική
λευχαιμία και συστηματικές αυτοάνοσες
εκδηλώσεις
«Κοίτα το Πολυμορφότυπο!»

Λεμφούπερπλασία στο σύνδρομο Sjögren:
Κλινική έκφραση και πρόγνωση

Ασθενής με δερματικές βλάβες και πυρετό.
Λέμφωμα ή ερυθματώδης λύκος;
Διαγνωστικές παγίδες

Εμπύρετος δερματοπάθεια σε ασθενή με
ΜΔΣ

Συμμετοχή σε συγγράμματα

Μουτσόπουλου Αρχές Παθοφυσιολογίας
Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης , Broken Hill
Publishers LTD 2018

Κεφάλαιο 12
Παθήσεις των Λευκών Αιμοσφαιρίων
Ιωάννα Στεργίου, Μιχαήλ Βουλγαρέλης

Γνώσεις Ξένων Γλωσσών

Αγγλική University of Michigan Certificate of Proficiency in English (2001)
University of Cambridge Certificate of Proficiency in English (2001)

Γαλλική Delf 1^{er} Degré (A1, A2, A3, A4 - 2001)
Delf 2nd Degré (A5, A6 - 2001)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στον επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθηγητή κ. Μιχάλη Βουλγαρέλη, ο οποίος με εμπιστεύθηκε αναθέτοντάς μου το θέμα αυτής της μελέτης και υπήρξε πάντα αρωγός και καθοδηγητής της προσπάθειας αυτής. Παρά τις όποιες δυσχερείς συνθήκες ή προβλήματα στάθηκε πάντα δίπλα μου τόσο σαν άνθρωπος όσο και σα δάσκαλος, συμβάλλοντας στην επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής αυτής. Αποτέλεσε για εμένα πρότυπο τόσο κατά την κλινική μου εκπαίδευση, όσο και κατά την ενασχόλησή μου με την έρευνα. Θεωρώ τη συνεργασία μαζί του καθοριστική τόσο για προσωπική όσο και για τη ερευνητική μου πορεία. Ήταν εκείνος που έχει κατευθύνει το ενδιαφέρον μου στο ερευνητικό πεδίο της μυελοδυσπλασίας, το οποίο αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερος θα πρέπει, επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή και διευθυντή της Κλινικής και του Εργαστηρίου της Παθολογικής Φυσιολογίας κ. Αθανάσιο Τζιούφα για την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη και την επιστημονική καθοδήγηση. Τον ευχαριστώ θερμά που μου έδωσε τη δυνατότητα να ανήκω στους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου της Παθολογικής Φυσιολογίας, το οποίο αποτελεί ένα περιβάλλον υψηλού ακαδημαϊκού επιπέδου. Η επιστημονική του αριστεία και η μεταδοτικότητα του ερευνητικού του ενθουσιασμού αποτελούν έναυσμα συνεχούς προσπάθειάς για την προσωπική μου βελτίωση ως ιατρού και επιστήμονα.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σταυρούλα Γιαννούλη ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή και ουσιαστική της παρουσία και τη μεγάλη συμβολή της στην περάτωση της παρούσας διατριβής. Ανεκτίμητα για εμένα υπήρξαν το αμέριστο ενδιαφέρον της και η επιστημονική της αριστεία.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στην κ. Αγλαΐα Δημητράκοπούλου (Εργαστήριο Κυτταρομετρίας, ΓΝΑ Λαϊκό) για τη συμμετοχή της στις πειραματικές διαδικασίες, την υπομονή και το ανιδιοτελές ενδιαφέρον της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το βιολόγο κ. Κωνσταντίνο Καμπά (Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας και Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ) και τη βιοχημικό κ. Θεοδώρα Κατσίλα (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) για το σχεδιασμό και την εκπόνηση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ τη κ. Κατερίνα Πουλάκη (Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας) για την ουσιαστική της συμβολή στην ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας, την προσωπική υποστήριξη και την επιστημονική της συμπαράσταση.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευσταθία Καψογεώργου για τις εύστοχες επιστημονικές της παρατηρήσεις, καθώς και για τη βοήθεια στο Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την ηθική και ψυχολογική τους υποστήριξη, τη συμπαράσταση, την υπομονή τους, και κυρίως για όλες τις αρχές που μου έχουν εμφυσήσει και τα εφόδια που μου έχουν προσφέρει.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

2-HG	2-υδροξύγλουταρικό
2-OG	2-οξογλουταρικό
ABCG2	μεταφορέας κασέτας σύνδεσης ATP
ADP	διφωσφορική αδενοσίνη
α-KG	α-κετογλουταρικό
AMP	μονοφωσφορική αδενοσίνη
AMPK	ενεργοποιούμενη από το AMP πρωτεϊνική κινάση
ARNT	πυρηνικός μετατοπιστής υποδοχέα αρυλ υδρογονανθράκων
Atad3A	οικογένεια ATPασης, AAA περιοχής που περιέχει 3A
Atg	αυτοφαγική πρωτεΐνη
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
BCL2	B λέμφωμα 2
BCOR	Συγκατασταλτικό γονίδιο του BCL6
BM	μυελός των οστών
BNIP3	BCL2/αδενοϊού E1B 19 kDa αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη 3
CBL	Οικοτροπική αλληλουχία μετασχηματισμού ρετροϊού Cas Br ποντικού
CBP	πρωτεΐνη δεσμευόμενη σε στοιχεία απάντησης στο κυκλικό AMP
CD	σύμπλεγμα διαφοροποίησης
CDKN1	εξαρτώμενος από την κυκλίνη αναστολέας κινάσης 1
CFU	μονάδες σχηματισμού αποικιών
CHIP	κλωνική αιμοποίηση απροσδιόριστου δυναμικού
COX	οξειδάση του κυτοχρώματος C
Cpt1a	καρνιτίνη παλμιτοϋλτρανσφεράση 1α
C-TAD	καρβοξυτελική περιοχή συνενεργοποίησης
CTLA-4	σχετιζόμενη με κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα πρωτεΐνη 4
CTRL	μάρτυρας
DAPI	4', 6' διαμιδινό 2 φαινυλινδόλη
DDIT4	επαγόμενο από βλάβη του DNA μετάγραφο 4
DDR	απαντήσεις στη βλάβη του DNA
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNMT3A	DNA μεθυλτρανσφεράση 3A
DSB	θραύσεις της διπλής έλικας του DNA
EB	περίσσεια βλαστών
ERK	ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα κινάση
ETC	αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων
FAD	δινουκλεοτίδιο φλαβίνης
FADH2	δινουκλεοτίδιο 1,5 διϋδρο-φλαβίνης
FAO	οξείδωση των λιπαρών οξέων
FIH	παράγων που αναστέλλει τον HIF
FIP200	την οικογένεια κινάσης εστιακής πρόσφυσης 200 kDa
FLT3-3L	συνδέτης του fms σχετιζόμενου υποδοχέα τυροσινικής κινάσης
G-CSF	παράγων διέγερσης κοκκιοκυττάρων
GFI1B	ανεξάρτητος από αυξητικό παράγοντα αναστολέας μεταγραφής 1B
GLUT1	μεταφορέας γλυκόζης 1
GM-CSF	παράγων διέγερσης κοκκιοκυττάρων-μονοκυττάρων
GSH	γλουταθειόνη
GSSG	δισουλφίδιο γλουταθειόνης
GTP	τριφωσφορική γουανοσίνη
HDAC	αποακετυλάση ιστονών

HIF	παράγοντας επαγόμενος από την υποξία
HK2	εξοκινάση 2
HPC	αιμοποιητικό προγονικό κύτταρο
HRE	στοιχείο απάντησης στην υποξία
HSC	αιμοποιητικό αρχέγονο κύτταρο
HSPC	αιμοποιητικό αρχέγονο/προγονικό κύτταρο
HSC70	σχετιζόμενη με θερμικό σοκ πρωτεΐνη 70kDa
Hsp	πρωτεΐνη θερμικού σοκ
ICUS	ιδιοπαθής κυτταροπενία απροσδιόριστης σημασίας
IDC	ινδοκυανίνη
IDH	αφυδρογονάση του ισοκιτρικού
IL	ιντερλευκίνη
IPSS	διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης
IRF4	ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης 4
JAK	κινάση Janus
JNK	c τερματική κινάση Jun N
KLF1	kruppel ομοιάζων παράγοντας 1
LAMP1	σχετιζόμενη με το λυσόσωμα μεμβρανική πρωτεΐνη 1
LC3	σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη 1A/1B- ελαφριά αλυσίδα 3
LKB	ηπατική κινάση B
LSC	αρχέγονο κύτταρο που δίνει γένεση σε λευχαιμία
LSK	δείκτης σειράς -, Sca-1+,c-Kit+
LT-HSCs	αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με μακροπρόθεσμη ικανότητα επανεγκατάστασης αιμοποίησης
MAPK	ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση
MDM2	ομόλογο διπλού λεπτού ποντικού 2
MDS	μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο
MEF	ινοβλάστης εμβρύου ποντικού
MEIS1	ομόλογο μυελικό εξωτροπικό σημείο 1 ενσωμάτωσης ιού
Mfn2	μιτοφουσίνη 2
miR	μικροRNA
MLD	δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών
MLL	μικτής σειράς λευχαιμία
MPO	μυελοπεροξειδάση
mRNA	αγγελιοφόρο RNA
mtDNA	Μιτοχονδριακό DNA
mTOR	μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης
mTORC	σύμπλεγμα μηχανιστικού στόχου της ραπαμυκίνης
NAD	δινουκλεοτίδιο νικοτανιμιδίου αδενίνης
NADH	δινουκλεοτίδιο νικοτανιμιδίου αδενίνης H ⁺
NADP	φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτανιμιδίου αδενίνης
NIM	νιτροϊμιδαζόλιο
NF-κB	πυρηνικός παράγοντας ενεργοποιημένων B κυττάρων
Nrf1	πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας
ODD	εξαρτώμενη από το οξυγόνο περιοχή αποδόμησης
OXPHOS	οξειδωτική φωσφορύλιωση
PAS	σημείο συναρμολόγησης του φαγοφόρου
PD-1	πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1
PDH	αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού
PDK1	κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού

PE	φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
PEP	φωσφοενολοπυροσταφυλικό
PFS	στρες αναδίπλωσης πρωτεϊνών
PGC-1	ενεργοποιημένος υποδοχέας γ ενεργοποιητή υπεροξεισώματος γ
PHD	προλυλυδροξυλάση
PI3	φωσφατιδυλινοσιτόλη 3
PI3K	κινάση της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3
Pink1	κινάση που θεωρητικά επάγεται από το pten
PKC	πρωτεϊνική κινάση C
PLK	polo ομοιάζουσα κινάση
Pml	προμυελοκυτταρική λευχαιμία
PO ₂	μερική πίεση οξυγόνου
PPAR	ενεργοποιημένος υποδοχέας πολλαπλασιασμού υπεροξειδίου
PPP	μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης
PTEN	ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης
PTD	μερική παράλληλη επανάληψη
Ptpmt1	μιτοχονδριακή πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης 1
qRT-PCR	ποσοτική αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
RACK1	υποδοχέας της κινάσης της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C 1
RAPTOR	ρυθμιστική σχετιζόμενη με το σύμπλεγμα mTOR πρωτεΐνη
RCC	καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων
REDD1	ρυθμιζόμενος στην ανάπτυξη και στη βλάβη του DNA παράγοντας 1
RICTOR	ανεξάρτητος από το RAPTOR συνοδός του συμπλέγματος 2 του mTOR
R- IPSS	αναθεωρημένο διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης
RNA	ριβονουκλεϊκό οξύ
RNA-seq	αλληλούχιση RNA
ROS	αντιδραστικά είδη οξυγόνου
RUNX1	σχετιζόμενος με Runt μεταγραφικός παράγοντας
SAM	S-αδενοσυλ-μεθειονίνη
SCF	παράγοντας των αρχέγονων κυττάρων
SCID	σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
SDH	αφυδρογονάση του σουξινικού
SENP1	sentrin/SUMO ειδική πρωτεάση 1
SF3B1	παράγοντας του σπλαϊσώματος 3b1
SIRT	σιρτουΐνη
SLD	δυσπλασία μιας κυτταρικής σειράς
SQSTM1	σεκουεστόσωμα
SRSF2	πλούσιος σε σερίνη και αργινίνη παράγοντας του σπλαϊσώματος 2
STAT	μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής
ST-HSCs	αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με βραχυπρόθεσμη ικανότητα επανεγκατάστασης αιμοποίησης
TAD	περιοχή συνενεργοποίησης
TCA	κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος
TET	δέκα-έντεκα μετατοπισμένη διοξυγενάση μεθυλκυτοσίνης
TFAM	μεταγραφικός παράγοντας Α μιτοχονδριακός
TGFβ	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
TOMM20	τρανσλοκάση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης
TSC	σύμπλεγμα οζώδους σκλήρυνσης
U2AF1	βοηθητικός παράγοντας μικρού πυρηνικού RNA U2 1

Ulk	προσομοιάζουσα στην Ubc-51 κινάση
UPR	απάντηση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες
VEGF	αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VEGFR	υποδοχέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα
VHL	von Hippel Lindau
WHO	παγκόσμια οργάνωση υγείας
ΜΔΣ	μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
ΜΟ	μυελός των οστών
ΟΜΛ	Οξεία μυελογενής λευχαιμία

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ABSTRACT

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

- 1.1 Ορισμός
- 1.2 Επιδημιολογία
- 1.3 Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη ΜΔΣ
- 1.4 Κλινικά χαρακτηριστικά
- 1.5 Μικροσκοπική μελέτη
- 1.6 Γενετικό προφίλ
- 1.7 Πρόγνωση και προγνωστικοί παράγοντες
- 1.8 Κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεση των ΜΔΣ
- 1.9 Θεραπεία

Κεφάλαιο 2: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 – Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)

- 2.1 Δομή και φυσιολογική ρύθμιση
- 2.2 Μη κανονικοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1α
- 2.3 Ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου από τον HIF-1
 - 2.3.1. Η μεταγραφική ρύθμιση ελέγχει την αγγειογένεση στην υποξία
 - 2.3.2. Ο HIF-1 ρυθμίζει την αλλαγή προς τον αναερόβιο μεταβολισμό
- 2.4 Νεοπλασία, φλεγμονή και υποξία
 - 2.4.1 Ανάπτυξη του όγκου
 - 2.4.2 Η υπερέκφραση του HIF-1 προκαλεί απόπτωση
 - 2.4.3 HIF-1 και φλεγμονώδεις απαντήσεις

Κεφάλαιο 3: Ο ρόλος του HIF-1 στην αιμοποίηση

- 3.1 Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells – HSCs)
 - 3.1.1 HSCs σε ηρεμία και σε ενεργό κυτταρικό κύκλο
- 3.2 Το υποξικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών
- 3.3 Ο μηχανισμός ανταπόκρισης των HSCs στην υποξία και ο ρόλος του HIF-1 στην αιμοποίηση
- 3.4 HSCs και in vitro υποξία

3.5 Ο ρόλος του HIF-1 στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)

Κεφάλαιο 4: Μεταβολισμός και αιμοποίηση

4.1 HSCs σε ηρεμία και αναερόβιος μεταβολισμός

4.1.1 Ο HIF-1 επαναπρογραμματίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης στα υποξικά HSCs

4.2 Δέσμευση προς διαφοροποίηση - μεταβολισμός των λιπαρών οξέων

4.3 Διαφοροποίηση – η στροφή στην οξειδωτική φωσφορλίωση

4.4 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης των HSCs

4.5 Βιοενεργητικά μονοπάτια ανταπόκρισης στις μεταβολικές αλλαγές

4.5.1 Ο άξονας PI3K/mTOR

4.5.2 Ηπατική κινάση Β (Liver kinase Β LKB1)/AMPK

4.6 Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός : ένας δρόμος διαφυγής των λευχαιμικών αρχέγονων κυττάρων

Κεφάλαιο 5: Αυτοφαγία και αιμοποίηση

5.1 Αυτοφαγία

5.1.1 Μοριακοί μηχανισμοί της αυτοφαγίας

5.1.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης της αυτοφαγίας

5.1.3 Αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος (Autosis)

5.2 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στην αιμοποίηση

5.2.1. Αυτοφαγία και HSCs

5.2.2. Αυτοφαγία και ερυθροποίηση

5.2.3. Επίδραση της αυτοφαγίας στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο και τα μεταβολικά μονοπάτια των αιμοποιητικών κυττάρων

5.3 Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 6: Ο ρόλος του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (Hypoxia Inducible Factor 1 – HIF-1) και της ψευδοϋποξίας στην παθοφυσιολογία των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

6.1 Εισαγωγή

6.2. Υλικά και μέθοδοι

- 6.2.1. Πληθυσμός μελέτης
- 6.2.2. Απομόνωση των κυττάρων του ΜΟ
- 6.2.3. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και qRT-PCR
- 6.2.4 Κυτταρομετρία ροής
- 6.2.5. Σύνθεση του σημασμένου με φθοριόχρωμα νιτροϊμιδαζολίου (NIM)
- 6.2.6. Χρώση και ανοσοφθορισμός του NIM σε οστεομυελικές βιοψίες
- 6.2.7. Ανοσοφθορισμός
- 6.2.8. Μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
- 6.2.9. Καλλιέργειες των CD34+ κυττάρων
- 6.2.10. Στατιστική ανάλυση

6.3. Αποτελέσματα

- 6.3.1. Τα CD34+ και τα μυελικά κύτταρα του ΜΟ των ασθενών με ΜΔΣ παρουσιάζουν ένα προφίλ ενεργοποίησης της HIF1 με αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης του REDD1
- 6.3.2. Ο ΜΟ των ΜΔΣ παρουσιάζει αυξημένη ενδοκυττάρια συσσώρευση NIM που σχετίζεται θετικά με τη σοβαρότητα του ΜΔΣ
- 6.3.3. Η μιτοφαγία και ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά της μυελικής σειράς των ασθενών με ΜΔΣ, με τη σοβαρότητά τους να αυξάνεται με την αύξηση των βλαστών του ΜΟ
- 6.3.4 Η αναστολή του HIF-1α αυξάνει την ικανότητα για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των CD34+ κυττάρων ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ

6.4 Συζήτηση

6.5 Συμπεράσματα

Κεφάλαιο 7: Το βιοενεργητικό προφίλ των διαφοροποιούμενων κυττάρων της μυελικής σειράς μυελοσυνδπλαστικών συνδρόμων με χαμηλά και υψηλά ποσοστά βλαστών

7.1 Εισαγωγή

7.2 Υλικά και μέθοδοι

7.2.1 Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία

7.2.2 Χρωματογραφία

7.2.3 Φασματομετρία μάζας

7.2.4 Επεξεργασία δεδομένων

7.3 Αποτελέσματα

7.3.1 Το φαινόμενο Warburg και τα παράπλευρα μονοπάτια του στο μεταβόλομα των ΜΔΣ

7.3.2 Το μεταβόλωμα των ΜΔΣ κυριαρχείται από το μεταβολισμό των λιπιδίων, ενώ το ποσοστό βλαστών του ΜΟ οριοθετεί την προέλευση των λιπιδίων και το μονοπάτι της αποδόμησης.

7.3.3 Ο οπτικός λόγος NADH/FADH₂ και οι λόγοι οξειδο-αναγωγής NAD/NADH, GSH/GSSG και NADP/NADPH

7.3.4 Ο μεταβολισμός της γλουταμίνης, η αποτοξίνωση του αζώτου και ο κύκλος του TCA στα ΜΔΣ

7.3.5 Οι επιγενετικοί τροποποιητές είναι ένα διακριτό χαρακτηριστικό των ΜΔΣ

7.4 Συζήτηση

7.5 Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Περίληψη

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών διαταραχών των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells – HSCs) ή προγονικών κυττάρων (Hematopoietic Progenitor Cells – HPCs). Η τεκμηριωμένη εξάρτηση των προγονικών κυττάρων των ΜΔΣ από το υποξικό περιβάλλον του μυελού των οστών (ΜΟ) έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον στον επαγόμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα 1 (Hypoxia Inducible Factor 1 – HIF-1). Ο HIF-1 διαμεσολαβεί τη διατήρηση της ηρεμίας και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση τροποποιώντας το μεταβολισμό των HSCs, αποτελώντας έτσι έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο.

Στο πρώτο τμήμα της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε η παθολογική σταθεροποίηση του HIF-1 στο ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ.

Μέθοδοι: Δείγματα αναρρόφησης ΜΟ και οστεομυελικές βιοψίες συλλέχθηκαν από 16 ασθενείς με πρωτοδιάγνωση ΜΔΣ και από 7 μάρτυρες χωρίς κακοήγη αιματολογική διαταραχή. Μελέτη με qRT-PCR και κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε αντίστοιχα για την εκτίμηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης του HIF-1α και του άμεσου μεταγραφικού στόχου του HIF-1, *regulated in development and DNA damage responses 1* (REDD1) σε δείγματα αναρρόφησης ΜΟ. Η αυτοφαγία και η μιτοφαγία μελετήθηκαν με ανοσοφθορισμό και παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* καλλιέργειες CD34+ HSCs ΜΟ με κατεύθυνση διαφοροποίησης προς μυελική σειρά με τη χρήση ενός λειτουργικού αναστολέα του HIF-1α.

Αποτελέσματα: Δείξαμε ότι η παθολογική έκφραση και μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α είναι ανεξάρτητη από το οξυγόνο τεκμηριώνοντας το φαινόμενο της ψευδοϋποξίας στο ΜΟ των ΜΔΣ. Ακολουθώντας, μελετήσαμε την ποιότητα και την ποσότητα των μιτοχονδρίων παράλληλα με τα επίπεδα αυτοφαγίας στα διαφοροποιούμενα κύτταρα της μυελικής σειράς μετά την απομόνωση από δείγματα αναρρόφησης ΜΟ, δεδομένου ότι και τα δύο φαινόμενα είναι εξαρτώμενα από τον HIF-1. Δείξαμε ότι η μιτοφαγία των παθολογικών μιτοχονδρίων και ο αυτοφαγικός θάνατος αποτελούν κυρίαρχο χαρακτηριστικό της μυελικής σειράς των ΜΔΣ, με τη βαρύτητά τους να αυξάνεται με το ποσοστό των βλαστών του ΜΟ. Τέλος, χρησιμοποιήσαμε *in vitro* καλλιέργειες CD34+ HSCs απομονωμένων από δείγματα αναρρόφησης ΜΟ προκειμένου να επηρεάσουμε την έκφραση του HIF-1 και να μελετήσουμε το δυναμικό του ως θεραπευτικού στόχου. Διαπιστώσαμε ότι παρότι οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε παροχή οξυγόνου 21%, ο HIF-1 παρέμενε παθολογικά σταθερός σε όλες τις καλλιέργειες των ΜΔΣ. Η αναστολή του HIF-1α είχε διαφορετικού βαθμού θετική επίδραση σε όλες τις καλλιέργειες των ΜΔΣ με <5% βλάστες, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στις καλλιέργειες των ΜΔΣ με ≥5% βλάστες, οι οποίες δεν επιβίωσαν μετά την τρίτη μέρα της καλλιέργειας.

Συμπεράσματα: Συμπεραίνουμε ότι ο HIF-1 και η ψευδοϋποξία αποτελούν κυρίαρχο χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας των ΜΔΣ και η επίδραση επί αυτών μπορεί να έχει κάποιο δυναμικό στη θεραπευτική των ήπιων ΜΔΣ.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, διερευνήσαμε τα διαφορετικά μεταβολικά προφίλ της μυελικής σειράς ΜΔΣ με χαμηλά και υψηλά ποσοστά βλαστών.

Μέθοδοι: Πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των διαφοροποιούμενων κυττάρων της μυελικής σειράς από δείγματα αναρρόφησης ΜΟ

ασθενών με ΜΔΣ με <5% (G1) ή ≥5% (G2) βλάστες, με στόχο να διερευνήσουμε το ρόλο του μεταβολισμού στη βαρύτητα και το κακόηθες δυναμικό των ΜΔΣ. Δείγματα αναρρόφησης ΜΟ συλλέχθηκαν από 14 ασθενείς με ΜΔΣ, οι οποίοι δεν είχαν λάβει θεραπεία (G1, n=10 και G2, n=4) και από αντίστοιχης ηλικίας μάρτυρες (n=5). Μετά από απομόνωση των κυττάρων της μυελικής σειράς, πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το Metabokit. Η ανάλυση εμπλουτισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Metaboanalyst v4 με εφαρμογή σχετιζόμενων με μονοπάτια ομάδων μεταβολιτών.

Αποτελέσματα: Τεκμηριώσαμε ένα βιοενεργητικό προφίλ που συντονίζεται από το φαινόμενο Warburg και στις δύο ομάδες, με σημαντικά διαφορετικό αποτέλεσμα που εξαρτάται από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και την οξειδοαναγωγική κατάσταση κάθε ομάδας. Τα κύτταρα της ομάδας G1 παρουσιάζουν συσσώρευση ενδιάμεσων μεταβολιτών της γλυκόλυσης λόγω δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, ενώ η λειτουργική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και η βελτιωμένη οξειδοαναγωγή της ομάδας G2 εξισορροπεί τη διαταραχή Warburg. Το μεταβόλομα και των δύο ομάδων παρουσιάζει αφθονία επιγενετικών τροποποιητών. Το μεταβόλομα της ομάδας G1 και G2 διαφέρει και τελικά καθορίζει τον κλινικό φαινότυπο του ΜΔΣ, καθώς και το δυναμικό για κακοήγη μετατροπή.

Συμπέρασμα: Τα ευρήματά μας προτείνουν ότι ο διαταραγμένος μεταβολισμός συμμετέχει στην παθογένεση του συνδρόμου και καθορίζει επίσης τη βαρύτητα της νόσου. Προτείνουμε επίσης ότι αυτές οι βιοενεργητικές μεταβολές χαρακτηρίζουν και οδηγούν τη λευχαιμική μετατροπή. Τα δεδομένα μας δεν παρέχουν απλά μια νέα θεώρηση στην παθοφυσιολογία των ΜΔΣ, αλλά τροποποιούν και την επικρατούσα άποψη για τη βιολογία της σχετιζόμενης με ΜΔΣ ΟΜΛ.

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) comprise a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem (HSCs) and/or progenitor cells (HPCs) disorders. The established dependence of MDS progenitors on the hypoxic bone marrow (BM) microenvironment turned scientific interests to the transcription factor Hypoxia-Inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 facilitates quiescence maintenance and regulates differentiation by manipulating HSCs metabolism, being thus an appealing research target.

In the first section of the study, we examine the aberrant HIF-1 stabilization in BMs from MDS patients.

Methods: BM aspiration samples, as well as BM biopsies, were collected from 16 newly diagnosed previously untreated MDS patients and 7 controls with non-malignant hematologic disorder. qRT-PCR and flow cytometry analysis were respectively used for the assessment of mRNA and protein levels of HIF-1 α and HIF-1 direct transcriptional target, regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1), in BM aspiration samples. A nitroimidazole-indocyanine conjugate was used for the study of the hypoxic phenotype in BM biopsies, as well as in cultured CD34+ BM cells. Autophagy and mitophagy were examined by means of immunofluorescence and electron microscopy. We finally performed *in vitro* cultures of human BM derived CD34+ HSCs under myeloid priming using a functional HIF-1 α inhibitor.

Results: We show that HIF-1 aberrant expression and transcription activity is oxygen independent establishing the phenomenon of pseudohypoxia in MDS BM. Next, we examine mitochondrial quality and quantity along with levels of autophagy in the differentiating myeloid lineage isolated from fresh BM MDS and control aspirates given that both phenomena are HIF-1 dependent. We show that mitophagy of abnormal mitochondria and autophagic death are prominently featured in the MDS myeloid lineage, their severity increasing with intra-BM blast counts. Finally, we use *in vitro* cultured CD34+ HSCs isolated from fresh human BM aspirates to manipulate HIF-1 expression and examine its potential as a therapeutic target. We find that despite cultured under 21% O₂, HIF-1 remained aberrantly stable in all MDS cultures. Inhibition of HIF-1 α subunit had a variable beneficial effect in all <5%-intra-BM blasts-MDS, while it had no effect in controls or in >5%-intra-BM blasts-MDS that uniformly died within 3 days of culture.

Conclusions: We conclude that HIF-1 and pseudohypoxia are prominently featured in MDS pathobiology and their manipulation has some potential in the therapeutics of benign MDS.

In the second section of the study, we examine the different metabolic profile of MDS myeloid lineage with low and high BM blast percentage.

Methods: We performed an untargeted metabolomic analysis of differentiating myeloid lineage cells from MDS BM aspirates that exhibited <5% (G1) or \geq 5% (G2) blasts, in order to delineate its role in MDS severity and malignant potential. BM aspirates were collected from 14 previously untreated MDS patients (G1, n = 10 and G2, n = 4) and age matched controls (n = 5). Following myeloid lineage cell isolation, untargeted mass spectrometry-based metabolomics analysis was performed. Data were processed and analyzed using Metabokit. Enrichment analysis was performed using Metaboanalyst v4 employing pathway-associated metabolite sets.

Results: We established a bioenergetic profile coordinated by the Warburg phenomenon in both groups, but with a massively different outcome that mainly depended upon each group mitochondrial function and redox state. G1 cells are overwhelmed by glycolytic intermediate accumulation due to failing mitochondria, while the functional electron transport chain and improved redox in G2 compensate for Warburg disruption. Both metabolomes reveal the production and abundance of epigenetic modifiers. G1 and G2 metabolomes differ and eventually determine the MDS clinical phenotype, as well as the potential for malignant transformation.

Conclusion: Our findings suggest that a perturbed metabolism underlies the syndrome's pathogenesis and also determines the disease severity. We also propose that these bioenergetic alterations are essentially featured in and indeed drive the process of leukemic transformation. Our data not only offer novel insight into the elusive MDS pathophysiology, but also change our viewpoint on MDS-related acute myeloid leukemia biology.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

1.1 Ορισμός

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζονται από κυτταροπενίες, δυσπλασία σε μία ή περισσότερες σειρές του ΜΟ, μη αποδοτική αιμοποίηση στο ΜΟ, επαναλαμβανόμενες γενετικές βλάβες και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε ΟΜΛ [1,2]. Παρατηρείται αυξημένη απόπτωση στα προγονικά κύτταρα του ΜΟ, η οποία συμβάλλει στην εμφάνιση των κυτταροπενιών [3]. Η κυτταροπενία σε τουλάχιστον μία από τις αιμοποιητικές σειρές είναι απαραίτητη για τη διάγνωση του ΜΔΣ. Τα προτεινόμενα όρια για τις κυτταροπενίες που εδραιώθηκαν από τον αρχικό διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης (International Prognostic Scoring System – IPSS) (αιμοσφαιρίνη <10g/dl, αιμοπετάλια < 100x10⁹/l, απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων <1,8x10⁹/l) [4] χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για να ορίσουν τις κυτταροπενίες για τη διάγνωση των ΜΔΣ και οι περισσότεροι ασθενείς με ΜΔΣ θα έχουν τουλάχιστον μια κυτταροπενία με τιμές κάτω από τα παραπάνω όρια. Παρόλα αυτά, η διάγνωση του ΜΔΣ μπορεί να τεθεί σε ασθενείς με ηπιότερου βαθμού αναιμία (αιμοσφαιρίνη <13g/dl για τους άνδρες ή αιμοσφαιρίνη <12g/dl για τις γυναίκες) ή θρομβοπενία (αιμοπετάλια <150 x10⁹/l), εφόσον πληρούνται κριτήρια μορφολογικής δυσπλασίας ή/και κυτταρογενετικά ευρήματα χαρακτηριστικά των ΜΔΣ [5].

Το μορφολογικό χαρακτηριστικό των ΜΔΣ είναι η δυσπλασία σε μια ή περισσότερες σειρές του ΜΟ. Η δυσπλασία μπορεί να συνοδεύεται από αύξηση των μυελοβλαστών στο περιφερικό αίμα ή/και στο ΜΟ, αλλά το ποσοστό των βλαστών είναι πάντα <20%, τιμή η οποία αποτελεί και το προτεινόμενο όριο πάνω από το οποίο τίθεται η διάγνωση της ΟΜΛ. Επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες ανευρίσκονται σε 40-50% των περιπτώσεων, ενώ επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις γονιδίων αναγνωρίζονται στην πλειονότητα των ΜΔΣ κατά τη διάγνωσή τους.

Η νοσολογική οντότητα των ΜΔΣ περιλαμβάνει αρκετούς διακριτούς υποτύπους, που ορίζονται από τον αριθμό των κυτταροπενιών κατά τη διάγνωση, τον αριθμό των κυτταρικών σειρών του μυελού που παρουσιάζουν δυσπλασία, την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και το ποσοστό των βλαστών στο περιφερικό αίμα και το ΜΟ. Στην πιο πρόσφατη ταξινόμηση του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (World Health Organization – WHO) το 2017, μόνο μια κυτταρογενετική ανωμαλία, η del(5q) χρησιμοποιείται για να ορίσει ένα συγκεκριμένο υπότυπο ΜΔΣ. Η μετάλλαξη ενός γονιδίου, του SF3B1, σχετίζεται με το ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες.

Παρότι η εξέλιξη σε ΟΜΛ αποτελεί τη φυσική πορεία σε πολλές περιπτώσεις ΜΔΣ, το ποσοστό των ασθενών που παρουσιάζουν πρόοδο νόσου ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τον υπότυπο του ΜΔΣ, με την υψηλότερη πιθανότητα εξέλιξης σε ΟΜΛ να αφορά σε υπότυπους με αυξημένο ποσοστό βλαστών [6]. Οι περισσότεροι υπότυποι χαρακτηρίζονται από προοδευτική ανεπάρκεια του ΜΟ, αλλά η βιολογική πορεία ορισμένων υποτύπων είναι μακρά και καλοήθης, με πολύ χαμηλή επίπτωση εξέλιξης σε ΟΜΛ [7].

1.2 Επιδημιολογία

Τα ΜΔΣ εκδηλώνονται κυρίως σε μεγαλύτερους ενήλικες (μέση ηλικία ασθενών: 70 έτη), με επικράτηση στους άνδρες. Η ετήσια επίπτωση είναι 3-5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα

στο σύνολο του πληθυσμού (χωρίς διόρθωση για την ηλικία) και 20 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ηλικίας >70 ετών. Δεδομένης της ελαττωμένης καταγραφής των ΜΔΣ στις περισσότερες βάσεις καταγραφής κακοηθειών, η πραγματική ετήσια επίπτωση σε ασθενής >65 ετών μπορεί να φτάνει και τις 75 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού [8,9]. Περίπου 10.000 νέες περιπτώσεις ΜΔΣ διαγιγνώσκονται ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, σύμφωνα με τα δεδομένα του 2003-2004 από το πρόγραμμα SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) και το NAACCR (North American Association of Central Cancer Registries), αλλά εκτιμήσεις βασιζόμενες στο Medicare για την ίδια χρονική περίοδο ανέρχονται σε έως και 45.000 περιπτώσεις διάγνωσης ΜΔΣ σε άτομα >65 ετών ετησίως [10-12].

Γενικότερα προσοχή πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι κανείς ασθενής δεν πρέπει να διαγιγνώσκεται ως πάσχων από ΜΔΣ χωρίς να είναι γνωστό το κλινικό και το φαρμακευτικό ιστορικό του, ενώ επίσης καμία περίπτωση ΜΔΣ δεν πρέπει να επαναταξινομείται ενώ ο ασθενής λαμβάνει θεραπεία με αυξητικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ερυθροποιητίνης. Ορισμένα φάρμακα, λοιμώξεις, μεταβολικές ανεπάρκειες και διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να προκαλούν τόσο κυτταροπενίες όσο και μορφολογική δυσπλασία. Η ανεξήγητη, εμμένουσα κυτταροπενία απουσία δυσπλασίας δεν πρέπει να αποδίδεται σε ΜΔΣ, εκτός αν υπάρχει συγκεκριμένη κυτταρογενετική ανωμαλία. Η εμμένουσα κυτταροπενία χωρίς δυσπλασία και χωρίς ειδική κυτταρογενετική ανωμαλία πρέπει να διαγιγνώσκεται ως ιδιοπαθής κυτταροπενία απροσδιόριστης σημασίας (Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance – ICUS), ενώ η αιματολογική και κυτταρογενετική παρακολούθηση του ασθενή πρέπει να είναι στενή [13]. Ασθενείς με κλωνικές μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με ΜΔΣ χωρίς δυσπλασία στη μελέτη του ΜΟ δεν πρέπει επίσης να διαγιγνώσκονται ως πάσχοντες από ΜΔΣ. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται κλωνική αιμοποίηση απροσδιόριστου δυναμικού (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential - CHIP) [14].

1.3 Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη ΜΔΣ

Τα πρωτοπαθή ή de novo ΜΔΣ αναπτύσσονται χωρίς κάποιο γνωστό ιστορικό έκθεσης σε χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες μπορεί να είναι η έκθεση σε βενζόλιο (σε επίπεδα βέβαια αρκετά υψηλότερα από το μέγιστο επιτρεπτό από τις περισσότερες κυβερνητικές υπηρεσίες), το κάπνισμα (τουλάχιστον μερικώς λόγω της ύπαρξης βενζολίου στον καπνό των τσιγάρων), έκθεση σε γεωργικά χημικά ή διαλύτες και οικογενειακό ιστορικό νεοπλασιών του αιμοποιητικού [15]. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και κληρονομικά σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας, όπως η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Shwachman-Diamond και η συγγενής δυσκεράτωση, τα οποία προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΜΔΣ σε νεαρή ηλικία [16].

1.4 Κλινικά χαρακτηριστικά

Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζονται με συμπτώματα σχετιζόμενα με τις κυτταροπενίες. Στην πλειονότητά τους οι ασθενείς εμφανίζουν αναιμία, ενώ η ουδετεροπενία ή/και η θρομβοπενία είναι λιγότερο συχνές. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών εξαρτώνται από μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση [17,18]. Σπάνια μπορεί να παρατηρείται οργανομεγαλία.

1.5 Μικροσκοπική μελέτη

Η μορφολογική ταξινόμηση των ΜΔΣ βασίζεται κυρίως στο ποσοστό των βλαστών στο ΜΟ και το περιφερικό αίμα, τον τύπο και το βαθμό της δυσπλασίας και το ποσοστό των δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών. Η κυτταρικές σειρές που πενιές δεν απαραίτητα αυτές που εκδηλώνουν τη δυσπλασία [19].

Οι περιπτώσεις των ΜΔΣ χωρίς αυξημένους βλάστες αναγνωρίζονται με την εκδήλωση δυσπλασίας σε μία σειρά (Single Lineage Dysplasia - SLD) ή σε πολλαπλές σειρές (Multilineage Dysplasia - MLD). Στις περισσότερες περιπτώσεις ΜΔΣ - SLD, η δυσπλασία αφορά στην ερυθρά σειρά. Η δυσπλασία μιας σειράς μπορεί να αφορά επίσης στην κοκκιοκυτταρική ή τη μεγακαρουκυτταρική σειρά, αλλά αυτό είναι πολύ πιο σπάνιο από τη μεμονωμένη δυσπλασία της ερυθράς σειράς [20]. Στα ΜΔΣ-MLD, δυσπλαστικά χαρακτηριστικά αναγνωρίζονται σε δύο ή περισσότερες σειρές. Το απαιτούμενο ποσοστό κυττάρων της ερυθράς και της κοκκιοκυτταρικής σειράς με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά για να θεωρηθεί αξιολογήσιμη η δυσπλασία είναι $\geq 10\%$ [21]. Ως σημαντική μεγακαρουκυτταρική δυσπλασία ορίζεται η παρουσία $\geq 10\%$ δυσπλαστικών μεγακαρουκυττάρων με εκτίμηση ≥ 30 μεγακαρουκυττάρων σε επίχρισμα ΜΟ ή τομή οστεομυελικής βιοψίας. Ωστόσο μερικές μελέτες προτείνουν ένα όριο της τάξης του 30-40% για τη μεγακαρουκυτταρική δυσπλασία για εξασφάλιση μεγαλύτερης ειδικότητας [22,23]. Τα μικρομεγακαρουκύτταρα και τα πολυπύρρηνα μεγακαρουκύτταρα με ξεχωριστούς πυρήνες αποτελούν τα πιο αξιόπιστα ευρήματα δυσπλασίας της μεγακαρουκυτταρικής σειράς [22,23].

Η δυσερυθροποίηση εκδηλώνεται κυρίως ως μεταβολές των μορφολογικών χαρακτηριστικών του πυρήνα των ερυθροβλαστών (πυρηνικές προσεκβολές, διαπυρηνικές γέφυρες, καρδιορρηξία, παρουσία πολλαπλών πυρήνων). Οι μεγαλοβλαστοειδείς μεταβολές είναι συχνά παρούσες στα ΜΔΣ, αλλά η μεμονωμένη παρουσία τους δεν επαρκεί για να τεκμηριώσει τη δυσερυθροποίηση. Τα κυτταροπλασματικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την ύπαρξη δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών, την κενοδοπιώδη εκφύλιση και την εκσεσημασμένη θετικότητα για PAS (Periodic acid-Schiff). Η δυσκοκκιοποίηση χαρακτηρίζεται κυρίως από υπολόβωση του πυρήνα (ψευδο-Pelger-Huët ανωμαλία) ή υπερλόβωση του πυρήνα, υποκοκκίωση του κυτταροπλάσματος, ψευδο-Chediak-Higashi κοκκία και μικρό μέγεθος [24]. Η μεγακαρουκυτταρική δυσπλασία χαρακτηρίζεται από παρουσία μικρομεγακαρουκυττάρων, μη λοβωμένους πυρήνες και πολλαπλούς διαχωρισμένους πυρήνες [25]. Η παρουσία ραβδίων Auer θεωρείται ένδειξη ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών ανεξάρτητα από το ποσοστό των βλαστών.

1.6 Γενετικό προφίλ

Οι κυτταρογενετικές μελέτες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση των ασθενών με ΜΔΣ όσον αφορά στην πρόγνωση και τον καθορισμό κλωνικότητας, ενώ μπορεί να ανδεικνύουν και συσχετίσεις με μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Το ΜΔΣ με μεμονωμένη del(5q) αποτελεί έναν ξεχωριστό υπότυπο ΜΔΣ στην ταξινόμηση κατά WHO 2017. Παρουσιάζεται συχνότερα σε γυναίκες και χαρακτηρίζεται από μεγακαρουκύτταρα με υπολοβωμένους πυρήνες ή πυρήνες χωρίς λόβωση, μακροκυτταρική αναιμία, φυσιολογικό ή αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων και ευνοϊκή κλινική πορεία. Η απώλεια του 17p σχετίζεται με ΜΔΣ ή ΟΜΛ με ανωμαλία ψευδο-Pelger-Huët, μικρά ουδετερόφιλα με κενοτόπια, μετάλλαξη του TP53 και κακή κλινική πρόγνωση, ενώ αποτελεί συχνό εύρημα στο σχετιζόμενο με θεραπεία ΜΔΣ [26]. Οι σύνθετοι καρύοτυποι (≥ 3 ανωμαλίες)

τυπικά περιλαμβάνουν βλάβες των χρωμοσωμάτων 5 ή/και 7 και σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Αρκετά άλλα κυτταρογενετικά ευρήματα φαίνεται να σχετίζονται με χαρακτηριστικές μορφολογικές ανωμαλίες, όπως για παράδειγμα η μεμονωμένη *del(20q)* σχετίζεται με δυσμεγακαρουποίηση και θρομβοπενία και η *inv(3)(q21.3q26.2)* σχετίζεται με παθολογικά μεγακαρουκύτταρα και μπορεί να συνοδεύεται από θρομβοκυττάρωση [27,28].

Εκτός από τις επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που ανιχνεύονται με τη μελέτη του καρυοτύπου και οι οποίες ανιχνεύονται σε περίπου 50% των περιπτώσεων ΜΔΣ, επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις σε πάνω από 50 γονίδια έχουν ανιχνευθεί σε στο 80-50% των ασθενών με ΜΔΣ. Τα συχνότερα γονίδια στα οποία ανευρίσκονται μεταλλάξεις κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν το μάτισμα του RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* και *ZRSR2* συνολικά μεταλλαγμένα σε >50% των περιπτώσεων) ή την επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεθυλίωσης του DNA (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*) ή της τροποποίησης των ιστονών (*ASXL1*, *EZH2*). Άλλα γονίδια που ανιχνεύονται συχνά μεταλλαγμένα είναι εκείνα που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες (*RUNX1*, *NRAS*, *BCOR*), πρωτεΐνες σηματοδότησης (*CBL*), το ογκοκατασταλτικό p53 (*TP53*) και το σύμπλεγμα της κοχεξίνης (*STAG2*), το οποίο ελέγχει τη σύνδεση των αδερφών χρωματίδων [29,30]. Όπως και με τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συγκεκριμένες μεταλλάξεις έχουν συσχετισθεί με συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά στα ΜΔΣ. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη του *SF3B1* σχετίζεται με την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και οι μεταλλάξεις των *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* και *SRSF2* σχετίζονται με σημαντική δυσπλασία των κοκκιοκυττάρων [22].

Το τοπίο των μεταλλάξεων στα ΜΔΣ είναι σύνθετο και δυναμικό. Πολλαπλές μεταλλάξεις μπορεί να είναι παρούσες, διακριτά προφίλ μεταλλάξεων μπορεί να ανιχνεύονται σε δύο ή περισσότερους υποκλώνους, ενώ η σχετική αναλογία των υποκλώνων αυτών μπορεί να μεταβάλλεται με τη θεραπεία και την πρόοδο της νόσου [31]. Οι επίκτητες κλωνικές μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στα ΜΔΣ μπορεί επίσης να υπάρχουν και σε αιμοποιητικά κύτταρα υγιών μεγαλύτερης ηλικίας ενηλίκων χωρίς ΜΔΣ [14,32]. Έτσι, μόνο η ανεύρεση σχετιζόμενων με τα ΜΔΣ σωματικών μεταλλάξεων δε θεωρείται διαγνωστική ΜΔΣ, ακόμη και σε ασθενείς με κυτταροπενία που δεν μπορεί να εξηγηθεί. Στην τρέχουσα ταξινόμηση των ΜΔΣ, μόνο η μετάλλαξη του *SF3B1* επηρεάζει την κατάταξη σε συγκεκριμένο υπότυπο ΜΔΣ, ως μέρος των διαγνωστικών κριτηρίων του ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες.

1.7 Πρόγνωση και προογνωστικοί παράγοντες

Οι υπότυποι των ΜΔΣ που περιλαμβάνονται στην τρέχουσα ταξινόμηση του WHO 2017 μπορούν να διακριθούν γενικά σε τρεις κατηγορίες κινδύνου με βάση την επιβίωση και την επίπτωση της εξέλιξης σε ΟΜΛ. Η ομάδα χαμηλού κινδύνου περιλαμβάνει τα ΜΔΣ με δυσπλασία μιας σειράς, τα ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και δυσπλασία μιας σειράς και τα ΜΔΣ με μεμονωμένη *del(5q)*. Η ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου περιλαμβάνει τα ΜΔΣ με δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών και τα ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών. Η ομάδα υψηλού κινδύνου αντιστοιχεί στα ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών.

Η σημασία των κυτταρογενετικών χαρακτηριστικών ως δεικτών πρόγνωσης στα ΜΔΣ κωδικοποιήθηκε από την ομάδα εργασίας ανάλυσης κινδύνου των ΜΔΣ το 1997 [4] και η αυτή η κατηγοριοποίηση του κυτταρογενετικού κινδύνου επικαιροποιήθηκε το 2012 [17].

Το αναθεωρημένο διεθνές προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης (Revised International Prognostic Scoring System – R- IPSS) περιλαμβάνει το ποσοστό των βλαστών του μυελού, την ομάδα κυτταρογενετικού κινδύνου με βάση το CCSS (Comprehensive Cytogenetic Scoring System) και το βαθμό της κυτταροπενίας σε κάθε σειρά για να προβλέψει την επιβίωση και τον κίνδυνο εξέλιξης σε ΟΜΛ [17]. Προκύπτουν έτσι πέντε ομάδες κινδύνου με βάση το IPSS-R: πολύ χαμηλού, χαμηλού, ενδιάμεσου, υψηλού και πολύ υψηλού [17]. Ένα άλλο προγνωστικό σύστημα για την πρόβλεψη της έκβασης των ΜΔΣ είναι το βασισμένο στην ταξινόμηση WHO προγνωστικό σύστημα βαθμονόμησης (WHO-classification based Prognostic Scoring System -WPSS) το οποίο ενσωματώνει επιλέον μεταβλητές όπως οι ανάγκες σε μεταγγίσεις και η μορφολογική δυσπλασία (μιάς ή πολλαπλών σειρών), οι οποίες δε συμπεριλαμβάνονται στο IPSS-R. Το WPSS μπορεί είναι εξαιρετικά χρήσιμο όταν εφαρμόζεται για περιπτώσεις χαμηλότερου κινδύνου και σε χρονικά σημεία μετά τη διάγνωση [7].

Όλο και περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι τόσο ο αριθμός όσο και το είδος των γονιδιακών μεταλλάξεων σχετίζονται στενά με την έκβαση των ΜΔΣ. Πολλά από τα συχνά μεταλλαγμένα γονίδια έχουν συσχετισθεί με τη δυσμενή πρόγνωση στα ΜΔΣ (*ASXL1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53*, *ZRSR2*, *STAG2*, *CBL*, *NRAS*, *BCOR*), ενώ η μετάλλαξη του *SF3B1* σχετίζεται με μια πιο ευνοϊκή πρόγνωση [29,30,33]. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορεί επίσης να σχετίζονται με την ανταπόκριση σε συγκεκριμένες θεραπείες. Για παράδειγμα οι μεταλλάξεις των *TET2* και *DNMT3A* φαίνεται να επηρεάζουν την απάντηση στη θεραπεία με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες [34] και η μετάλλαξη του *TP53* στα ΜΔΣ με *del(5q)* μπορεί να προβλέψει την πτωχότερη ανταπόκριση στη θεραπεία με λεναλιδομίδη [35]. Η μετάλλαξη *TP53* στα ΜΔΣ σχετίζεται με πολύ επιθετική νόσο και προβλέπει μικρότερη επιβίωση σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων [36,37]. Ευαίσθητες τεχνικές αλληλούχισης πρέπει ιδανικά να εφαρμόζονται στην ανάλυση των μεταλλάξεων των ΜΔΣ για την πρόγνωση, καθώς ακόμη και μικροί υποκλώνοι παρόντες στην αρχική διάγνωση μπορεί να παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε σχετικά γονίδια, όπως το *TP53*, και μπορεί αργότερα να εκπτυχθούν οδηγώντας σε ανθεκτικότητα στη θεραπεία [31].

1.8 Κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεση των ΜΔΣ

Η προέλευση των νεοπλασματικών κλώνων εντοπίζεται σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα που αποκτούν ξανά ικανότητα αυτοανανέωσης με αναστολή της διαφοροποίησης [38], επιβιώνουν παρά τη θεραπεία και εκπύσσονται κατά την υποτροπή εδραιώνοντας έτσι, όχι μόνο το νεοπλασματικό δυναμικό της νόσου, αλλά επιπρόσθετα τη χειρίστη πρόγνωση της σχετιζόμενης με ΜΔΣ οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ) [39].

Ένας αξιοσημείωτος αριθμός μεταβολών γενετικών, επιγενετικών, σχετιζόμενων με το μάτισμα, με τις cohesins και το μεταβολισμό έχουν ανιχνευθεί στα ΜΔΣ. Είναι, για παράδειγμα, ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι οι *DNMT3A* και *TET2* έχουν αντίθετη δράση στη μεθυλίωση του DNA, παρά την υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων απώλειας δράσης και στα δύο γονίδια. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι μεταβολές δεν είναι ειδικές για τα ΜΔΣ, καθώς οι ίδιες μεταλλάξεις ανιχνεύονται και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες [40,41]. Ωστόσο, υπάρχει σαφής διάκριση των φαινοτύπων, της κλινικής πορείας και της ανταπόκρισης στη θεραπεία μεταξύ των ΜΔΣ και των άλλων αιματολογικών κακοηθειών, υποδηλώνοντας τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ποικίλων

μεταλλάξεων, του γενετικού υποβάθρου και πιθανώς του μικροπεριβάλλοντος. Τα HSPCs των ασθενών με ΜΔΣ διατηρούν το δυναμικό διαφοροποίησης και συνεχίζουν να δίνουν γένεση σε παθολογικούς ώριμους πληθυσμούς κυττάρων που φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις με τα HSPCs. Όταν τα HSPCs των ΜΔΣ χάσουν την ικανότητα διαφοροποίησης και αποκτήσουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις, η νόσος μπορεί να εκτραπεί σε ΟΜΛ. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι όχι μόνο τα HSPCs, αλλά και τα κύτταρα σε πιο ώριμα στάδια διαφοροποίησης, όπως οι πληθυσμοί κυττάρων του ανοσοποιητικού, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πυροδότηση σύνθετων φαινοτύπων στα ΜΔΣ [42].

2.1 Θεραπεία

Η θεραπεία των ΜΔΣ εξαρτάται από τη βαρύτητα της νόσου. Για τα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ η υποστηρικτική αντιμετώπιση αποτελεί την κύρια θεραπευτική επιλογή και συμπεριλαμβάνει τη χρήση αυξητικών παραγόντων, μεταγγίσεις παραγώγων αίματος και αντιμετώπιση των λοιμώξεων με αντιβιοτική αγωγή [43]. Για τα υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, οι καθιερωμένες θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν υπομεθυλιωτικούς παράγοντες (5-αζακυτιδίνη, δεσιταβίνη), εντατική χημειοθεραπεία και ακόλουθη αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών, ενώ για τα χαμηλού κινδύνου μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα έχει δοκιμασθεί η χρήση ανοσοτροποποιητικών παραγόντων (λεναλιδομίδη) [44]. Νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις αφορούν σε αναστολείς των IDH1 (ivosidenib) και IDH2 (enasidenib), αναστολείς του TGFβ (luspatercept), αναστολείς του PD-1 (nivolumab) και του CTLA-4 (ipilimumab), αναστολείς του bcl-2 (venetoclax), αναστολείς των κυτταρικών μονοπατιών της PI3K και PLK (rigosertib) [45].

Κεφάλαιο 2: Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 – Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)

2.1. Δομή και φυσιολογική ρύθμιση

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (Hypoxia Inducible Factor - 1, HIF-1) είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας αποτελούμενος από μια σταθερά εκφραζόμενη β-υπομονάδα και μια α-υπομονάδα, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται από τα επίπεδα οξυγόνου. Οι πρωτεΐνες HIF-1α και HIF-1β περιέχουν μοτίβα έλικας-αγκύλης-έλικας (helix-loop-helix) που δεσμεύονται στο DNA και οδηγούν σε διμερισμό των υπομονάδων [46]. Φέρουν επίσης μια Per-ARNT-Sim περιοχή με παρόμοια λειτουργία. Στην α-υπομονάδα εντοπίζεται μια εξαρτώμενη από το οξυγόνο περιοχή αποδόμησης (oxygen-dependent degradation domain – ODD), η οποία υδροξυλιώνεται από υδροξυλάσες προλίνης -2 (proline- hydroxylase-2, PHD-2), καθιστώντας την α-υπομονάδα ευαίσθητη στην αποδόμηση από το πρωτεάσωμα υπό νορμοξικές συνθήκες [47].

Η υπομονάδα HIF-1α περιλαμβάνει επίσης δύο περιοχές συνενεργοποίησης (transactivation domains – TAD), οι οποίες ρυθμίζουν τα γονίδια στόχους του HIF-1. Η πρωτεΐνη σύνδεσης CREB (CBP) και η p300, δύο μεταγραφικοί συνενεργοποιητές του HIF-1, αλληλοεπιδρούν με την καρβοξυτελική περιοχή συνενεργοποίησης του HIF-1α (C-TAD).

Και οι δύο ενεργοποιητές είναι απαραίτητοι για την μεταγραφή του HIF-1 και είναι επομένως στόχοι ρύθμισης της έκφρασης του HIF-1. Η αναστολή της αλληλεπίδρασης HIF-1α C-TAD μέσω της υδροξυλίωσης προλίνης αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου του HIF-1 αποτρέποντας τη φυσιολογική μεταγραφή και μετάφραση [48]. Ο HIF-1β φέρει μόνο μια τέτοια ανάλογη περιοχή, η οποία δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του συμπλέγματος του HIF-1 [46,47,49]. Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι ο HIF-1β είναι πανομοιότυπος με μια προγενέστερα περιγεγραμμένη πρωτεΐνη των σπονδυλωτών, την ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) [49].

Υπό νορμοξικές συνθήκες ο HIF-1α αποδομείται στο πρωτεάσωμα. Η υπομονάδα HIF-1α σηματοδοτείται για αυτού του είδους την αποδόμηση από τις PHD-2 και από συμπλέγματα λιγκάσης ουβικιτίνης του von-Hippel-Lindau (VHL). Επομένως ο HIF-1 δε λειτουργεί παρουσία επαρκούς οξυγόνου [47,50]. Μια επιπλέον πρωτεΐνη που συμβάλλει στην απενεργοποίηση του HIF-1 υπό νορμοξικές συνθήκες είναι ο παράγοντας αναστολής του HIF (Factor Inhibiting HIF – FIH), ο οποίος υδροξυλιώνει τον HIF-1 αποτρέποντας την αλληλεπίδραση του με του συν-ενεργοποιητές p300 και CBP. Η έκφραση και η σταθεροποίηση του HIF-1 συμπλέγματος ρυθμίζεται μέσω παλίνδρομης αναστολής, καθώς η ίδια η PHD-2 ενεργοποιείται από τον HIF-1 [49].

Ωστόσο, σε υποξικές συνθήκες, η πρωτεΐνη του HIF-1 είναι σταθερή και ενεργή καθώς η υδροξυλάσες, οι πρωτεΐνες VHL και ο FIH αναστέλλονται από την έλλειψη οξυγόνου. Έτσι ο HIF-1 είναι ικανός να αλληλοεπιδρά με τους συνενεργοποιητές του και να διμερίζεται με τη σταθερά εκφραζόμενη β- υπομονάδα του. Μετά τη σταθεροποίηση, η πρωτεΐνη του HIF-1 μπορεί να δεσμεύεται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων, επάγοντας την έκφρασή τους [46,47,51]

2.2. Μη κανονικοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1α

Ανεξάρτητη από το οξυγόνο σταθεροποίηση του HIF-1α μέσω ρύθμισης της δράσης των PHDs από ογκομεταβολίτες

Η πρώτη ένδειξη ανεξάρτητης από το οξυγόνο ρύθμισης του HIF-1α *in vivo* βρέθηκε σε όγκους με μεταλλάξεις της αφυδρογονάσης του σουξινικού (succinate dehydrogenase – SDH) και της υδρατάσης του φουμαρικού [52]. Αργότερα φάνηκε ότι η αναστολή της SDH σταθεροποιεί τον HIF-1α στη νορμοξία, λόγω αυξημένων συγκεντρώσεων σουξινικού, το οποίο αποτελεί παραπροϊόν και αλλοστερικό αναστολέας της αντίδρασης PHD [53]. Το εύρημα αυτό έδωσε γένεση στην ιδέα των ογκομεταβολιτών, η οποία στην αρχή αφορούσε τη συσσώρευση κάποιων ενδιάμεσων του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (tricarboxylic acid, TCA), όπως το σουξινικό και το φουμαρικό [54,55], αλλά μπορεί πλέον να επεκταθεί σε οποιονδήποτε μεταβολίτη που μπορεί να πυροδοτήσει ογκογενετικά ή ογκοκατασταλτικά σήματα. Όσον αφορά στη ρύθμιση του HIF-1α, το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό έχει προταθεί να επάγουν την ψευδοϋποξία [56-58], ενώ το υπόστρωμα των PHD α-κετογλουταρικό (αKG), αλλά και οι συμπαραγόντες των PHD, ασκορβικό και Fe²⁺, φάνηκε να αποδίδουν μια δοσοεξααρτώμενη αποσταθεροποίηση του HIF-1α στην υποξία [59]. Για παράδειγμα το αKG αυξάνει τη συγγένεια των PHD για το οξυγόνο και επομένως προάγει την υδροξυλίωση του HIF-1α και την αποδόμησή του ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου [60]. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, η ψευδονορμοξία παρατηρείται σε κύτταρα με έλλειψη της τρανσυδρογενάσης του νικοτιναμιδο-νουκελοτιδίου ή με σοβαρή βλάβη του συμπλέγματος I, συνθήκες που οδηγούν σε συσσώρευση NADH και επακόλουθη αύξηση στο αKG, λόγω της επιβράδυνσης του ρυθμού του κύκλου TCA [61-63]. Αντίστροφα, η υπερέκφραση της μιτοχονδριακής αφυδρογονάσης 3 άλφα του ισοκιτρικού ελαττώνει τη συγκέντρωση του αKG και προωθεί τη σταθερότητα του HIF-1α [64]. Παρότι οι μηχανισμοί ισορροπίας των συγκεντρώσεων των ογκομεταβολιτών αναπαριστούν ενδιαφέροντες θεραπευτικούς στόχους, ο επιτυχής χειρισμός τους για την καταπολέμηση του καρκίνου απέχει ακόμη από το να τελειοποιηθεί, πιθανά λόγω της πολυπλοκότητας της διαμεσολαβούμενης από ογκομεταβολίτες ρύθμισης του HIF-1α. Για παράδειγμα, η επαγόμενη από την υποξία έκφραση του miR20 φάνηκε να συμβάλλει στη συσσώρευση σουξινικού, επάγοντας βλάβες του αναπνευστικού συμπλέγματος II [65]. Επιπλέον, αν και το (L)-2-υδροξυγλουταρικό προωθεί τη σταθεροποίηση του HIF-1α, οι γενετικές βλάβες που οδηγούν σε συσσώρευση του (R)-2-υδροξυγλουταρικού εναντιομερούς αντίθετα ενεργοποιούν τις PHDs [66].

Μη-κανονική εξαρτώμενη από το οξυγόνο ρύθμιση των PHDs από ανακατανομή του ενδοκυττάριου οξυγόνου μετά από οξειδο-αναγωγική βλάβη

Κατά την ανάπτυξη των συμπαγών όγκων, τα μεταμορφωμένα κύτταρα συνήθως ενεργοποιούν διαμεσολαβούμενες από τον HIF-1 προσαρμογές στο υποξικό στρες, που συμπεριλαμβάνουν προς τα κάτω ρύθμιση της μιτοχονδριακής αναπνοής για να ελαττώσουν τις απαιτήσεις σε οξυγόνο [65,67,68]. Ωστόσο, αρκετές μελέτες σε αλλομοσχεύματα και λίγα παραδείγματα ανθρώπινων όγκων, δείχνουν ότι η σοβαρή βλάβη της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης (oxidative phosphorylation, OXPHOS) επάγει μια σειρά από μεταβολικά και αντιογκογόνα γεγονότα που μεταξύ άλλων συμπεριλαμβάνουν την αποσταθεροποίηση του HIF-1α [62,69-72]. Η αντιογκογόνες συνέπειες της βλάβης της OXPHOS που οδηγούν σε αποσταθεροποίηση του HIF-1α έρχονται ως παράδοξο στο γνωστό ρόλο του HIF-1 να προάγει τη μιτοφαγία και να ρυθμίζει αρνητικά τα γονίδια της OXPHOS [65,67,68]. Οι Hagen και συνεργάτες

πρωτοπόρησαν στο να αναδείξουν ότι η ελαττωμένη κατανάλωση οξυγόνου, λόγω αναστολής της OXSPHOS σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, μπορεί να οδηγήσει σε ανακατανομή του ενδοκυττάριου οξυγόνου από τα αναπνευστικά ένζυμα στις PHDs, ώστε αυτές να μην μπορούν να αντιληφθούν την εξωκυττάρια υποξία [73,74]. Ως αποτέλεσμα, ο HIF-1α αποσταθεροποιείται στα κύτταρα με σοβαρή βλάβη της μιτοχονδριακής αναπνοής παρά το εξωτερικό υποξικό περιβάλλον. Η συσχέτιση μεταξύ της βλάβης της μιτοχονδριακής αναπνοής και της απενεργοποίησης του HIF-1α παρά την υποξία έχει παρατηρηθεί επίσης σε Rho zero κύτταρα και ποικίλους κυτταρικούς τύπους, στους οποίους τα OXPHOS συμπλέγματα I, III, IV ή V αναστέλλονταν φαρμακολογικά [75-77]. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω, με τη χρήση ενός φθορίζοντος δείκτη που γίνεται κορεσμένος στην υποξία, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα του συμπλέγματος I ροτενόνης ελαττώνουν την ενδοκυττάρια υποξία με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε κυτταρικές σειρές κυττάρων καρκίνου προστάτη [78]. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν σε αυτές τις μελέτες συνήθως αφορούσαν σε 3-6 ώρες καλλιέργειας σε 1-3% οξυγόνο. Από την άλλη πλευρά, οι μελέτες που εφάρμοσαν 0,1-1% συγκεντρώσεις οξυγόνου, ανέφεραν ότι ο HIF-1α σταθεροποιείται σε Rho zero καρκινικά κύτταρα ή μετά από χρήση ροτενόνης [79,80] και οι Gong και συνεργάτες έδειξαν ότι σε σχεδόν ανοξικές συνθήκες ο HIF-1α σταθεροποιείται παρά τη βλάβη της OXPHOS [81]. Επομένως, η βλάβη της OXPHOS δε φαίνεται να αποτρέπει μη αντιστρεπτά, αλλά μάλλον εξασθενεί τη σταθεροποίηση του HIF-1α, υποδηλώνοντας ότι οι αυξημένες ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις οξυγόνου, που προκαλούνται από την ελαττωμένη κατανάλωση οξυγόνου μπορεί να εξισορροπούνται με την εξωκυττάρια τάση οξυγόνου. Αυτή η εξισορρόπηση πιθανά βασίζεται στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης στο μοριακό οξυγόνο, η οποία μεταξύ άλλων επηρεάζεται από τα επίπεδα χοληστερόλης και επομένως από το μεταβολισμό των λιπιδίων που συνδυάζεται με την κατάσταση της OXPHOS [78].

Με βάση δεδομένα μοντέλων με ανεπάρκεια του συμπλέγματος I, έχει γίνει η υπόθεση ότι περισσότεροι του ενός παράγοντες εμπλέκονται στην αποσταθεροποίηση του HIF-1α στους όγκους με έλλειψη της OXPHOS, καθότι αν συγκριθούν με αντίστοιχους μάρτυρες, παρουσιάζουν όχι μόνο αυξημένες ενδοκυττάρια συγκεντρώσεις οξυγόνου αλλά επίσης υψηλότερα επίπεδα αKG [62,63] και συσώρευση σιδήρου, όλοι παράγοντες που είναι γνωστό ότι προάγουν τη διαμεσολαβούμενη από PHDs υδροξυλίωση του HIF-1α.

Η βλάβη της OXPHOS αποτελεί γνωστή πηγή ROS τα οποία έχει προταθεί ότι προάγουν τη σταθεροποίηση του HIF-1α στην υποξία και τη νορμοξία, παρότι ο ρόλος τους στη ρύθμιση του HIF-1α παραμένει αμφιλεγόμενος [82,83]. Οι Brunell και συνεργάτες πρότειναν ότι η αίσθηση του οξυγόνου στην OXPHOS δεν εξαρτάται από την κατανάλωση οξυγόνου σε ανθρώπινους ινοβλάστες, αλλά μάλλον στην παραγωγή ROS που προέρχεται από την ελαττωμένη δραστηριότητα των συμπλεγμάτων III και IV [84]. Από την άλλη πλευρά, από μελέτη σε καρκινικά κύτταρα, οι Chua και συνεργάτες αναφέρουν ότι η σταθεροποίηση του HIF-1α στην υποξία δεν εξαρτάται από τα ROS και ότι η επανεγκατάσταση της κατανάλωσης οξυγόνου σε κύτταρα με καταστολή του συμπλέγματος III είναι επαρκής για τη σταθεροποίηση του HIF-1α, πιθανά λόγω ελάττωσης του ενδοκυττάριου οξυγόνου [85]. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η βλάβη της OXPHOS που οδηγεί σε αύξηση των ROS έχει προταθεί ότι προάγει τη σταθεροποίηση του HIF-1α [82], ενώ η σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια που σχετίζεται με χαμηλή κατανάλωση NADH οδηγεί σε ψευδονορμοξία. Αυτά τα φαινομενικά αντίθετα αποτελέσματα μπορεί να εξηγηθούν από το γεγονός ότι ιδιαίτερα σοβαρή βλάβη

τουλάχιστον στο πλαίσιο συγκεκριμένων μεταλλάξεων του συμπλέγματος I [62] μπορεί να καταστρέψει σημεία παραγωγής ROS στα αναπνευστικά ένζυμα, οδηγώντας σε αμετάβλητες ή ακόμη και ελαττωμένες συγκεντρώσεις ROS. Στο πλαίσιο αυτό δεν αποτελεί έκπληξη ότι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), όχι ασυνήθεις τροποποιητές της ογκογένεσης, μπορεί να έχουν αντιθετικές συνέπειες στην πρόοδο του καρκίνου, ανάλογα με τον τύπο της βλάβης που επάγουν [62]. Για παράδειγμα οι μεταλλάξεις του mtDNA που αυξάνουν την παραγωγή ROS έχει προταθεί ότι προάγουν την ογκογένεση και τις μεταστάσεις, ενώ εκείνες που προκαλούν σοβαρή βλάβη, όπως η διαταραχή της συναρμολόγησης του συμπλέγματος I, προσβάλλουν την εξέλιξη του όγκου [62]. Συνολικά, οι επιδράσεις της ανεπάρκειας της OXPHOS στον HIF-1α εξαρτώνται από τον τύπο της βλάβης που έχει επαχθεί, πιθανά μέσω διαφορετικών μηχανισμών που εξαρτώνται από το μιτοχονδριακό αναπνευστικό σύμπλεγμα που εμπλέκεται. Ενώ η αρνητική ρύθμιση της μιτοχονδριακής αναπνοής από τον HIF-1 είναι σίγουρα ένας έγκυρος μηχανισμός προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων στις χαμηλές τάσεις οξυγόνου, η αναστολή της OXPHOS μπορεί να μην είναι σοβαρή, καθώς αυτό θα οδηγούσε σε αποσταθεροποίηση του HIF-1α. Το τελευταίο υποστηρίζεται από μελέτες όπως η εργασία του Hamanaka σε επιδερμικά κερατινοκύτταρα, όπου η διαγραφή του παράγοντα αντιγραφής και της μετάφρασης του mtDNA TFAM (Transcription Factor A, Mitochondrial) προκαλεί ελάττωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του HIF-1α, δείχνοντας ότι η αποσταθεροποίηση του HIF-1α σε κύτταρα με βλάβη της μιτοχονδριακής αναπνοής φαίνεται να είναι ένα γενικευμένο φαινόμενο [86].

Καθώς η σοβαρή βλάβη της OXPHOS φαίνεται να αποτρέπει τα καρκινικά κύτταρα από το να βιώνουν την υποξία, θα έπρεπε να εξαιρούνται από την ανάγκη να προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα με χαμηλό οξυγόνο. Ωστόσο, η ανάπτυξη όγκων με έλλειψη της OXPHOS αμφισβητείται, όπως φαίνεται από μοντέλα αλλομοσχεύματος με έλλειψη του συμπλέγματος I [62,69,71] και σε ασθενείς με ογκοκύττωμα, που αναπτύσσουν αργά μάζες, οι οποίες σπάνια εξελίσσονται σε κακοήθεια [71]. Από τη μια πλευρά αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη μεταβολική ανεπάρκεια, όπως η περιγεγραμμένη ανεπάρκεια στη σύνθεση νουκλεοτιδίων, που προκαλείται από έλλειψη ασπαρατικού μετά από αναστολή του συμπλέγματος I [87]. Ωστόσο, οι συνέπειες της έλλειψης του HIF-1α σε τέτοιους όγκους δεν μπορεί να παραβλεφθούν ειδικά υπό το φως μελετών που δείχνουν ότι η αναστολή του HIF-1α είναι επαρκής για να αποτρέπει την ανάπτυξη του όγκου [88,89]. Στο πλαίσιο αυτό είναι ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι σε συγκεκριμένους καρκίνους η υποξία μπορεί να αποτελεί πλεονέκτημα, καθώς τα σήματα επιβίωσης που προάγονται από τον HIF-1 μπορεί στην πραγματικότητα να είναι απαραίτητα για την κακοήθη πρόοδο.

Ανεξάρτητα από τις PHDs μονοπάτια ρύθμισης της σταθεροποίησης του HIF-1α

Ενώ οι PHDs ελέγχουν την εξαρτώμενη από το οξυγόνο σταθερότητα του HIF-1α, πολλές άλλες πρωτεΐνες αναδεικνύονται ως επιπρόσθετοι διαμεσολαβητές της ρύθμισης του HIF-1α, που δρουν με ανεξάρτητους από το οξυγόνο τρόπους, και επομένως ανεξάρτητα από την κατάσταση υδροξυλίωσης του HIF-1α. Για παράδειγμα, αρκετοί παράγοντες τροποποιούν τη δράση του pVHL, όπως η WD repeat και η SOCS box-containing protein 1 (WSB1), η οποία βρέθηκε να προωθεί τη σταθεροποίηση του HIF-1α και τις μεταστάσεις μέσω ουβικιτινίωσης και αποδόμησης του pVHL στο καρκίνο του νεφρού, του μαστού και το μελάνωμα [90]. Παρομοίως η ουβικιτίνη C-terminal υδρολάση-L1 έχει περιγραφεί να ακυρώνει τη διαμεσολαβούμενη από τον pVHL ουβικιτινίωση του HIF-1α σε μοντέλα ποντικών με πνευμονικές μεταστάσεις [91] και το c-Myc φάνηκε να εξασθενεί τη δέσμευση

του HIF-1α στο σύμπλεγμα pVHL, οδηγώντας τελικά σε νορμοξική σταθεροποίηση του HIF-1α σε κύτταρα καρκίνου μαστού [92]. Εκτός από τον pVHL, η E3 ουβικιτίνη-πρωτεΐνη λιγκάση MDM2 βρέθηκε επίσης να ουβικιτινιλιώνει τον HIF-1α, αλλά με τρόπο ανεξάρτητο από την υδροξυλίωση, προωθώντας την αποσταθεροποίησή του παρά την υποξική ατμόσφαιρα. Η διαμεσολαβούμενη από την MDM2 ανεξάρτητη από το οξυγόνο αποδόμηση του HIF-1α φαίνεται να συμβαίνει με τη δέσμευση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, όπως η Tap73 [93] ή η p53 [94]. Παρομοίως, έχει πρόσφατα δειχθεί ότι οι αναστολείς των PTEN (Phosphatase and tensin homolog) και κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) προωθούν την αποσταθεροποίηση του HIF-1α αποτρέποντας τη MDM2 φωσφορυλίωση και την ακόλουθη μετακίνηση στον πυρήνα, προτείνοντας ότι η κυτταροπλασματική MDM2 είναι ακολούθως ικανή να ουβικιτινιλιώσει τον HIF-1α και να προωθήσει την αποδόμηση του στην υποξία [95]. Επομένως, σε καρκίνους που φέρουν μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, όπως του TP53, η διαμεσολαβούμενη από την MDM2 αποδόμηση του HIF-1α μπορεί να ανασταλεί, οδηγώντας σε συνεργική επαγωγή της προόδου του καρκίνου μέσω παρεμπόδισης των p53 προαποπτωτικών ερεθισμάτων και ενεργοποίησης των μονοπατιών επιβίωσης που ρυθμίζονται θετικά από τον HIF-1α. Αντίστροφα, η ανεξάρτητη από την p53 δέσμευση της MDM2 στον HIF-1α σχετίστηκε με την αύξηση της πρωτεΐνης του HIF-1α [96], προειδοποιώντας ότι ο ρόλος της MDM2 στη ρύθμιση του HIF-1α μπορεί να είναι πιο ασαφής από ό,τι είχε αρχικά περιγραφεί. Επιπλέον παραδείγματα ανεξάρτητης από το οξυγόνο ρύθμισης του HIF-1α περιλαμβάνουν παράγοντες που μπορεί να λειτουργούν είτε προάγοντας της αποδόμηση του HIF-1α, όπως ο υποδοχέας της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης C (RACK1), ή προστατεύοντας από την pVHL-μεσολαβούμενη ουβικιτινιλίωση, όπως η Hsp90 ή η SENP1 (Sentrin/SUMO specific protease 1) [97-99]. Η αναστολή της Hsp90 προωθεί την πρωτεασωμικά-διαμεσολαβούμενη αποδόμηση του HIF-1α ακόμη και στην υποξία ή όταν ο λειτουργικός pVHL λείπει [100]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι οι ακτίνες γάμα ενεργοποιούν την εξαρτώμενη από τον mTOR σύνθεση της Hsp90 οδηγώντας σε σταθεροποίηση του HIF-1α και ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία των κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα [98](64). Ο μηχανισμός του ανταγωνισμού RACK1/Hsp90 στην αύξηση/ελάττωση της σύνδεσης HIF-1α-pVHL έχει περιγραφεί [101], αλλά είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μεταξύ άλλων το ασβέστιο μπορεί να επηρεάζει τη δραστηριότητα του RACK1. Για παράδειγμα, η ενεργοποιούμενη από το ασβέστο φωσφατάση καλσινευρίνη απέτρεπε το διμερισμό του RACK1 και την επακόλουθη αποδόμηση του HIF-1α σε κύτταρα Hek293 και νεφρικού καρκίνου RCC4 [102]. Άλλες μελέτες αναφέρουν επίσης ένα ρόλο για το ασβέστιο στη ρύθμιση του HIF-1α [103,104], υποδηλώνοντας ότι ο HIF-1α δεν είναι μόνο ένας αισθητήρας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών αλλά μπορεί επίσης να προωθεί απαντήσεις προσαρμογής σε αλλαγές της κυτταρικής ομοιόστασης ασβεστίου. Είναι πιθανό λόγω των πλειοτροπικών του δράσεων που εντοπίζουμε τόσο περίπλοκες και πολυεπίπεδες ρυθμίσεις του HIF-1α όπως πιστοποιείται από τις πολλαπλές μετα-μεταφραστικές του τροποποιήσεις [105,106]. Πρόσφατα η SET7/9-διαμεσολαβούμενη μεθυλίωση της λυσίνης 32 του HIF-1α βρέθηκε να αποσταθεροποιεί τον HIF-1α και να προωθεί την πρωτεασωμική του αποδόμηση ακόμη και στην υποξία [107]. Αυτή η αντίδραση έρχεται σε αντίθεση με τη LDS1-διαμεσολαβούμενη απομεθυλίωση που σταθεροποιεί τον HIF-1α, προστατεύοντάς τον από την ουβικιτινιλίωση [107]. Επιπλέον, η αποακετυλίωση του HIF-1α στη λυσίνη 709 από τη SIRT2 αυξάνει την αναγνώριση των καταλοίπων που υδροξυλιώνονται από την PHD, προωθώντας την ψευδονομοξία [108]. Είναι ενδιαφέρον ότι εκτός από την πρωτεασωμική

αποδόμηση ο μηχανισμός της λυσοσωμικής πέψης του HIF-1α έχει επίσης περιγραφεί. Συγκεκριμένα ο HIF-1α βρέθηκε να αλληλοεπιδρά και να συνεντοπίζεται με τη σχετιζόμενη με το λυσόσωμα μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 2A σε ανθρώπινα HK2 νεφρικά και RCC4 κύτταρα καρκίνου νεφρού [109]. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η λυσοσωμική αποδόμηση του HIF-1α είναι βραδύτερη και λιγότερο εκσεσημασμένη σε σχέση με την πρωτεασωμική του αποδόμηση, αλλά πρότειναν ότι μπορεί να γίνει πιο σημαντική σε καταστάσεις όπου το μονοπάτι του pVHL δε λειτουργεί. Μετέπειτα, φάνηκε ότι η λυσοσωμική αποδόμηση του HIF-1α διαμεσολαβείται από την HSC70 (heat shock cognate 70kDa protein) μέσω αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από chaperone, η οποία στοχεύει ειδικά ξεχωριστές πρωτεΐνες [110].

Ρύθμιση του HIF-1α σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο

Εκτός από τη ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης του, ο HIF-1α μπορεί επίσης να ρυθμίζεται με ένα πιο συμβατικό τρόπο, μέσω της μεταγραφής του mRNA και της πρωτεϊνικής σύνθεσης, σε απάντηση όχι μόνο στην υποξία, αλλά και στη διέγερση από αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ορμόνες, θερμικό σοκ, ακτινοβολία και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Στο πλαίσιο αυτό τρία κύρια μονοπάτια σχετιζόμενα με την επιβίωση του κυττάρου, τα Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK)/Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) και Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) οδηγούν σε αύξηση της μεταγραφής και της μετάφρασης του *HIF1A* κυρίως στον καρκίνο [111]. Η σηματοδότηση της MAPK μέσω των ERK1/2 έχει σχετισθεί κυρίως με τη ρύθμιση της συννεργοποίησης του HIF-1 μέσω φωσφορυλίωσης των συμπαραγόντων p300/CPB. Από την άλλη πλευρά, το μονοπάτι JAK/STAT επάγει τη διαμεσολαβούμενη από την Akt μεταγραφή του *HIF1A* μέσω του STAT3 [112]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR αυξάνει άμεσα τη μετάφραση και μεταγραφή του *HIF1A* [113]. Επομένως μια παθολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού, η οποία στον καρκίνο επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες ή μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, οδηγεί σε ενεργοποίηση του HIF-1α, ακόμη και σε νορμοξικές συνθήκες [114,115]. Κατά τον ίδιο τρόπο, η αυξημένη παραγωγή ROS λόγω ανεπάρκειας της OXPHOS [51] και άλλων συνθηκών που οδηγούν σε αυξημένα ROS, μεταξύ των οποίων οι μεταλλάξεις του mtDNA [116], χημικοί τοξικοί παράγοντες [117], διαλείπουσα υποξία [118] και η έκθεση σε προφλεγμονώδεις παράγοντες [119], έχουν συσχετισθεί με διαμεσολαβούμενη από το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR αύξηση της μετάφρασης και της μεταγραφής του *HIF1A*. Επιπρόσθετα το μονοπάτι της Akt επάγει τη διαμεσολαβούμενη από τον HIF-1α απάντηση μέσω σταθεροποίησης και συννεργοποίησης ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου [120]. Για παράδειγμα το μονοπάτι ERK-PI3K/Akt διαμεσολαβεί στη ρύθμιση των επιπέδων του HIF-1α επάγοντας την πρωτεϊνική σύνθεση του μοριακού συνοδού Hsp90, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να σταθεροποιεί τον HIF-1α με τρόπο ανεξάρτητο από το οξυγόνο [100].

Τη διαμεσολαβούμενη από το PI3K/Akt ενεργοποίηση του mTOR ανταγωνίζεται η 5-adenosine monophosphate kinase (AMPK), ο κύριος αισθητήρας του φορτίου της κυτταρικής ενέργειας [121]. Στην περίπτωση ενός αναπτυσσόμενου καρκινικού κυττάρου, το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό όταν οι συνθήκες είναι γόνιμες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η AMPK λειτουργεί σαν αισθητήρας έλλειψης θρεπτικών συστατικών και εξασφαλίζει τη βελτιστοποίηση των ενεργειακών πηγών όταν το καρκινικό κύτταρο χρειάζεται να εξοικονομήσει ενέργεια.

Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι η AMPK μπορεί να εξισορροπεί τα αποτελέσματα της διαμεσολαβούμενης από την Akt αύξησης της HIF-1α σηματοδότησης. Πράγματι μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της ενεργού AMPK και του HIF-1α επιβεβαιώθηκε πρόσφατα [122], ενώ σε συμφωνία με αυτό έρχονται *in vitro* μελέτες που δείχνουν αποσταθεροποίηση του HIF-1α υπό συνθήκες στέρησης γλυκόζης, προτείνοντας ότι η απουσία θρεπτικών συστατικών ελαττώνει τη μετάφραση του HIF-1α [123]. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της AMPK και του HIF-1α παραμένει ασαφής. Από τη μια πλευρά, η απουσία AMPK σε ινοβλάστες εμβρύων ποντικών (mouse embryo fibroblasts, MEF) επάγει την έκφραση του HIF-1α στη νορμοξία [124,125] και η ενεργοποίηση του mTORC1 και η αυξημένη παραγωγή ROS θεωρούνται υπεύθυνες για την νορμοξική σταθεροποίηση του HIF-1α σε MEFs με μη λειτουργική AMPK [125,126]. Από την άλλη πλευρά, αναφέρεται ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση της AMPK οδηγώντας σε ελάττωση της αποδόμησης του HIF-1α [127] και η ενεργός AMPK έχει φανεί ότι επάγει τη διαμεσολαβούμενη από ROS αύξηση του HIF-1α [128]. Φαίνεται ότι η ρύθμιση του HIF-1α από την AMPK μπορεί να εξαρτάται από τη φάση της προόδου του όγκου, αν λάβουμε υπόψιν το διπλό ρόλο αυτού του αισθητήρα ενέργειας [129].

2.3 Ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου από τον HIF-1

Ο HIF-1 είναι βασικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου στα κύτταρα. Ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση δεκάδων γονιδίων που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιόστασης καθώς οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου μεταβάλλονται [130]. Ο HIF-1 διαμεσολαβεί επιπρόσθετα της κυτταρικές απαντήσεις στην υποξία ρυθμίζοντας την πρόσληψη γλυκόζης και την αναερόβια αναπνοή σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου [131,132].

2.3.1. Η μεταγραφική ρύθμιση ελέγχει την αγγειογένεση στην υποξία

Μια σημαντική δράση του HIF-1 είναι η προώθηση της αγγειογένεσης. Ο HIF-1 κατευθύνει τη μετανάστευση των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων προς το υποξικό περιβάλλον [131,132]. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μεταγραφής του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor - VEGF). Ο VEGF αποτελεί βασικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης, προωθώντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε υποξικές περιοχές. Σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-1 δεσμεύεται στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου του VEGF, επάγοντας τη μεταγραφή και την έναρξη της έκφρασής του [49,133]. Τα ενδοθηλιακά αυτά κύτταρα οδηγούν τελικά στο σχηματισμό νέων αγγείων, παρέχοντας στη δεδομένη περιοχή με οξυγονωμένο αίμα [134].

2.3.2. Ο HIF-1 ρυθμίζει την αλλαγή προς τον αναερόβιο μεταβολισμό

Ο HIF-1 μπορεί επίσης να ρυθμίζει τον αναερόβιο μεταβολισμό. Όταν υπάρχει διαθεσιμότητα οξυγόνου τα περισσότερα κύτταρα παράγουν ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Ωστόσο, σε υποξικά περιβάλλοντα, υπάρχει στροφή προς τον αναερόβιο μεταβολισμό για την κυτταρική παραγωγή ενέργειας. Ο HIF-1 είναι μεταξύ των βασικών γονιδίων που ρυθμίζουν αυτή τη στροφή, επάγοντας μια ποικιλία γλυκολυτικών ενζύμων και μεταφορέων γλυκόζης, όπως η αλδολάση Α και η κινάση Μ του πυροσταφυλικού οξέος, υποστηρίζοντας τα κύτταρα να παράγουν ενέργεια σε συνθήκες υποξίας [131,133]. Πέρα από την επαγωγή της έκφρασης αυτών των ενζύμων, ο HIF-1 ελαττώνει τη

μιτοχονδριακή κατανάλωση οξυγόνου ενεργοποιώντας την κινάση I της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού και αναστέλλοντας την πρόοδο του κύκλου του κιτρικού οξέος [68].

2.4 Νεοπλασία, φλεγμονή και υποξία

Το περιβάλλον των μεταστατικών όγκων είναι συνήθως υποξικό, με τον HIF-1 να αποτελεί μια σημαντική πρωτεΐνη στους όγκους αυτούς. Καθιστά δυνατή την ανάπτυξη του όγκου επάγοντας εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια στα καρκινικά κύτταρα.

2.4.1 Ανάπτυξη του όγκου

Δεδομένου του ρόλου του στην υποξία ο HIF-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νεοπλασίας [135]. Κατά την ανάπτυξη του όγκου, δημιουργείται υποξικό περιβάλλον λόγω των αυξημένων απαιτήσεων σε ενέργεια των πολλών και ταχέως διαιρούμενων κυττάρων. Η αγγειογένεση επάγεται σε τέτοιες κυτταρικές μάζες προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες τους για αυξημένο οξυγόνο, ενέργεια και παροχή αίματος [131,133]. Παράλληλα, ο HIF-1 συμβάλλει στη στροφή προς τον αναερόβιο μεταβολισμό. Η σπουδαιότητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων αντιστακλάται στην παρατήρηση ότι τα επίπεδα του HIF-1α στα κύτταρα γλοιώματος αυξάνονται ανάλογα με την επιθετικότητα του όγκου [136].

Οι διαμεσολαβούμενοι από το HIF-1 μηχανισμοί επιβίωσης των όγκων έχουν μερικώς αποσαφηνισθεί από τα πειράματα των Zhang και συν. σε κύτταρα νεφρικού καρκινώματος με έλλειψη του VHL. Ο HIF-1 βρέθηκε να ελαττώνει την κατανάλωση οξυγόνου σε αυτά τα κύτταρα αναστέλλοντας το C-MYC, έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μάζα και την κατανάλωση οξυγόνου και είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται αρνητικά σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων. Οι Zhang και συν. αναφέρουν ότι ο HIF-1 ελαττώνει τα επίπεδα του C-MYC αυξάνοντας τη μεταγραφή του MXI1, ενός ανασταλτή του C-MYC, και αυξάνοντας το ρυθμό αποδόμησης στο πρωτεάσωμα της πρωτεΐνης του C-MYC. Τα ελαττωμένα επίπεδα του C-MYC σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται εν τέλει να οδηγούν σε αυξημένη γλυκόλυση και ελαττωμένη μιτοχονδριακή αναπνοή, βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται στις υποξικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου [137].

2.4.2 Η υπερέκφραση του HIF-1 προκαλεί απόπτωση

Πληθώρα μελετών διερευνούν το ρόλο του HIF-1 στην επαγόμενη από την υποξία απόπτωση διάφορων κυτταρικών τύπων. Για παράδειγμα οι Krick και συν. αναφέρουν ότι η υπερέκφραση του HIF-1 σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση [138]. Παρότι τα ακριβή μονοπάτια και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή παραμένουν ασαφή, δεδομένα προτείνουν ότι σε υποξικές συνθήκες το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ενεργοποιείται. Μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη του HIF-1, το p53 σταθεροποιείται και ξεκινά να ενεργοποιεί γονίδια όπως το p21, το οποίο στη συνέχεια προκαλεί κυτταρικό θάνατο [131,138].

2.4.3 HIF-1 και φλεγμονώδεις απαντήσεις

Εκτός από το ρόλο του στην προσαρμογή στην υποξία, ο HIF-1 φαίνεται να παίζει ρόλο στη φλεγμονή. Οι Cramer και συν. έδειξαν ότι ο HIF-1 είναι απαραίτητος για το μεταβολισμό των μυελικών κυττάρων [139]. Η υπερέκφραση του HIF-1 *in vivo* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τοπικής φλεγμονής, ενώ η απώλεια του γονιδίου του HIF-1 ελάττωνε την ικανότητα των μυελικών κυττάρων να συσσωρεύονται, να μεταναστεύουν

και να προωθούν τις απαντήσεις έναντι των βακτηριών. Αυτή η εξάρτηση των μυελικών κυττάρων από τον HIF-1 μπορεί να σχετίζεται με τη στήριξη τους στην αερόβια αναπνοή ως μέσο παραγωγής ενέργειας. Τα μυελικά κύτταρα με έλλειψη του γονιδίου δεν μπορούν να παράγουν επαρκώς ATP, να μεταναστεύσουν στους προσβεβλημένους ιστούς ή να καταστρέψουν ξένους εισβολείς [139]. Επιπρόσθετα, η έκφραση του HIF-1α παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση των μυελικών κυττάρων σε μονοκύτταρα και μακροφάγα [140].

Από την άλλη ο HIF-1 μπορεί να λειτουργήσει για να αποτρέψει την ιστική και την καρδιακή καταστροφή που προκαλείται από την ισχαιμία. Η υπερέκφραση του HIF-1 στους ιστούς αυτούς μπορεί να οδηγήσει σε αγγειογένεση και αύξηση της οξυγόνωσης στις περιοχές αυτές [141,142].

Κεφάλαιο 3: Ο ρόλος του HIF-1 στην αιμοποίηση

3.1 Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells – HSCs)

Το μοναδικό και καθοριστικό χαρακτηριστικό των αρχέγονων κυττάρων είναι η ικανότητά τους για αυτοανανέωση και πολυδύναμη διαφοροποίηση, το οποίο τα καθιστά ικανά να διατηρούν την ομοιότητα των ιστών καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Πολλαπλές μελέτες έχουν οδηγήσει στη διατύπωση ότι ειδικά μεταβολικά χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της αυτοανανέωσης και την ικανότητα πολυδύναμης διαφοροποίησης. Καθώς τα αρχέγονα κύτταρα διατηρούνται στον οργανισμό για μεγάλες περιόδους οφείλουν να προστατεύονται από μια ποικιλία φυσιολογικών καταστάσεων στρες. Ο τρόπος με τον οποίο τα αρχέγονα κύτταρα αποφεύγουν και επιβιώνουν ή καταστρέφονται από τα στρεσογόνα ερεθίσματα αποτελεί ένα βασικό ερώτημα της βιολογίας του αρχέγονου κυττάρου και της γήρανσης.

Το αιμοποιητικό σύστημα αποτελείται από αρχέγονα κύτταρα (stem cells), παροδικά πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα (progenitor cells) και ώριμα διαφοροποιημένα κύτταρα. Αυτό το αξιοθαύμαστο σύστημα δίνει γένεση σε 2×10^{11} ερυθροκύτταρα την ημέρα ή σε πάνω από 5×10^{15} ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου. Αυτή η μακροπρόθεσμη κυτταρική παραγωγή εξαρτάται από την παρουσία αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells – HSCs) που μπορούν να δώσουν γένεση σε επιπρόσθετα αρχέγονα κύτταρα (με ικανότητα αυτοανανέωσης) και σε προγονικά κύτταρα (με ικανότητα διαφοροποίησης).

3.1.1 HSCs σε ηρεμία και σε ενεργό κυτταρικό κύκλο

Μέσω της απομόνωσης των HSCs που βασίζεται σε δείκτες επιφανείας, έχει καταστεί σαφές ότι η κατάσταση του κυτταρικού κύκλου είναι σημαντική για τη λειτουργία των HSCs. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ταξινομούνται συμβατικά είτε ως αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, είτε ως αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ενεργού κυτταρικού κύκλου. Η ηρεμία θεωρείται γενικά ως μηχανισμός αποφυγής συσσώρευσης βλαβών που είναι αποτέλεσμα του φυσιολογικού στρες. Τα HSCs και τα προγονικά κύτταρα συμπεριλαμβάνονται στον ετερογενή πληθυσμό Lineage-marker, Sca-1⁺, c-Kit⁺ (LSK) κυττάρων. Μεταξύ των κυττάρων αυτών ο πληθυσμός CD34⁺, CD150^{high} αποτελείται από κύτταρα με αργό ρυθμό κυτταρικού κύκλου [143-145].

Κλασικές αναλύσεις υψηλής καθαρότητας HSCs δείχνουν ότι περισσότερο από το 70% των CD34⁺, CD48⁻, CD150^{high} LSK HSCs βρίσκονται στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ λιγότερο από το 10% των περισσότερο διαφοροποιημένων πολυδύναμων προγονικών κυττάρων (CD34⁺ LSK) βρίσκονται σε ηρεμία [146]. Διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα δείχνουν ότι ο CD34⁺, CD48⁻, CD150^{high} LSK HSC πληθυσμός πιθανότατα αποτελείται τόσο από ένα αδρανές πληθυσμό (30%) που διαιρείται κάθε 145-193 ημέρες και ένα ομοιοστατικό πληθυσμό (70% - παλαιότερα γνωστό ως ενεργοποιημένα HSC), που διαιρείται κάθε 28-36 μέρες [146].

Γενικά τα HSCs με βραδύ ρυθμό κυτταρικού κύκλου διαθέτουν μακροπρόθεσμη (long term -LT) ικανότητα επανεγκατάστασης αιμοποίησης όταν μεταμοσχεύονται σε θανατηφόρα ακτινοβολημένα ποντίκια, ενώ τα αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται σε ενεργό κυτταρικό

κύκλο καθώς και τα προγονικά κύτταρα διατηρούν την αιμοποίηση για 3-4 μήνες. Έτσι τα πρώτα ονομάζονται LT-HSCs και τα τελευταία ST (short term) - HSCs. Τα LT-HSCs παράγουν ST-HSCs που τελικά δίνουν γένεση σε πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, δεσμευμένα προγονικά κύτταρα και τελικά διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα που συσσωρεύουν γενετικά ή επιγενετικά λάθη μπορεί να περιοριστούν μέσω σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Τα LT-HSCs αυτοπροστατεύονται από τη βλάβη στο DNA μέσω περιορισμού της συχνότητας του κυτταρικού κύκλου, αλλά κάποια βλάβη εξακολουθεί να συσσωρεύεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς η διάρκεια ζωής τους είναι εξαιρετικά μεγάλη. Τα αρχέγονα κύτταρα με χαμηλό ρυθμό κυτταρικού κύκλου είναι πιο ανθεκτικά σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, η υπερώδης ακτινοβολία και τα χημικά, όταν συγκρίνονται με κύτταρα σε ενεργό κυτταρικό κύκλο, καθώς οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στις φάσεις S ή M του κυτταρικού κύκλου. Διακριτές απαντήσεις στη βλάβη του DNA (DNA damage responses - DDRs) και μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA, οι οποίοι καθιστούν τα αρχέγονα κύτταρα ανθεκτικά στο στρες, έχουν περιγραφεί [147]. Θραύσεις στη διπλή έλικα του DNA (double strand breaks -DSBs) που συμβαίνουν στη φάση G0 των HSCs επιδιορθώνονται άμεσα μέσω μη ομόλογης σύνδεσης άκρων, η οποία είναι πιο ευάλωτη στα λάθη σε σχέση με τον ομόλογο ανασυνδυασμό [148]. Αυτή η ευάλωτη στα λάθη επιδιόρθωση μπορεί να συμβάλει στη γήρανση, την απόπτωση και τη λευχαιμική εκτροπή των HSCs [149,150].

3.2 Το υποξικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών

Το 1987 διατυπώθηκε για πρώτη φορά ότι η αιμοποιητική φωλιά των HSCs είναι υποξική και ότι υπάρχει μια διαβάθμιση της τάσης του οξυγόνου εντός του ΜΟ που σχετίζεται με το βαθμό της ωρίμανσης των κυττάρων, με τα HSCs να εντοπίζονται στο χαμηλότερο άκρο αυτής της διαβάθμισης [151]. Αυτή η πρόταση παρέμενε υποθετική για αρκετό καιρό, αλλά ακολούθως πολλές μελέτες πρότειναν ότι τα LT-HSCs εντοπίζονται κυρίως στην ενδοστική ζώνη του μυελού των οστών [152-154]. Η περιοχή αυτή έχει μοναδική οργάνωση αγγείων. Οι τροφικές αρτηρίες διαπερνούν τον οστικό φλοιό και εισέρχονται στο μυελικό κανάλι προχωρώντας με ένα σπειροειδή τρόπο στη περιοχή της μετάφυσης. Τα αρτηρίδια που προέρχονται από τις μικρότερες αρτηρίες υποδιαιρούνται περαιτέρω σε αρτηριακά τριχοειδή. Το αίμα στα τριχοειδή αυτά παροχετεύεται σε κολποειδή με χαλαρή οργάνωση και παρουσία διόδων που κάνουν πιο εύκολο στα αιμοποιητικά κύτταρα να διέρχονται δια μέσου αυτών. Ως αποτέλεσμα η παροχή στο μυελό των οστών (ΜΟ) είναι περιορισμένη και η μερική πίεση του οξυγόνου (PO₂) στην ενδοστική περιοχή είναι πολύ χαμηλή. Εκτός από τη χαμηλή παροχή οξυγόνου, ο ΜΟ είναι «πυκνοκατοικημένος» από αιμοποιητικά κύτταρα και παράλληλα η κατανάλωση του οξυγόνου από τα αιμοποιητικά κύτταρα είναι σχετικά υψηλή. Οι Chow και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ένα μαθηματικό μοντέλο προσομοίωσης της διάχυσης O₂ στο ΜΟ για να προτείνουν ότι η πλειονότητα των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων διαβιώνει σε περιοχές με πολύ χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στο ΜΟ, με την PO₂ ελαττώνεται κατά 10 φορές σε απόσταση μερικών κυττάρων από το πλησιέστερο τριχοειδές [155]. Μελέτη σε δείγματα αναρρόφησης ΜΟ από υγιείς εθελοντές ανέδειξε ότι η μέση PO₂ στο ΜΟ είναι περίπου 55mmHg και ο μέσος κορεσμός O₂ 87,5%, τιμές σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στο περιφερικό αίμα [156].

Ωστόσο αυτοί οι τύποι των μετρήσεων εκτιμούν αδρά τα επίπεδα οξυγόνου στο ΜΟ συνολικά και δε λαμβάνουν υπόψιν ότι διαφορετικές υποπεριοχές του ΜΟ μπορεί να

διαφέρουν σε συγκεντρώσεις οξυγόνου. Επιπρόσθετες πληροφορίες έχουν προκύψει από τη μελέτη των Levesque και συνεργατών που χρησιμοποίησαν *in situ* τη χρώση pimonidazole σε τομές ΜΟ ποντικών. Το pimonidazole εγχέεται στα ποντίκια πριν από τη θανάτωσή τους και σε περιοχές που η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλότερα από 10mmHg, η χημική αυτή ένωση αντιδρά και σχηματίζει σταθερούς επιτόπους που μπορούν εν συνεχεία να ανιχνευθούν. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι περιοχές εντός του ΜΟ που ήταν περισσότερο θετικές για το pimonidazole ήταν οι ενδοστικές περιοχές. Μετά τη χορήγηση G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), οι θετικές για το pimonidazole περιοχές επεκτείνονταν προς τις κεντρικές περιοχές του ΜΟ, καταδεικνύοντας ότι η υποξία εμπλέκεται στη ρύθμιση της απάντησης κινητοποίησης [157]. Μια άλλη μελέτη που χρησιμοποίησε το pimonidazole έδειξε αντίθετα ότι τα κύτταρα που ήταν ισχυρά θετικά για το pimonidazole εντοπίζονταν στις τριχοειδικές περιοχές [158]. Με ανάλυση σε κυτταρομετρία ροής οι Parmar και συνεργατών έδειξαν ότι η χρώση του pimonidazole σχετιζόταν με το φαινότυπο του γειτονικού των HSCs κυτταρικού πληθυσμού [159]. Στην ίδια μελέτη φάνηκε επίσης ότι υποπληθυσμοί του ΜΟ που δεν είχαν καλή παροχή οξυγόνου περιείχαν μεγαλύτερη δραστηριότητα HSCs όπως εκτιμήθηκε με πειραματικά μοντέλα μεταμόσχευσης. Αυτό φάνηκε εγχέοντας σε ποντίκια τη χρωστική Hoescht33342 πριν τη συλλογή του μυελού και τη λειτουργική εκτίμηση. Θεωρητικά η χρωστική κατανέμεται στους ιστούς με βάση το επίπεδο της παροχής αίματος και επομένως προσομοιάζει στην κατανομή του οξυγόνου [159]. Η ίδια προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε σε μια μελέτη που συνδύαζε τη φαινοτυπική χρώση για τα HSCs και διάχυση της Hoescht33342 ακολουθούμενη από λειτουργική εκτίμηση. Εδώ φάνηκε ότι τα LT-HSCs, όπως καθορίζονται από τον LSK, CD150⁺, CD41⁻, CD48⁻ φαινότυπο επιφανείας, διαχωρίζονται σε δύο διακριτές λειτουργικές ομάδες με βάση τη χρώση Hoescht33342. Τα καθαρά HSCs με τη χαμηλότερη πρόσληψη Hoescht33342 παρουσίαζαν υψηλότερο δυναμικό επανεγκατάστασης αιμοποίησης σε σειριακές μεταμοσχεύσεις, σε σύγκριση με τα φαινοτυπικά ίδια HSCs με υψηλότερη πρόσληψη Hoescht33342 [160]. Με έναν παρόμοιο τρόπο, διαχωρίζοντας τα κύτταρα του ΜΟ με βάση τα επίπεδα ROS φάνηκε ότι οι πληθυσμοί με χαμηλότερα επίπεδα ROS έχουν υψηλότερο δυναμικό επανεγκατάστασης αιμοποίησης *in vivo* [161]. Η μελέτη αυτή υπέθεσε ότι οι συγκεντρώσεις οξυγόνου και τα επίπεδα ROS σχετίζονται, καθώς τα ROS σχηματίζονται ως αποτέλεσμα αντιδράσεων εξαρτώμενων από το οξυγόνο. Επιπλέον οι Simsek και συν. και οι Takubo και συν. έδειξαν ότι τα LT-HSCs είναι θετικά για το pimonidazole *in vivo* [162,163]. Επιπλέον, ανθρώπινα ομφαλικά HSCs που μεταμοσχεύθηκαν σε υπερ-ανοσοκατεσταλμένα NOD/scid/IL-2Rγ (NOG) ποντίκια αποκτούσαν ξανά υποξικό στάτους και ηρεμία κυτταρικού κύκλου μετά τη μεταμόσχευση [164].

Έτσι τα ευρήματα αυτά οδηγούν συνολικά σε ένα μοντέλο όπου ο υποξικός χαρακτήρας των LT-HSCs καθορίζεται από τη θέση τους στο ΜΟ. Ωστόσο σε αντίθεση με το απλό μοντέλο διαβάθμισης O₂ για την υποξική φωλιά του ΜΟ, η διδιάστατη παρατήρηση τμημάτων ΜΟ αναδεικνύει ότι το 60% των LT-HSCs ανευρίσκεται κοντά σε αγγεία [144,165]. Σε πρώτη εκτίμηση, η παρατήρηση αυτή δε φαίνεται να συνάδει με τον υποξικό χαρακτήρα των HSCs. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα τριχοειδή στην ενδοστική περιοχή χαρακτηρίζονται από χαμηλή παροχή στον ΜΟ. Επιπρόσθετα, ο η τριδιάστατη στην πάροδο του χρόνου ανίχνευση μεμονωμένων LT-HSCs παρέχει πληροφορίες που μπορεί να λύσουν αυτό το εμφανώς παράδοξο. Απεικόνιση πραγματικού χρόνου ΜΟ ποντικών αποκάλυψε ότι τα HSCs σταδιακά απομακρύνονται από τα αγγεία και ακολούθως μετακινούνται στην οστεοβλαστική περιοχή του ΜΟ μετά τη μεταμόσχευση

[166,167]. Έτσι είναι πιθανό ότι υποπληθυσμοί των HSCs εντοπίζονται σε διαφορετικές διακριτές περιοχές και βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου ή/και σε διαφορετική μεταβολική κατάσταση.

Σε συμφωνία με την ιδέα της υποξικής αιμοποιητικής φωλιάς *in vivo*, η ανάλυση HSCs σε καλλιέργεια υποδηλώνει επίσης ότι η λειτουργία τους διατηρείται πιο αποτελεσματικά σε υποξικές συνθήκες. Είναι αποδεδειγμένο ότι η ικανότητα σχηματισμού αποικιών ή η ικανότητα εγκατάστασης αιμοποίησης μετά από μεταμόσχευση αυξάνεται όταν τα κύτταρα του MO καλλιεργούνται σε υποξικές συνθήκες [168-170]. Η υποξία επάγει την ηρεμία σε καλλιεργούμενα αιμοποιητικά κύτταρα [164,171]. Σε ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, τα LT-HSCs που βρίσκονται σε ηρεμία αποτελούν έναν παράπλευρο πληθυσμό, ο οποίος καθορίζεται από την υψηλή εισχώρηση της χρώσης DNA Hoechst 33342 [145]. Η υποξία διατηρεί επίσης αυτόν το φαινότυπο σε καλλιέργειες HSCs [172].

3.3 Ο μηχανισμός ανταπόκρισης των HSCs στην υποξία και ο ρόλος του HIF-1 στην αιμοποίηση

Τα επαγόμενα από την υποξία ρυθμιστικά σηματοδοτικά μονοπάτια που υπάρχουν στα HSCs είναι παρόμοια με αυτά που ανευρίσκονται σε μια πληθώρα άλλων κυτταρικών τύπων, με τον HIF-1 να αποτελεί παράγοντα κλειδί για τις κυτταρικές απαντήσεις στη χαμηλή παροχή O₂.

Το mRNA και η πρωτεΐνη του HIF-1 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα LT-HSCs [162,163]. Η ανάλυση των HSCs που προέρχονται από συστηματική αποσιώπηση του HIF-1α σε ποντίκια (HIF-1α^{Δ/Δ}) δείχνουν απώλεια της ικανότητας τους για αναδόμηση του μυελού μετά από επαναλαμβανόμενες μεταμοσχεύσεις MO [163]. Τα HIF-1α^{Δ/Δ} LT-HSCs εισέρχονται στο κυτταρικό κύκλο από τη φάση G₀, πολλαπλασιάζονται και έδειχναν μειωμένη αντοχή σε στρες, όπως η χορήγηση 5-φθοριο-ουρακίλης ή γήρανση. Οι μελέτες αυτές παρέχουν αποδείξεις ότι ο HIF-1α παίζει απαραίτητο ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ηρεμίας των HSCs και την αντίστασή τους στο στρες. Συμπληρωματικά στις μελέτες αυτές της απώλειας της δράσης του HIF-1α, έχουν πραγματοποιηθεί και μελέτες με συστηματική απαλοιφή του γονιδίου von Hippel Lindau (VHL) στα αιμοποιητικά κύτταρα, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δράσης του HIF-1α. Η ανάλυση των κυττάρων αυτών αποκαλύπτει ότι οι ιδιότητες των LT-HSCs και των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων επηρεάζονται διαφορετικά από τον HIF-1α και τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α αυξάνονται είτε σε απαλοιφή του ενός (VHL^{+Δ}) είτε και των δύο αλληλίων (VHL^{Δ/Δ}) του VHL. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι παρότι ένα μικρό τμήμα των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων είναι στη G₀ φάση, το ποσοστό των VHL^{+Δ} αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων σε G₀ φάση είναι σημαντικά υψηλότερο. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α δεν είναι υψηλά στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα σε σταθερή κατάσταση και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α μέσω μονο-αλληλικής διαγραφής του VHL επάγει την έξοδο των VHL^{+Δ} αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο και τα διατηρεί σε κατάσταση ηρεμίας. Η παθολογική καταστολή του κυτταρικού κύκλου και της ικανότητας μεταμόσχευσης αποκαθίσταται σε HSCs με διπλή εξουδετέρωση HIF-1α^{Δ/Δ}:VHL^{Δ/Δ}. Η ελαττωμένη συχνότητα των LT-HSCs στα VHL^{Δ/Δ} ποντίκια διασώζεται από την ταυτόχρονη διαγραφή του γονιδίου του HIF-1α. Επιπλέον η μακροπρόθεσμη *in vitro* έκθεση των LT-HSCs σε έναν αναστολέα προλυλ-δροξυλασών (prolyl-hydroxylase - PHD), ο οποίος επίσης σταθεροποιεί των HIF-1α

ελαττώνει την ικανότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων για εγκατάσταση αιμοποίησης μετά τη μεταμόσχευση [173].

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι υπάρχει ένα ιδανικό επίπεδο πρωτεΐνης HIF-1α για τη διατήρηση των HSCs. Ο HIF-1α είναι απαραίτητος για τη μακροχρόνια διατήρηση των HSCs και σε ένα δεδομένο εύρος, μέτριες αυξήσεις του HIF-1α είναι ωφέλιμες για τα HSCs μέσω επαγωγής της ηρεμίας. Ωστόσο, η περίσσεια HIF-1α είναι καταστροφική για τα HSCs και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και πρόωρη εξάντληση. Έτσι, ο HIF-1α ρυθμίζει λεπτά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων και είναι σημαντικό να κατανοήσουμε πώς τα επίπεδα του μεταγράφου και της πρωτεΐνης του HIF-1α ρυθμίζουν τη δράση των HSCs. Από την άποψη αυτή μια νέα μέλετη πάνω στο θέμα αυτό δείχνει ότι μια από τις heat shock πρωτεΐνες, η GRP78, και ο συνδέτης της, Cripto, ρυθμίζουν την ηρεμία των HSCs και διατηρούν τα HSCs στην υποξία, ως ενδιάμεσοι του HIF-1α [174]. Η περιοχή του προμότορα του Cripto διαθέτει ένα στοιχείο ανταποκρινόμενο στην υποξία (Hypoxia Response Element – HRE), πάνω στο οποίο το σταθεροποιημένο σύμπλεγμα του HIF-1 δεσμεύεται. Οι heat shock πρωτεΐνες εμπλέκονται επίσης στην προστασία του HIF-1α στο σηματοδοτικό μονοπάτι της AKT.

Αρκετές αναπτυξιακές βλάβες ανιχνεύονται σε ποντίκια με αποσιώπηση (knock out) του HIF-1. Αυτό καθιστά δυσχερή τη μελέτη του ρόλου του HIF-1 ειδικά στην εμβρυονική αιμοποίηση, αλλά ιδιαίτερα τα ποντίκια με αποσιώπηση του *Arnt* παρουσιάζουν διαταραχές της αιμοποίησης κατά την ανάπτυξη [175]. Χρησιμοποιώντας εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα με αποσιώπηση του *HIF-1α* στο στάδιο της βλαστοκύστης ή με συστηματική διαγραφή του *HIF-1α*, έχει διαπιστωθεί ότι ο HIF-1α είναι σημαντικός για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων και τη λειτουργία των μυελικών κυττάρων που επιστρατεύονται στις υποξικές περιοχές φλεγμονής [139,176].

Η μελέτη των Takubo και συνεργατών δείχνει ξεκάθαρα ότι ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού μέσω του HIF-1 είναι μια καθοριστική παράμετρος λειτουργίας της υποξικής αιμοποιητικής φωλιάς [163]. Η σχετική ηρεμία (quiescence) θεωρείται ότι προστατεύει τα HSCs από μεταλλάξεις σχετιζόμενες με την αναπαραγωγή. Επιπρόσθετα πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η διαταραχή της ηρεμίας οδηγεί σε ελαττωμένη λειτουργικότητα των HSCs και εξάντληση του διαμερίσματος των HSCs με την πάροδο του χρόνου. Η θεωρία ότι τα HSCs εντοπίζονται σε υποξικές αιμοποιητικές φωλιές με χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα ταιριάζει καλά στην εικόνα αυτή. Έχει προταθεί ότι οι υποξικές αιμοποιητικές φωλιές είναι εκείνες που προτιμώνται από τα HSCs που βρίσκονται σε ηρεμία [177]. Από την άποψη αυτή είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τόσο το χαμηλό επίπεδο παροχής, όσο και η κατάσταση ηρεμίας επιλέγουν LT-HSCs με ανώτερη ικανότητα αυτοανανέωσης σε εξαιρετικά καθαρούς πληθυσμούς HSCs που προηγουμένως θεωρούνταν ετερογενείς [146,160,178].

Η προστασία από τα ROS μπορεί να αποτελεί άλλη μια κεντρική δράση της υποξίας. Τα χαμηλά επίπεδα ROS συσχετίζονται με τη λειτουργία των HSCs και είναι ξεκάθαρο ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS έχουν καταστροφικές συνέπειες στην κυτταρική επιβίωση. Η διαταραχή του γονιδίου *Atm* σε ποντίκια οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ROS με συνέπεια την ελάττωση της λειτουργίας των HSCs. Αυτές οι διαταραχές μπορούν να αναστραφούν με την αντιοξειδωτική N-ακετυλκυστεΐνη [179]. Επιπρόσθετα οι πρωτεΐνες FOXO είναι υπεύθυνες για να αντισταθμίζουν την παραγωγή ROS στα κύτταρα και όταν και τα τρία γονίδια FOXO των θηλαστικών *Foxo1*, *Foxo3* και *Foxo4* διαγράφουν, τα HSCs “κινδυνεύουν”

[180]. Παρόλα αυτά η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του οξυγόνου και των επιπέδων ROS μπορεί να μην είναι τόσο απλή όσο φαίνεται. Φαίνεται ότι τα ROS μπορούν να παραχθούν ακόμα και όταν το οξυγόνο είναι περιορισμένο πιθανά λόγω του γεγονότος ότι η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων απαιτεί οξυγόνο για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων. Καθώς το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, η έλλειψη οξυγόνου μπορεί να αφήσει αντιδραστικές ουσίες πίσω [181]. Εκτός αυτού έχει δειχθεί ότι τα ROS που παράγονται στα μιτοχόνδρια είναι ακόμη απαραίτητα για τη δράση του HIF [75]. Είναι επομένως πιθανό ότι μέτρια επίπεδα ROS μπορεί να είναι απαραίτητα για τη σηματοδότηση του HIF στα HSCs, αλλά σε αυξημένα επίπεδα είναι καταστροφικά.

Δεδομένου του μεγάλου αριθμού γονιδίων που είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από την υποξία, είναι πολύ πιθανό ότι η υποξία και η δράση του HIF διαδραματίζουν επιπλέον ρόλους στα HSCs, μέσω επαγωγής άλλων γονιδίων. Παρότι άμεση απόδειξη της ρύθμισης από τον HIF στα HSCs μπορεί να μην υπάρχει, αρκετά από τα γονίδια που εκφράζονται στα HSCs είναι γνωστό ότι επάγονται από την υποξία σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Ένα παράδειγμα είναι ο μεταφορέας ABCG2 (ATP binding cassette transporter) που εκφράζεται στα HSCs και φαίνεται να επάγεται τόσο από τον HIF-1 όσο και από τον HIF-2 [172,182]. Επιπλέον η υποξία μπορεί να επάγει τα *Cxcl12* και *Cxcr4* τα οποία εμπλέκονται στη μετανάστευση των HSPCs, καθώς και άλλων σχετιζόμενων με τα στελεχιαία κύτταρα γονιδίων όπως τα *NOTCH1* και *KIT* [183,184].

3.4 HSCs και *in vitro* υποξία

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ποικίλα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, τόσο ποντικών όσο και ανθρώπων, μπορούν να αυξάνονται αν επωασθούν υπό συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου. Αυτές οι μελέτες τυπικά μετρούν το σχηματισμό CFU ή τη βραχυπρόθεσμη εγκατάσταση του μοσχεύματος μετά από διαφορετικές περιόδους έκθεσης στην υποξία μη κλασματοποιημένων αιμοποιητικών πληθυσμών [185-189]. Οι Danet και συνεργάτες έδειξαν ότι ανθρώπινα Lin-CD34+CD38- κύτταρα MO εκπύσσονται μετά από μια καλλιέργεια διάρκειας 4 ημερών σε 1,5% οξυγόνο όπως μετρήθηκε σε μελέτη επανεγκατάστασης αιμοποίησης σε ποντίκια SCID (Severe Combined Immunodeficiency) [169]. Αυτό συνοδεύεται από σταθεροποίηση του HIF-1α και αύξηση της πρωτεΐνης του VEGFA και των υποδοχέων επιφανείας του VEGFA, VEGFR1 και VEGFR2, καθώς και των υποδοχέων της αγγειοποιητίνης TIE-1 και TIE-2. Σημειώνεται ότι το ποσοστό των CD34+ κυττάρων σε G0 φάση του κυτταρικού κύκλου ελαττώνεται στην υποξία, παρότι συνολικά οι G1 και G0 φάσεις αυξάνονται [169]. Μια παρόμοια μελέτη χρησιμοποίησε CD34+ κύτταρα ομφαλικού αίματος που επώασθηκαν σε υποξία για 6 μέρες, με ακόλουθη μεταμόσχευση σε NOD/SCID/IL2rg^{null} ποντίκια. Με την τεχνική αυτή τα επίπεδα εγκατάστασης του μοσχεύματος δεν ήταν διαφορετικά από τα κύτταρα που επώασθηκαν σε νορμοξία εφόσον το σύνολο των καλλιεργημένων κυττάρων μεταμοσχευόταν. Ωστόσο, μεταμοσχεύοντας ίδιους αριθμούς κυττάρων, οι οποίοι μετρήθηκαν μετά την καλλιέργεια, τα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε υποξία έδειχναν μεγαλύτερη εγκατάσταση. Ουσιαστικά τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται με τα ευρήματα της μελέτης των Danet και συνεργατών, καθώς ίδιοι αριθμοί κυττάρων είχαν μεταμοσχευθεί μετά την καλλιέργεια στη μελέτη αυτή. Ωστόσο οι Shima και συνεργάτες παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα Ki67- κυττάρων παράλληλα με την αυξημένη έκφραση των ανασταλτικών του κυτταρικού κύκλου γονιδίων CDKN1A και CDKN1C [190].

Οι Eliasson και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της υποξίας στα HSCs καλλιερρώντας FLT3-CD34- LSK κύτταρα MO από ποντικούς σε 20% και 1% οξυγόνο. Στις υποξικές καλλιέργειες ο αριθμός των κυττάρων ήταν σημαντικά ελαττωμένος σε σχέση με τη νορμοξία, γεγονός το οποίο οφειλόταν σε ελάττωση του πολλαπλασιασμού και την παρουσία περισσότερων κυττάρων στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον το ποσοστό των HSCs με δυναμικό μακροπρόθεσμης εγκατάστασης αιμοποίησης βρέθηκε αυξημένο. Η έκφραση ανασταλτικών γονιδίων της κινάσης κυκλίνης p21cip1, p27Kip1, and p57Kip2 αυξανόταν στα LSK κύτταρα στην υποξία, ενώ μόνο το p21cip1 αυξανόταν στα FLT3- CD34- LSK κύτταρα. Η έκφραση των p27Kip1 and p57Kip2 ήταν σε εξάρτηση από των HIF-1α. Η υπερέκφραση ενός σταθερά ενεργού HIF-1α ή η χρήση του σταθεροποιητή του HIF FG-4497 οδηγούσε σε ελάττωση της ικανότητας επανεγκατάστασης των HSCs. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υποξία, εν μέρει μέσω του HIF-1^α διατηρεί τα HSCs ελαττώνοντας τον πολλαπλασιασμό και εννοώντας την ηρεμία [173].

Όταν τα LSK κύτταρα καλλιερρώνονται σε 1% O₂ και ο ίδιος αριθμός κυττάρων μεταμοσχεύονται σε ποντίκια λήπτες, το δυναμικό επανεγκατάστασης αιμοποίησης των HSCs διατηρείται αλλά δεν αυξάνει σε σχέση με τις νορμοξικές συνθήκες. Ωστόσο όταν ο αριθμός των κυττάρων που εγχύονται υπολογίζεται, λιγότερα κύτταρα από τις υποξικές καλλιέργειες χρειάζονται για την επανεγκατάσταση στον ίδιο βαθμό σε σχέση με τη νορμοξία υποδεικνύοντας, ότι παρότι και οι δύο συνθήκες μπορούν να διατηρούν τα HSCs στην καλλιέργεια τα προγονικά κύτταρα εκπτύσσονται πιο ζωηρά στη νορμοξία [173]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Shima και συνεργατών όπου CD34+CD38- κύτταρα από ομφαλικό αίμα φαίνεται ότι παραμένουν σε ηρεμία στην υποξία [190]. Αντίθετα οι Dane και συνεργάτες έδειξαν ότι όταν ανθρώπινα HSCs MO καλλιερρώνονται για 4 μέρες σε υποξία, τα σοβαρά ανοσοανεπαρκή επαναγκαθιστώμενα κύτταρα αυξανόνταν κατά 4 με 6 φορές [169]. Στη μελέτη αυτή η κατανομή του κυτταρικού κύκλου αναλύθηκε και φάνηκε ότι η υποξία προωθούσε τη μετάβαση των κυττάρων από τη G0 στη G1 φάση. Ωστόσο τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν με Lin-CD34+ κύτταρα, τα οποία αποτελούν έναν πληθυσμό που περιλαμβάνει κυρίως προγονικά κύτταρα και λίγα LT-HSCs. Οι Eliasson και συνεργάτες χρησιμοποίησαν υψηλής καθαρότητας, λειτουργικά ελεγμένα LT-HSCs και ST-HSCs από MO ποντικού για τη μελέτη της επίδρασης της υποξίας στον κυτταρικό κύκλο. Με τα κύτταρα αυτά κατέστη δυνατή η ανάδειξη μιας σαφούς ελάττωσης στον πολλαπλασιασμό και αύξησης του αριθμού των LT-HSCs (FLT3- CD34- LSK) στη G0 φάση στις υποξικές καλλιέργειες. Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι τουλάχιστον εν μέρει ο HIF-1 διαμεσολαβεί αυτές τις επιδράσεις έναντι του πολλαπλασιασμού, καθώς η χρήση του σταθεροποιητή του HIF-1 FG-4497 οδηγούσε σε παρόμοια αποτελέσματα [173].

3.5 Ο ρόλος του HIF-1 στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)

Μελέτες καλλιεργείων προγονικών κυττάρων μυελού των οστών από ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα οδηγούν στην αμφισβήτηση ενός μοντέλου όπου τα ΜΔΣ είναι αποτέλεσμα ελαττωμένου αριθμού προγονικών κυττάρων. Το μοντέλο αυτό βασίζεται σε παρατηρήσεις ότι CFUs ασθενών με ΜΔΣ ελαττώνονται σε καλλιέργειες με 18,6% O₂ (). Οι Thomson και συνεργάτες έδειξαν ότι τα CFUs αυξάνονται μεταβάλλοντας την τάση του οξυγόνου σε φυσιολογικά επίπεδα [191]. Αυτό υποδηλώνει ότι στην πραγματικότητα ο αριθμός των προγονικών κυττάρων στους ασθενείς αυτούς είναι στην πραγματικότητα φυσιολογικός, αλλά οι διαφοροποιούμενοι απόγονοι των προγονικών κυττάρων δεν μπορούν να ωριμάσουν επαρκώς όταν εκτίθενται σε τάση οξυγόνου

μεγαλύτερη του 3%, με αποτέλεσμα τον περιορισμό τους μέσω απόπτωσης. Η τάση του οξυγόνου μπορεί να λειτουργεί ως έναυσμα για απόπτωση στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και τους απογόνους του στους ασθενείς με ΜΔΣ. Τα HSCs που ευθύνονται για το ΜΔΣ και φέρουν αυτή τη βλάβη μπορεί να προστατεύονται από μέσω της βαθύτερης υποξίας στην αιμοποιητική φωλιά. Έτσι αυτά τα παθολογικά HSCs μπορούν να διατηρούν απεριόριστο δυναμικό αυτό-ανανέωσης που παρουσιάζουν και τα φυσιολογικά HSCs υπό την προϋπόθεση ότι παραμένουν σε υποξικές αιμοποιητικές φωλιές. Οι Thomson και συνεργάτες έδειξαν ότι καλλιερμώντας μονοπύρηνια κύτταρα και CD34+ προγονικά κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με ΜΔΣ η ικανότητα σχηματισμού CFUs ελαττώνονταν σημαντικά στα ΜΔΣ σε σχέση με τους μάρτυρες. Ωστόσο η καλλιέργεια σε συνθήκες υποξίας με δύο επίπεδα υποξίας O₂ 1% ή 3% η πλειονότητα των ΜΔΣ δειγμάτων έδειχνε αύξηση των CFUs πολύ μεγαλύτερη από αυτή που έδειχναν οι υγιείς μάρτυρες.

Οι Masala et al. έδειξαν ότι η επώαση κυττάρων μυελού των οστών ασθενών με ΜΔΣ σε συνθήκες σημαντικής υποξίας οδηγεί σε επιλογή μιας υποομάδας κυττάρων με δυναμικό αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, όπως προσδιορίστηκε *in vitro* [192]. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε μόνο σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χαμηλού κινδύνου (IPSS low/Intermediate-1 risk). Η περαιτέρω μελέτη σε *in vivo* πειράματα μεταμόσχευσης σε NOD-SCID ποντίκια επιβεβαίωσε ότι η σοβαρή υποξία επιλέγει μια υποομάδα κυττάρων που φέρουν δυναμικό αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου μεταξύ των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού, που είχαν απομονωθεί από ασθενείς με χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι κύτταρα που φέρουν δυναμικό αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και είναι ικανά να προσαρμόζονται στην υποξία, διαφεύγοντας την επαγόμενη από υποξία απόπτωση υπάρχουν μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών των ΜΔΣ.

Στις μέχρι τώρα δημοσιευμένες μελέτες η έκφραση του HIF-1 έχει συσχετισθεί με την πρόγνωση των ΜΔΣ καθώς και την ανταπόκριση σε θεραπείες.

Μελέτες τεκμηριώνουν ανοσοϊστοχημικά την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΜΔΣ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [193,194]. Οι Tong και συνεργάτες, μελετώντας την ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε οστεομυελικές βιοψίες ασθενών με ΜΔΣ, έδειξαν ότι ο HIF-1α αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για τα ΜΔΣ, μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση που συμπεριλάμβανε την ηλικία, το ποσοστό βλαστών του ΜΟ, τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, την αιμοσφαιρίνη, τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και το IPSS. Επιπλέον, συσχέτισαν την έκφραση του HIF-1α με πτωχή συνολική επιβίωση και πρόοδο νόσου. Η έκφραση του HIF-1α συσχετίστηκε επίσης με το ποσοστό των βλαστών του ΜΟ, την τιμή της αιμοσφαιρίνης και τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά. Επιπρόσθετα, φάνηκε ότι η θεραπεία με δεσιταβίνη οδηγούσε σε καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε σχέση με τη συμβατική χημειοθεραπεία σε ασθενείς που εξέφραζαν HIF-1α [193].

Οι Du και συνεργάτες έδειξαν αυξημένη έκφραση του mRNA του HIF-1α σε δείγματα ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, με τα επίπεδα του mRNA του HIF-1α να αυξάνονται ανάλογα με την προγνωστική βαρύτητα του ΜΔΣ με βάση το IPSS [195].

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ασθενείς που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα mRNA στα μονοπύρηνια κύτταρα ΜΟ και πρωτεΐνης του HIF-1α στα κύτταρα της μυελικής σειράς, κατά την ανοσοϊστοχημική μελέτη, σε σύγκριση με ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη

θεραπεία ή που παρουσιάζουν σταθερή νόσο, αναδεικνύοντας την έκφραση του mRNA του HIF-1α ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την ανταπόκριση στη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη [196].

Ο HIF-1α ελαττώνει τη μεταγραφική έκφραση των εξισορροπητικών μεταφορέων νουκλεοτιδίων (equilibrative nucleoside transporters - ENTs) [197], οι οποίοι εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υπομεθυλιωτικών παραγόντων, όπως η 5-αζακυτιδίνη.

Οι Hayashi και συνεργάτες έδειξαν σε πειραματικό μοντέλο ποντικών ότι η ανεξάρτητη από το οξυγόνο ενεργοποίηση της σηματοδότησης του HIF-1α είναι τόσο απαραίτητη, όσο και επαρκής για την επαγωγή δυσπλαστικών και κυτταροπενικών φαινοτύπων ΜΔΣ. Κατά την επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α σε ξεχωριστές αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, η ειδική για τη μεγακαρυοκυτταρική σειρά επαγωγή έκφρασης του HIF-1α προκαλούσε θρομβοπενία και μεγακαρυοκυτταρική δυσπλασία, υποδεικνύοντας έναν επαρκή, διαμεσολαβούμενο από τον HIF-1α, ενδογενή κυτταρικό μηχανισμό για τη διαταραγμένη μεγακαρυοποίηση. Η ειδική για την ερυθρά σειρά επαγωγή του HIF-1α δεν προκαλούσε παθολογική ερυθροποίηση ή αναιμία, υποδηλώνοντας έναν εξωγενή μηχανισμό μη αποδοτικής ερυθροποίησης. Από την άλλη πλευρά η επαγωγή της έκφρασης του HIF-1α στη μυελομονοκυτταρική σειρά επηρέαζε το σχηματισμό της ερυθροβλαστικής νησίδας του ΜΟ, επάγοντας φλεγμονώδη μακροφάγα, πυροδοτώντας την αναιμία [198].

Η μεταγραφική υπογραφή του HIF-1α είναι γενικά ενεργοποιημένη στα αρχέγονα και τα προγονικά κύτταρα του ΜΟ των ποντικών με ΜΔΣ. Μείζονες μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με ΜΔΣ (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *MLL1*) ενεργοποιούν την υπογραφή του HIF-1α. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι παρότι τα μοντέλα ποντικών με μεμονωμένες μεταλλάξεις σχετιζόμενες με ΜΔΣ παρουσίαζαν σημαντική συσσώρευση της πρωτεΐνης του HIF-1α, αλλά μεμονωμένες μεταλλάξεις δεν επαρκούσαν για την εμφάνιση μυελοδυσπλαστικού φαινοτύπου στα ποντίκια. Ο συνδυασμός δύο σχετιζόμενων με ΜΔΣ μεταλλάξεων οδηγούσε σε αθροιστική συσσώρευση της πρωτεΐνης του HIF-1α και ενεργοποίηση της σηματοδότησης του HIF-1α τόσο στα HSPCs, όσο και στους ώριμους κυτταρικούς πληθυσμούς. Μεταλλάξεις σε διαφορετικά σχετιζόμενα με ΜΔΣ γονίδια μπορούσαν να επάγουν την ψευδοϋποξική σταθεροποίηση του HIF-1α με διαφορετικούς μηχανισμούς. Η μετάλλαξη *MLL-PTD* σχετίστηκε με μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του τύπου Warburg και ανεξάρτητη από την υποξία ενεργοποίηση της σηματοδότησης του HIF-1α, καθώς και με υπερεμεθυλίωση του DNA. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του HIF-1α στην περίπτωση της μετάλλαξης του *RUNX1* σχετίστηκε με αρνητική ρύθμιση τόσο της MDM2 E3 λιγκάσης ουβικιτίνης, όσο και της p53. Η έκφραση των *VHL* και *MDM2* αυξανόταν στα HSPCs των *MLL^{PTD/WT}* ποντικών. Έτσι είναι πιθανό ότι η μετάλλαξη του *RUNX1* ή ανεπάρκεια της πρωτεΐνης *RUNX1* μπορεί να αυξάνει περαιτέρω τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-1α και της σηματοδότησής του στο μοντέλο ποντικών *MLL^{PTD/WT}*/μεταλλαγμένο *RUNX1* διαταράσσοντας των άξονα *RUNX1-p53-MDM2* σε ένα υπόβαθρο *MLL^{PTD/WT}*. Παρότι η ανεπάρκεια των γονιδίων *DNMT3S*, *TET2* και *ASXL1* αύξανε επίσης σημαντικά την πρωτεϊνική έκφραση του HIF-1α, οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό δεν έχουν αποσαφηνισθεί [198].

Τόσο η γενετική, όσο και η χημική αναστολή της σηματοδότησης του HIF-1α διέσωζε το ΜΔΣ φαινότυπο στο μοντέλο των ποντικών Η γενετική διαγραφή του *HIF1A* ελάττωνε το κλωνικό πλεονέκτημα των σχετιζόμενων με ΜΔΣ μεταλλαγμένων κυττάρων και

ανέστρεφε το φαινότυπο του ΜΔΣ, συμπεριλαμβανομένων της αναιμίας και της θρομβοπενίας, στα μοντέλα των ποντικών με μεταλλάξεις και ΜΔΣ. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υπερενεργοποίηση της σηματοδότησης του HIF-1α που επάγεται από μεταλλάξεις οδηγεί σε σχετιζόμενους με ΜΔΣ φαινοτύπους σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές και σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης. Η RNA-seq ανάλυση έδειξε ότι η μέγιστη επίδραση της αναστολής του *HIF1A* ήταν η αναστροφή της αναστολής διαφοροποίησης της ερυθράς και της μεγακαρουκυτταρικής σειράς. Η αναστολή του HIF-1α είχε ως αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση του *GATA2* και την αρνητική ρύθμιση του *GATA1*, καθώς και την αύξηση της έκφρασης γονιδίων σημαντικών για την ερυθροκυτταρική και μεγακαρουκυτταρική διαφοροποίηση, όπως τα *KLF1*, *GFI1B*, *TAL1* και *PBX1*. Η ερυθροποίηση ρυθμίζεται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς μηχανισμούς. Τα μακροφάγα των ερυθροβλαστικών νησίδων έχουν σημαντικό εξωγενή ρόλο στην ερυθροποίηση. Τα μακροφάγα ρυθμίζονται από άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικά από τα Τ λεμφοκύτταρα. Η αναστολή του HIF-1α είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης του *ZEB2* και την αύξηση της έκφρασης του *IRF4*. Η ανάλυση δεδομένων ChIP-seq ανέδειξε τα *ZEB2* και *IRF4* ως στόχους του HIF-1α. Ο *ZEB2* αποτελεί βασικό ρυθμιστή των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων, καθώς και των Τ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και των Τ λεμφοκυττάρων μνήμης. Ο *IRF4* αποτελεί ρυθμιστή της εναλλακτικής ενεργοποίησης των μακροφάγων. Παρατηρήθηκε ότι η επαγωγή του HIF-1α στο αίμα προκαλεί φαινοτυπικά φλεγμονώδη μακροφάγα, διαταραχή της τελικής ερυθροποίησης και ελάττωση των ερυθροβλαστών του ΜΟ. Έτσι, η αρνητική ρύθμιση του *ZEB2* και η θετική ρύθμιση του *IRF4* μπορεί να εξηγεί τη διάσωση του φαινοτύπου της αναιμίας μέσω ενός εξωγενούς του ερυθροκυττάρου μηχανισμού [198].

Κεφάλαιο 4: Μεταβολισμός και αιμοποίηση

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός περιλαμβάνει μια μάχη μεταξύ καταβολικών διεργασιών που παράγουν ενέργεια και αναβολικών διεργασιών που καταναλώνουν ενέργεια. Η μετάβαση μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών καταστάσεων απαιτεί τα HSCs να εξαρτώνται από μια ελαστική ισορροπία μεταξύ αυτών των ενεργειακών διεργασιών. Επομένως ένα από τα καθοριστικά χαρακτηριστικά των HSCs είναι η μεταβολική τους πλαστικότητα και αυτό υποδηλώνει την επιτυχή μετάβαση των HSCs από την ηρεμία στην ενεργότητα.

Πρόσφατες μελέτες έχουν βοηθήσει στην εδραίωση του γεγονότος ότι τα μεταβολικά προγράμματα είναι κομβικοί οδηγοί των αποφάσεων της τύχης της κυτταρικής κατάστασης των HSCs. Βασισμένοι στα ευρήματα αυτά μπορούμε να κατασκευάσουμε ένα μοντέλο βιοενεργητικής των HSCs με μια «βασική κατάσταση» κατευθυνόμενη προς την αποφυγή της παραγωγής ROS και της διατήρησης χαμηλών επιπέδων ATP μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης, η οποία επιτρέπει τη διατήρηση της ηρεμίας. Και μια «ενεργό κατάσταση» κατευθυνόμενη προς την παραγωγή υψηλού ATP και επιπέδων ROS μέσω της FAO και του TCA κύκλου, η οποία επιτρέπει τη δέσμευση προς τη διαφοροποίηση μέσω ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης. Η διαταραχή ή απώλεια αυτών των προγραμμάτων παραγωγής ενέργειας οδηγεί κατά προτίμηση σε συμμετρικές διαιρέσεις, πυροδοτώντας την έκπτωση είτε των HSCs, είτε των προγονικών κυττάρων. Τα ενεργειακά προγράμματα διαφοροποίησης παρέχουν μια δυναμική πλατφόρμα για τα HSCs προκειμένου να εναλλάσσονται μεταξύ αυτών των ποικίλων κυτταρικών δρόμων και να καλύπτουν τις μεταβαλλόμενες ανάγκες του αιμοποιητικού συστήματος. Επιπλέον νέα δεδομένα έχουν αναδειχθεί σχετικά μετά τα σήματα που διευκολύνουν τη μετάβαση μεταξύ αυτών των μεταβολικών προγραμμάτων και ο λεπτός συντονισμός των μιτοχονδριακών παραμέτρων παραγωγής ενέργειας και παραγωγής ROS αναδεικνύεται ως ένας από της σημαντικούς καθοριστικούς παράγοντες της διαφοροποίησης.

Τα κύτταρα απαιτούν ενέργεια για τον πολλαπλασιασμό, έτσι είναι λογικό τα αρχέγονα κύτταρα να μεταβάλλουν σημαντικά το μεταβολισμό τους καθώς περνούν από την ηρεμία σε μια ενεργή κατάσταση. Τα ήρεμα HSCs εξαρτώνται πιο πολύ από τη γλυκόλυση για τη σύνθεση ATP παρά από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Το βασικό μονοπάτι της γλυκόλυσης παράγει μόνο 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης, σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση που δίνει γένεση σε 36 μόρια ATP. Εκτός από το ATP, ένα βασικό προαπαιτούμενο για τον πολλαπλασιασμό είναι η παροχή πρόδρομων μορίων για τη βιοσύνθεση αμινοξέων, λιπιδίων και νουκλεοτιδίων. Αυτοί οι αναβολικοί άνθρακες συντίθενται de novo κυρίως με τη χρήση ενδιάμεσων του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (tricarboxylic acid – TCA). Παρότι η γλυκόλυση μπορεί να παράγει γρήγορα ATP για να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες της βιοσύνθεσης, ο ενεργός πολλαπλασιασμός δεν μπορεί να συντηρηθεί δεδομένης της περιορισμένης ροής των προερχόμενων από τη γλυκόζη ενδιάμεσων στον TCA κύκλο. Επομένως, η ρύθμιση της ροής του κύκλου TCA, μέσω περιορισμού της διαθεσιμότητας υποστρωμάτων/οξυγόνου μπορεί να αναπαριστά ένα άλλο επίπεδο ελέγχου, καθορίζοντας τη μοίρα των HSCs.

4.1 HSCs σε ηρεμία και αναερόβιος μεταβολισμός

Η ηρεμία προσφέρει έναν αποτελεσματικό φραγμό έναντι της έναρξης αιμοποιητικών διαταραχών διατηρώντας την ακεραιότητα και τη λειτουργία των HSCs μέσω περιορισμού της κυτταρικής καταστροφής από τη μιτοχονδριακή αναπνοή και τους κυτταροτοξικούς παράγοντες και αποτρέποντας την εξάντληση των HSCs μέσω ελεγχόμενης εισόδου σε κυτταρικό κύκλο και υπέρμετρο πολλαπλασιασμό [199]. Συσσωρευόμενες αποδείξεις υποδηλώνουν ότι παρότι τα HSCs φέρουν υψηλότερα επίπεδα ζωντανών μιτοχονδρίων σε σχέση με άλλα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, είναι λιγότερο ενεργά, όπως καθορίζεται από το χαμηλότερο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης και τα επίπεδα του ATP, καθώς και από τη μεγαλύτερη εξάρτηση από την αναερόβια γλυκόλυση σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση και τον TCA κύκλο [162,200]. Στην πραγματικότητα τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στη χαμηλή μιτοχονδριακή δραστηριότητα και τον υψηλή ενδογενή ανοσοφθορισμό NADH μπορούν να εμπλουτίσουν την εγκατάσταση των HSCs [162] και μια πρόσφατη μεταβολομική ανάλυση που ανέδειξε αυξημένα επίπεδα ενδιάμεσων της γλυκόλυσης και παραπροϊόντων, όπως η 1,6-διφωσφορική γλυκόζη και το πυροσταφυλικό οξύ, και μια σχετική απουσία μεταβολιτών σχετιζόμενων με τον TCA κύκλο στα HSCs που βρίσκονται σε ηρεμία [200] υποστηρίζει περαιτέρω την ιδέα της προτίμησης του γλυκολυτικού μεταβολισμού στα HSCs. Η αναερόβια γλυκόλυση όπου το πυροσταφυλικό (το τελικό γλυκολυτικό προϊόν) κατευθύνεται προς την παραγωγή γαλακτικού δεν είναι μια ενεργειακά αποδοτική διεργασία καθώς παράγει μόνο 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης – σε αντίθεση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπου το πυροσταφυλικό εισέρχεται στο μιτοχονδριακό TCA κύκλο και παράγει 36 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. Ωστόσο, φαίνεται να επαρκεί για έναν πληθυσμό που βρίσκεται σε ηρεμία και έχει σχετικά χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και μεγαλύτερη ανάγκη να αποτρέψει την παραγωγή ROS ως παραπροϊόντων των ενεργών μιτοχονδρίων [201]. Η κατανόηση του αν η επαγωγή της αναερόβιας γλυκόλυσης στα HSCs είναι το αποτέλεσμα ρύθμισης της αιμοποιητικής φωλιάς ή το αποτέλεσμα ενδογενών μηχανισμών αποτελεί πεδίο έρευνας. Μια σειρά δημοσιεύσεων έχουν οδηγήσει στη διατύπωση ενός μοντέλου όπου η αναερόβια γλυκόλυση επάγεται μέσω της εντόπισης των HSCs σε περιοχές χαμηλής παροχής οξυγόνου στο MO και η προσαρμογή στις υποξικές αυτές φωλιές αναδιαμορφώνει το μεταβολικό προφίλ των HSCs και επάγει την ηρεμία [159,162,202,203]. Η ιδέα αυτή υποστηρίζεται από πολλές γραμμές αποδείξεων συμπεριλαμβανομένων μαθηματικών μοντέλων της δραστηριότητας του MO που υποδηλώνουν ότι τα HSCs διαβιούν σε περιοχές χαμηλής παροχής οξυγόνου [155], αυξημένης δέσμευσης rimonidazole που σχηματίζει συμπλέγματα με κυτταρικές πρωτεΐνες σε καταστάσεις χαμηλής παροχής οξυγόνου στα HSCs [159,162,163], σταθερής έκφρασης του HIF-1 α , ο οποίος υφίσταται πρωτεασωμική αποδόμηση όταν επίπεδα οξυγόνου ξεπερνούν το 5% στα HSCs [162,163] και της *in vivo* απώλειας των HSCs μετά την έγχυση tirazapamine, μιας τοξίνης ειδικής για τα υποξικά κύτταρα [159]. Ωστόσο η χαρτογράφηση της κατανομής στο χώρο των HSCs στις μηριαίες κοιλότητες του MO χρησιμοποιώντας laser scanning κυτταρομετρία καταδεικνύει ότι το υποξικό προφίλ των HSCs με βάση τη συσσώρευση του rimonidazole και τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1 α δε σχετίζεται με την εντόπιση των HSCs σε περιοχές με ελάχιστη παροχή οξυγόνου [204]. Η μελέτη αυτή αναδεικνύει την πιθανότητα όταν τα ίδια τα HSCs μπορεί να σταθεροποιούν τον HIF-1 α μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από το οξυγόνο [205,206] και αυτό τονίζει την ανάγκη για προσοχή όταν γίνεται άμεσος συσχετισμός των τεχνικών αυτών με τις διαταραχές του οξυγόνου. Επίσης υποδηλώνει ότι το γλυκολυτικό προφίλ των HSCs δεν είναι απλά αποτέλεσμα του

μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ αλλά εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από ενδογενείς μηχανισμούς. Η ιδέα αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τα HSCs εκφράζουν ισχυρά την πρωτεΐνη CRIPTO, έναν εξωκυττάριο παράγοντα απαραίτητο για την πρόωμη ανάπτυξη των σπονδυλωτών η οποία επάγει πολλά γλυκολυτικά ένζυμα [174](24) και ότι ο HIF-1α προάγει ενεργά την αναερόβια γλυκόλυση στα HSCs αποτρέποντας την είσοδο του πυροσταφυλικού στον TCA κύκλο μέσω θετικής ρύθμισης κινασών της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Pyruvate dehydrogenase kinase PDKs), συμπεριλαμβανομένων των PDK2 και PDK4 [207]. Επιπλέον, τα επίπεδα του HIF-1α ρυθμίζονται από τον homeobox μεταγραφικό παράγοντα MEIS1 (myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog) και η διαγραφή είτε του Hif-1α είτε του Meis1 οδηγεί σε απώλεια της ηρεμίας και σε δυσλειτουργία των HSCs [162,208]. Συνολικά οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν μια συνεργασία ενός συνδυασμού εξωγενών του κυττάρου σχετιζόμενων με τη αιμοποιητική φωλιά και ενδογενών του κυττάρου διαμεσολαβητών που χτίζουν μια ισχυρή προτίμηση για τη γλυκόλυση στα HSCs. Ωστόσο, παραμένει να διευκρινισθεί αν τα HSCs βασίζονται στην αναερόβια γλυκόλυση αποκλειστικά για τη διατήρηση της ηρεμίας και πως αυτή η προτίμηση ανατρέπεται όταν τα HSCs στρέφονται σε μια κατάσταση πιο ενεργή που απαιτεί περισσότερη ενέργεια.

4.1.1 Ο HIF-1 επαναπρογραμματίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης στα υποξικά HSCs

Οι βιοχημικές επιδράσεις της ενεργοποίησης του HIF-1 έχουν αναλυθεί εκτενώς, αλλά όχι ειδικά στα HSCs. Οι Simsek και συνεργάτες έδειξαν ότι τα HSCs έχουν χαμηλή μιτοχονδριακή δραστηριότητα και αυξημένη γλυκόλυση [162], αλλά το μεγαλύτερο μέρος της κατανόησής μας των μονοπατιών αυτών προέρχεται από τη μελέτη άλλων κυτταρικών τύπων. Σε υποξικές συνθήκες, τα κύτταρα αυξάνουν τη ροή μέσω του γλυκολυτικού μονοπατιού μέσω εξαρτώμενης από τον HIF-1 μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς γλυκόζης, όπως ο μεταφορέας γλυκόζης 1 (Glucose transporter 1 - GLUT1), γλυκολυτικά ένζυμα όπως η αφυδρογονάση Α του γαλακτικού οξέος (Lactate dehydrogenase A - LDHA), και ρυθμιστικά μεταβολικά ένζυμα όπως η κινάση 1 της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος (Pyruvate dehydrogenase kinase 1 -PDK1) [209]. Ο HIF-1 διαμεσολαβεί μια ενεργή αλλαγή από τον οξειδωτικό στο γλυκολυτικό μεταβολισμό [210]. Ένα σημείο κλειδί στο μεταβολισμό της γλυκόζης εντοπίζεται στο επίπεδο του πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο μπορεί να μετατραπεί είτε σε γαλακτικό οξύ μέσω της LDHA είτε σε ακετυλ-συνενζυμο Α (acetyl-Coenzyme A - acetyl-CoA) μέσω του μιτοχονδριακού ενζύμου αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase - PDH). Η καταλυτική υπομονάδα της PDH απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την PDK1, εκτρέποντας έτσι το πυροσταφυλικό μακριά από τα μιτοχόνδρια και αναστέλλοντας την κατανάλωση O₂.

Σε ένα επίπεδο πριν την PDH, η κινάση του πυροσταφυλικού (pyruvate kinase - PKM) καταλύει τη μετατροπή του φωσφο-ενολοπυροσταφυλικού (phosphoenolpyruvate -PEP) με το ADP σε πυροσταφυλικό και ATP. Η ισομορφές PKM κωδικοποιούνται από τα γονίδια *PKLR* και *PKM2*. Το *PKLR* κωδικοποιεί την PKL, η οποία εκφράζεται στο ήπαρ και τους νεφρούς, και την PKR, η οποία εκφράζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Το *PKM2* κωδικοποιεί τα *PKM1* και *PKM2*, που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα mRNAs και περιέχουν αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 9 και το εξόνιο 10 αντίστοιχα [211]. Η *PKM2* και η *PKM1* εκφράζονται διαφορετικά στα εμβρυονικά/αδιαφοροποίητα (αναπαραγόμενα) και στα ενήλικα/διαφοροποιημένα (σε ηρεμία) κύτταρα, αντίστοιχα. Η έκφραση της *PKM2* προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη όγκου σε

ξενομοσχεύματα [212]. Παρότι δεν υπάρχει πληροφορία για τη δραστηριότητα της PKM στα HSCs, είναι πιθανό ότι αυτή η μεταβολική αλλαγή επηρεάζει τη λειτουργία των HSCs. Η PKM2 προάγει επίσης τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των όγκων από τη οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση λειτουργώντας ως συν-ενεργοποιητής του HIF-1. Η PKM2 δεσμεύεται στη HIF-1α υπομονάδα και αυξάνει τη δέσμευση του HIF-1 στα HREs, τη στρατολόγηση του συν-ενεργοποιητή p300, την ακετυλίωση των ιστονών και τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων όπως η PDK1 και η LDHA [213]. Σε ποιο βαθμό το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται στα HSCs ή σε άλλα αρχέγονα κύτταρα μένει να αποσαφηνισθεί.

Έχει γίνει η υπόθεση ότι τα υποξικά κύτταρα περνούν από τον οξειδωτικό στο γλυκολυτικό μεταβολισμό, καθώς το O₂ γίνεται περιοριστικό για την αναπνοή, απαιτώντας έτσι χρήση ενός μονοπατιού που δεν απαιτεί O₂. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης οξυγόνου και μεταβολικής μετατροπής δεν είναι ευθέως ανάλογη. Όταν wild-type (WT) ινοβλάστες εμβρύων ποντικών (mouse embryo fibroblasts -MEF) αλλάζουν από 20% σε 1% O₂, ελαττώνουν την κατανάλωση O₂ και συνεχίζουν να καταναλώνουν λιγότερο O₂, ακόμα και όταν επιστρέφουν σε 20% O₂, υποδεικνύοντας ότι ενεργός και σταθερός μεταβολικός επαναπρογραμματισμός έχει επισυμβεί. HIF-1α^{-/-} MEFs δεν αλλάζουν από τον οξειδωτικό στο γλυκολυτικό μεταβολισμό όταν εκτίθενται σε 1% O₂, αλλά έχουν υψηλότερα επίπεδα ATP στο 1% O₂ σε σχέση με τα WT MEFs στο 20% O₂, υποδηλώνοντας ότι το 1% O₂ δεν είναι περιοριστικό για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Γιατί λοιπόν τα WT MEFs υποβάλλονται σε μεταβολική αλλαγή; Η απάντηση φαίνεται να έγκειται στην παραγωγή ROS. Τα HIF-1α^{-/-} MEFs που διατηρούνται σε ≤1% O₂ για αρκετές μέρες πεθαίνουν λόγω εκσεσημασμένης παραγωγής ROS, ενώ τα WT MEFs παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα ROS όταν διατηρούνται σε 1% O₂ για αρκετές ημέρες παρά όταν διατηρούνται σε 20% O₂.

Η επιβίωση των HIF-1α^{-/-} MEFs μπορεί να αποκατασταθεί με την υπερέκφραση της PDK1 ή της BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), η οποία πυροδοτεί την ειδική για τα μιτοχόνδρια αυτοφαγία. Και οι δύο πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια στόχους του HIF-1 των οποίων η έκφραση επάγεται από την υποξία στα WT κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι είναι λειτουργικά σχετικοί μεσολαβητές αυτής της ρυθμιστικής απάντησης. Και τα δύο αναστέλλουν επίσης την αναπνοή είτε εκτρέποντας υποστρώματα μακριά από τα μιτοχόνδρια (PDK1) είτε ελαττώνοντας τον αριθμό των μιτοχονδρίων (BNIP3). Η αυξημένη παραγωγή ROS σε απάντηση στην οξεία υποξία μπορεί να αντανakλά μια ανεπαρκή μεταφορά ηλεκτρονίων λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητας O₂ στον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στο συμπλεγμα IV (cytochrome c oxidase – COX). Ο HIF-1 επίσης κατευθύνει μια μεταβολή στην μονάδα υποστρώματος της COX που μπορεί να αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς ηλεκτρονίων σε υποξικές συνθήκες ελαττώνοντας την παραγωγή ROS [214].

Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο HIF-1 οργανώνει μοριακές απαντήσεις που διατηρούν την οξειδοαναγωγική ισορροπία απέναντι στα μεταβαλλόμενα επίπεδα O₂. Έτσι τα κύτταρα ελαττώνουν την παραγωγή ROS σε συνθήκες χρόνιας υποξίας, αλλά μόνο εφόσον ο HIF-1 είναι ενεργός.

4.2 Δέσμευση προς διαφοροποίηση - μεταβολισμός των λιπαρών οξέων

Καθώς τα HSCs εξέρχονται από την ηρεμία και επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο, η επιλογή μεταξύ ασύμμετρης και συμμετρικής διαίρεσης αποτελεί ένα από τα πρώτα

σημαντικά σημείο απόφασης που καθορίζουν την κυτταρική τύχη. Η ασύμμετρη διαίρεση δίνει γένεση σε δύο κύτταρα με διαφορετική τύχη, και αυτό επιτρέπει τη διατήρηση της δεξαμενής των HSCs και τη γένεση διαφοροποιούμενων προγονικών κυττάρων κατά την ομοιοστατική παραγωγή αίματος. Αντίθετα, η συμμετρική διαίρεση δίνει γένεση σε δύο κύτταρα με ίδια τύχη και μπορεί να οδηγήσει σε έκπτυξη της δεξαμενής των HSCs ή να αυξήσει τον αριθμό των διαφοροποιούμενων κυττάρων σε συνθήκες επείγουσας αιμοποίησης. Μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ συμμετρικών και ασύμμετρων διαιρέσεων των HSCs σχετίζεται επίσης με νοσολογικές οντότητες μεταξύ των οποίων τα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας και η λευχαιμική εκτροπή [215]. Η οξειδωση των λιπαρών οξέων (fatty acid oxidation – FAO) έχει αναδειχθεί ως κομβικός καθοριστής αυτών αποφάσεων της τύχης των HSCs. Η FAO αποτελείται από μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στην προοδευτική βράχυνση των λιπαρών οξέων και στην παραγωγή ακετυλ-CoA, το οποίο μπορεί εισέλθει στον TCA κύκλο και να παράγει μέσω β-οξειδωσης τόσο NADH όσο και FADH₂ και διπλάσιο ATP σε σχέση με το μεταβολισμό των υδατανθράκων [216]. Μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων του Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) είναι σημαντικοί ρυθμιστές της FAO [217] και η διαγραφή του PPARδ ή η άμεση φαρμακολογική αναστολή της FAO οδηγεί σε απώλεια των HSCs και παράλληλη συσσώρευση των δεσμευμένων προγονικών κυττάρων [218]. Ωστόσο ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο μεταβολικός άξονας PML/PPARδ/FAO προωθεί φυσιολογικά την αυτοανανέωση των HSCs και αντιτίθεται στη δέσμευσή τους είναι εν πολλοίς άγνωστος. Με βάση την παρατήρηση ότι τόσο το PML όσο και η FAO μπορεί να διατηρεί τα επίπεδα ATP στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού που έχουν χάσει την επαφή με την εξωκυττάρια ουσία [219], έχει προταθεί ότι ο μεταβολικός άξονας PML/PPARδ/FAO μπορεί να υποστηρίζει της ασύμμετρες διαιρέσεις μέσω παροχής αρκετών μορίων ATP στα HSCs όταν χάνουν την επαφή με την αιμοποιητική φωλιά κατά την κυτταρική διαίρεση [218]. Ωστόσο, η πιθανότητα αυτή παραμένει να ελεγχθεί απευθείας. Το PML έχει επίσης εμπλακεί στην έναρξη εξαρτώμενης από το p53 γήρανσης μέσω επαγωγής πρόωρης γήρανσης [220]. Ωστόσο η κυτταρική γήρανση δεν είναι ένα αποδεκτό χαρακτηριστικό των γηρασμένων HSCs [221,222], μια εξαρτώμενη από το p53 ελάττωση του πολλαπλασιασμού παρατηρείται όντως στην εκπτυγμένη αλλά στη λειτουργικά ανεπαρκή δεξαμενή των γηραιών HSCs [223], ισχυροποιώντας έτσι την ιδέα μιας λειτουργικής σύνδεσης μεταξύ PML, FAO και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου των HSCs. Που μπορεί να απορυθμισθεί με τη γήρανση. Ωστόσο παραμένει να καθοριστεί πως η διαμεσολαβούμενη από το PML ρύθμιση της FAO ελέγχει την ενεργότητα του κυτταρικού κύκλου των HSCs τόσο στα νεαρά όσο και στα γηραιά HSCs. Συνολικά οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι το μονοπάτι της FAO επηρεάζει τη δέσμευση των HSC επιτρέποντας της ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις, το οποίο μπορεί να είναι μια πιο απαιτητική σε ενέργεια επιλογή κυτταρικής τύχης σε σχέση με τη συμμετρική διαίρεση. Στο πλαίσιο αυτό είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η αναστολή της FAO οδηγεί σε διαφοροποιούμενες συμμετρικές διαιρέσεις παρά σε συμμετρικές διαιρέσεις αυτοανανέωσης [218] και είναι ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι μια αναστολή στη FAO μπορεί να διαταράσσει την αναερόβια γλυκόλυση και να αναγκάζει τα HSCs να αλλάξουν σε ένα πιο ενεργειακά αποδοτικό μεταβολικό πρόγραμμα όπως ο TCA κύκλο που είναι γνωστό ότι καθορίζει τη διαφοροποίηση. Είναι επίσης ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι η FAO μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά έναντι στην νεοπλασματική μετατροπή καθώς η συμμετρικές διαιρέσεις της αυτο-ανανέωσης που καταλήγουν σε μεγάλες δεξαμενές μακρόβιων HSCs φέρουν μεγαλύτερο κίνδυνο μετατροπής σε σχέση με τις διαιρέσεις

διαφοροποίησης που οδηγούν σε έκπτυξη μικρού χρόνου ζωής προγονικών κυττάρων [224].

4.3 Διαφοροποίηση – η στροφή στην οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η μετάβαση σε μια κατάσταση μεγαλύτερου πολλαπλασιασμού σχετίζεται που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση θέτει ένα μοναδικό συνδυασμό μεταβολικών αναγκών για τα HSCs. Τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα δεν πρέπει μόνο να παράγουν ενέργεια αλλά επίσης να ενεργοποιήσουν ένα μεγάλο αριθμό βιοσυνθετικών διεργασιών που απαιτούνται για την κυτταρική αναπαραγωγή [225]. Αντίστροφα, η διαφοροποίηση απαιτεί υψηλότερη παροχή ενέργειας για τη διατήρηση των εξειδικευμένων λειτουργιών των ώριμων κυτταρικών τύπων [201]. Η προσαρμογή σε μια κατάσταση υψηλής ενέργειας στηρίζεται στην τροποποίηση του μιτοχονδριακού δικτύου, η οποία διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από τη βιογένεση και την αποδόμηση καθώς και από τις δυναμικές διεργασίες σύντηξης και σχάσης [226]. Παρότι λίγα είναι γνωστά προς το παρόν για τα HSCs τα διαφοροποιούμενα καρδιομυοκύτταρα ενηλίκων και τα πρόδρομα κύτταρα των νευρώνων συνήθως παρουσιάζουν δομικά ώριμα μιτοχόνδρια με μια διάχυτη κυτταροπλασματική οργάνωση [227,228]. Σχετικά με την περιφερητική εντόπιση, μια διάχυτη κατανομή παρέχει καλύτερη ανταλλαγή ενέργειας και παροχή θρεπτικών συστατικών στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα [201]. Η δομική αναδιαμόρφωση της μιτοχονδριακής αρχιτεκτονικής συνοδεύεται από μια τάση για αυξημένη αναπαραγωγή του μιτοχονδριακού DNA για να στηρίξει τη μιτοχονδριακή βιογένεση, την παραγωγή των ενζύμων του TCA κύκλου και των υπομονάδων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και την προς τα κάτω ρύθμιση των γλυκολυτικών ενζύμων για τη στροφή σε έναν πιο αποδοτικό τρόπο παραγωγής ATP. Στην πραγματικότητα η ικανότητα των HSCs να διαφοροποιούνται εξαρτάται αυστηρά από στην ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως φαίνεται από ποντίκια με συστηματική/conditional απενεργοποίηση του *Ptpmt1* [229]. Η phosphatase and tensin homolog (PTEN)-like μιτοχονδριακή φωσφατάση PTPMT-1 (protein tyrosine phosphatase mitochondrial 1) είναι εντελώς απαραίτητη για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και η διαγραφή της οδηγεί σε ταχεία αιμοποιητική ανεπάρκεια λόγω της ανικανότητας των HSCs να υπόκεινται σε σχετιζόμενες με τη διαφοροποίηση διαιρέσεις τόσο σε *in vivo* όσο και σε *ex vivo* συνθήκες καλλιέργειας. Παρότι φαίνεται να υπάρχει ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ του μιτοχονδριακού μεταβολισμού, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, ο ακριβής μηχανιστικός σύνδεσμος λείπει ακόμη, παρότι αρκετές γραμμές ενδείξεων δείχνουν έναν κομβικό ρόλο για αλλαγές στην κυτταρική κατάσταση οξειδοαναγωγής και τα επίπεδα των ROS στη ρύθμιση των μεταβάσεων μεταξύ της αυτό-ανανέωσης και της διαφοροποίησης των HSCs.

4.4 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης των HSCs

Τα μιτοχόνδρια είναι οι βασικές πηγές ROS που μπορούν όχι μόνο να επάγουν οξειδωτικό στρες και βλάβη του DNA όταν υπερπαραγονται, αλλά μπορούν επίσης να δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι και να οδηγούν σε αλλαγές της κυτταρικής τύχης σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Στην πραγματικότητα, τα σχετικά ενδοκυττάρια επίπεδα ROS μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό των αρχέγονων HSCs, με τα χαμηλά σε ROS HSCs να δείχνουν ηρεμία και αυξημένο δυναμικό αυτοανανέωσης και τα υψηλά σε ROS HSCs να παρουσιάζουν σημαντική εξάντληση [161]. Μια μελέτη στη *Drosophila* δείχνει ότι τα ROS μπορούν να πυροδοτήσουν άμεσα τη διαφοροποίηση σε έναν

πληθυσμό αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων παρόμοιων με τα μυελικά προγονικά κύτταρα των θηλαστικών [230]. Το αποτέλεσμα της διαφοροποίησης καθυστερεί σημαντικά με την έκφραση αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών, προτείνοντας επομένως ένα ρόλο για τα αναπτυξιακά ρυθμιζόμενα επίπεδα ROS στην προώθηση των προγονικών κυττάρων σε διαφοροποίηση. Τα ρυθμιστικά αποτελέσματα των ROS στα χαρακτηριστικά της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των HSCs και άλλων ενήλικων σωματικών στελεχιαίων κυττάρων μπορούν να αποδοθούν σε διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεταβολής της δράσης ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγή μεταγραφικών παραγόντων όπως οι σχετιζόμενες με το p38 μιτογόνο κινάσες (MAPKs), τα μέλη της οικογένειας FOXO, το P53 και ο NF-κB [180,231-234] ή βασικοί επιγενετικοί ρυθμιστές όπως οι αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) και οι πρωτεΐνες της polycomb ομάδας [235].

Επιπλέον στοιχεία που συνδέουν τα ROS με τη λειτουργία των HSCs προέρχονται επίσης από πρόσφατες μελέτες στην αυτοφαγία, ένα μείζων κυτταρικό μηχανισμό που λειτουργεί ανανεώνοντας και αναδιαμορφώνοντας τα κύτταρα περιορίζοντας τα κατεστραμμένα οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια (μιτοφαγία) [236] και έτσι περιορίζοντας την παραγωγή ROS (όπως αναλύεται στο Κεφάλαιο 5).

Η ανάγκη για αυστηρό συντονισμό στην οξειδοαναγωγική κυτταρική κατάσταση των HSCs εγγυάται επίσης την παρουσία αυστηρών μηχανισμών ρύθμισης των επιπέδων ROS και της καταλληλότητας των μιτοχονδρίων. Μια πρόσφατη μελέτη εμπλέκει τον πιθανό ρόλο της connexin-43, ενός συστατικού των διασταυρώσεων κενών (gap junctions), στην αρνητική ρύθμιση των επιπέδων ROS στα HSCs μετά από μυελοαφανιστικό στρες [237]. Η connexin-43 εξυπηρετεί ένα αντιοξειδωτικό ρόλο μεταφέροντας τα ενδογενή ROS στα γειτονικά στρωματικά κύτταρα του MO και είναι επίσης σημαντική στο να διαμεσολαβεί την κυτταρική επαφή μεταξύ των HSCs και των στρωματικών κυττάρων. Επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να εκτιμηθεί εάν η connexin-43 ρυθμίζει απευθείας τη σταθερή κατάσταση των επιπέδων ROS και επομένως επηρεάζει την απόφαση της τύχης των HSCs. Μέλη της οικογένειας BCL2 αποπτωτικών παραγόντων έχουν επίσης εμπλακεί στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των HSCs μέσω τροποποίησης της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της παραγωγής ROS [238,239]. Πέρα από τη δράση τους ως αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες οι MCL1 και BCLXL εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή μήτρα και διευκολύνουν βασικές μιτοχονδριακές λειτουργίες όπως οι σύντηξη/σχάση και η οξειδωτική αναπνοή [240-243]. Με βάση αυτό θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί αν αλλαγές στην ικανότητα να οδηγούν σε παραγωγή ROS υπόκεινται της διαφορετικής δράσης των πρωτεϊνών της οικογένειας VCL2 στη διαφοροποίηση των HSCs και ειδικά της MCL1 που έχει φανεί σημαντική στη μυελική διαφοροποίηση [240,243]. Είναι επίσης σημαντικό να μελετηθεί αν οι πρωτεΐνες της BCL2 οικογένειας επηρεάζουν άλλες απόψεις των ενεργητικών των μιτοχονδρίων όπως ο λόγος NAD/NADH, η παραγωγή σιδήρου ή ομοιόσταση του ασβεστίου που μπορεί επίσης να παίζουν ρόλο στις αποφάσεις της τύχης των HSCs.

Οι PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1) και PGC-1β έχουν αναδειχθεί ως μέγιστη ρυθμιστές της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Ο PGC-1α ρυθμίζει επίσης την παραγωγή πολλών αντιοξειδωτικών των ROS ενζύμων. Ο PGC-1α ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα c-Myc. Είναι ενδιαφέρον ότι HSCs με έλλειψη του c-Myc μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά, αλλά δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν, υποδηλώνοντας ότι ο c-Myc είναι απαραίτητος για τα πολλαπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα, παρά για τα αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται

σε ηρεμία [244]. Τα επίπεδα του c-Myc σχετίζονται θετικά με τον κυτταρικό κύκλο στα HSCs και ρυθμίζονται από την E3 λιγκάση ουβικιτίνης Fbxw7, η οποία ρυθμίζεται θετικά σε υποξικές συνθήκες [245,246]. Σε συμφωνία με την ιδέα ότι οι PGCs είναι βασικοί ρυθμιστές της μιτοχονδριακής φυσιολογίας και του μεταβολισμού [247], οι Sahin και συνεργάτες έδειξαν ότι η δυσλειτουργία των τελομερών σχετίζεται με επηρεασμένη μιτοχονδριακή βιογένεση και λειτουργία, ελαττωμένη γλυκονεογένεση και αυξημένη παραγωγή ROS [248].

Συνοψίζοντας, αυτές οι πρόσφατες μελέτες καταλήγουν σε ένα μοντέλο ρεοστάτη όπου τα χαμηλά επίπεδα ROS στα εν ηρεμία HSCs μπορούν να καταστέλλουν τη δέσμευση για διαφοροποίηση ενώ η αύξηση των επιπέδων των ROS επαγόμενη από τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση μπορεί να δεσμεύει το κύτταρο σε προγράμματα διαφοροποίησης.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντικά βιοενεργητικά σημεία και παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα HSCs παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα τόσο βασικής όσο και μέγιστης αναπνοής σε σχέση με τα προγονικά κύτταρα και η σωστή ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας είναι ένας παράγοντας κλειδί για τη διατήρηση των HSCs [249]. Τα HSCs διατηρούνται σε μια όσο το δυνατόν πιο ήρεμη κατάσταση ώστε να αποφύγουν την απώλεια της ικανότητας τους να επαναγκαθιστούν αιμοποίηση και όπως και τα στελεχιαία κύτταρα άλλων ιστών βασίζονται στη γλυκόλυση παρά στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η αυξημένη οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι καταστροφική για τη διατήρηση και τη λειτουργία των HSCs [162,177,200] και η είσοδος σε κυτταρικό κύκλο αυξάνει τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS μέσω της ενεργοποίησης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Καθώς τα ήρεμα HSCs είναι γενικά ευαίσθητα στην αύξηση των ROS, οι επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις οδηγούν σε ελαττωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και τελικά σε εξάντληση των HSCs [150,179,250,251]. Για παράδειγμα πρόσφατες μελέτες των Mohrin και συνεργατών έδειξαν ότι η διαγραφή της αποακετυλάσης ιστονών *Sirtuin7* (*Sirt7*) αύξησε το μιτοχονδριακό στρες αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (protein folding stress -PFS) στα HSCs μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα (Nuclear respiratory factor – Nrf1). Η διαταραχή αυτού μεταβολικού σημείου ελέγχου οδηγούσε σε απώλεια της ηρεμίας των HSCs και ελάττωνε την αναγεννητική ικανότητα με bias της διαφοροποίησης προς μυελική σειρά. Η έκφραση της *Sirt7* ελαττώνεται στα πιο γηρασμένα HSCs, υποδηλώνοντας ότι η προς τα κάτω ρύθμισή της συμβάλει στη λειτουργική ελάττωση των γηράσκοντων HSCs. Όντως η επανεισαγωγή της *Sirt7* στα γηρασμένα HSCs ελαττώνει το PFS και βελτιώνει την ικανότητα αυτοανανέωσής τους [252,253](73,74). Μετά τη διαφοροποίηση τους τα HSCs οφείλουν να στραφούν προς το μιτοχονδριακό μεταβολισμό για να καλύψουν της ταχέως αυξανόμενες ανάγκες για ενέργεια. Το *Ptpmt1* κωδικοποιεί μια PTEN-like μιτοχονδριακή φωσφατάση και η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής μέσω συστηματικής αποσιώπησης του *Ptpmt1* επηρέαζε τη διαφοροποίηση των HSCs, ενώ ο πληθυσμός των HSCs αυξάνεται δραστικά [229].

Τα μιτοχόνδρια μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή κυτταρικής κατεύθυνσης πέρα από τη διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυξανόμενα στοιχεία καταδεικνύουν ότι τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στη διατήρηση της ικανότητας αυτό-ανανέωσης των HSCs συνδέοντας τον κυτταρικό μεταβολισμό και την επιγενετική [254-257]. Επιπλέον ένας ρυθμιστής της μιτοχονδριακής fusion, η μιτοφουσίνη (mitofusin-2, Mfn2), Η οποία επάγεται από τη βραχεία ισομορφή του PR domain containing 16 (Prdm16)

είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των HSCs και ειδικά σημαντική για τη διαφοροποίηση προς τη λεμφική σειρά. Αυτό διαμεσολαβείται από την ενδοκυττάρια ρύθμιση ασβεστίου που παρέχεται από τη διασυνδεδεμένη με το ενδοπλασματικό δίκτυο λειτουργία των μιτοχονδρίων [258,259]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου Ca^{2+} μέσω της εξωγενούς αδενοσίνης έχουν βρεθεί να αποτελούν σημαντικό ρυθμιστή της τύχης των HSCs [260].

4.5 Βιοενεργητικά μονοπάτια ανταπόκρισης στις μεταβολικές αλλαγές

Υπάρχει εκτεταμένη αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτταρικού μεταβολισμού και των δικτύων σηματοδότησης. Η πληροφορία για τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών αναμεταδίδεται αρχικά μέσω μεταβολικών αισθητήρων και μετά μεταδίδεται μέσω ενός σύνθετου δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών για να επηρεάσει τελικά της κυτταρικές αποφάσεις. Ως εκ τούτου δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η σύνδεση μεταξύ σηματοδοτικών μηχανισμών και μεταβολικών αισθητήρων επηρεάζει σημαντικά τη βιολογία των HSCs.

Πρόσφατες μελέτες συνέβαλαν στην εδραίωση του γεγονότος ότι μεταβολικοί ανιχνευτές μεταφράζουν πληροφορίες που αφορούν στα επίπεδα ενέργειας του κυττάρου σε βιολογικές απαντήσεις των HSCs μέσω δύο βασικών σηματοδοτικών δρόμων – της παραγωγής ROS και της μεταβολής της FAO. Ο άξονας LKB1/AMPK ανιχνεύει κυρίως τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας και απαντά κυρίως μέσω ενεργοποίησης της FAO για να ρυθμίσει την ηρεμία και την αυτό-ανανέωση των HSCs. Αντίθετα, το δίκτυο σηματοδότησης PI3K/mTOR, το οποίο ακολουθεί την ενεργοποίηση υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, επηρεάζει τη βιολογία των HSC μέσω τροποποίησης των επιπέδων ROS και οδηγεί στον πολλαπλασιασμό και τη δέσμευση. Ωστόσο και οι δύο τύποι μεταβολικών αισθητήρων έχουν ένα σημαντικό βαθμό αλληλορύθμισης και αντικρούονται προκειμένου να επηρεάσουν τη συνολική βιολογία του κυττάρου.

4.5.1 Ο άξονας PI3K/mTOR

Ο mTOR είναι ένας βασικός αισθητήρας που αναμεταδίδει σήματα από θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες προκειμένου να ρυθμίσει πολλαπλές διαδικασίες όπως η μετάφραση, η αυτοφαγία και η βιογένεση των μιτοχονδρίων [261]. Ο mTOR ανευρίσκεται σε δύο διακριτά συμπλέγματα, τον mTORC1 και τον mTORC2, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τις διαδοχικές τους δομικές τους πρωτεΐνες RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR complex) και RICTOR (RAPTOR independent companion of mTOR complex 2) και η δραστηριότητά του ρυθμίζεται θετικά από τον καταρράκτη σηματοδότησης της PI3K. Η ενεργοποίηση της PI3K μέσω υποδοχέων τυροσινικής κινάσης και άλλων μηχανισμών έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη ενεργοποίηση της AKT, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί το TSC (tuberous sclerosis complex), έναν αρνητικό ρυθμιστή του mTOR. Αντίθετα, το ογκοκατασταλτικό PTEN ρυθμίζει αρνητικά την PI3K [262] και επομένως καταστέλλει τη δραστηριότητα του mTOR. Πολλά γενετικά μοντέλα έχουν υπονοήσει ένα ρόλο κλειδί του άξονα PI3K/mTOR στη ρύθμιση της ενήλικης αιμοποίησης είτε μέσω απώλειας λειτουργίας αλληλίων του *Pten* ή του *Tsc1* ή μέσω μεταλλάξεων αύξησης της δράσης στην *Akt*, που όλα οδηγούν σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των HSC και εξάλειψη [263-267]. Αντίθετα η διαγραφή του *Akt1/2* προωθεί την αυξημένη ηρεμία των HSCs (66). Μια σαφής ένδειξη ότι η επίδραση αυτών των μονοπατιών στα HSCs μεσολαβείται από μεταβολικές διαταραχές προέρχεται από μοντέλα ανεπάρκειας του *Tsc1* και *Akt1/2* [265,268]. Τα HSCs με έλλειψη του *Akt1/2* δείχνουν

αυξημένη ηρεμία και διαταραχή στη διαφοροποίηση, φαινόμενο το οποίο διασώζεται φαρμακολογικά αυξάνοντας τα επίπεδα των ROS. Αντίθετα, η υπερενεργοποίηση του mTOR μέσω διαγραφής του *Tsc1* οδηγεί σε μια γρήγορη έξοδο από την ηρεμία και την είσοδο σε κυτταρικό κύκλο, γεγονός που συνοδεύεται από αύξηση της μιτοχονδριακής βιογένεσης και των επιπέδων ROS. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν ένα μοντέλο όπου η ενεργοποίηση του mTOR προωθεί τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και την παραγωγή ROS, υποστηρίζοντας έτσι ένα πρόγραμμα πολλαπλασιασμού και ενεργοποίησης και παρέχοντας υποστήριξη στο μοντέλο ρεοστάτη των ROS. Επιπλέον ως αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας η ενεργοποίηση του mTOR μπορεί να ασκήσει αυτές τις επιδράσεις μέσω καταστολής της αυτοφαγίας η οποία στη συνέχεια μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραγμένη μιτοχονδριακή κάθαρση και την παραγωγή ROS. Επιπρόσθετα αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί ο RICTOR είναι περιττός για τα HSCs που βρίσκονται σε ηρεμία, αλλά είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό [269]. Εκτός αυτού η αναστολή του mTOR από τη ραπαμυκίνη διασώζει μερικώς τη διαταραχή συντήρησης στα HSCs με έλλειψη του *Pml* [218] και έχει φανεί ότι αυξάνει τη FAO σε άλλους κυτταρικούς τύπους [270] έσω ενεργοποίησης μελών της οικογένειας PPAR [271]. Επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η κατάσταση του μονοπατιού της FAO σε HSCs με μεταλλαγμένο *Tsc1* με υπερευγόμενο mTOR καθώς η ελαττωμένη FAO και οι αυξημένες συμμετρικές διαιρέσεις μπορεί να συμβάλλουν στην εξάλειψη των HSCs σε ποντίκια.

4.5.2 Ηπατική κινάση B (*Liver kinase B LKB1*)/AMPK

Η LKB1 και ο ακόλουθος στόχος της η AMPK ενεργοποιούνται σε περιόδους χαμηλών επιπέδων ATP και απαντούν ενεργοποιώντας καταβολικές διαδικασίες όπως η FAO, η αναερόβια γλυκόλυση και η αυτοφαγία για να επαναφέρουν τα επίπεδα ενέργειας [272]. Παρομοίως οι αναβολικές διαδικασίες καταστέλλονται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω απενεργοποίησης του mTORC1. Μελέτες που διερευνούν το ρόλο της LKB1 στη διατήρηση των HSCs αναδεικνύουν συστηματικά την απώλεια της ηρεμίας η οποία συνοδεύεται από λειτουργική εξάντληση των HSCs και αυτό φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενο από τη δραστηριότητα της AMPK και του mTORC1 [247,273,274]. Επιπλέον σε αντίθεση με την ανεπάρκεια του *Pten*, η απώλεια των HSC σε *Lkb1 null* ποντίκια δε διασώζεται με εξουδετέρωση των ROS, αλλά συνοδεύεται από μια ελάττωση του αριθμού των μιτοχονδρίων και του δυναμικού τους και ελαττωμένα επίπεδα ATP. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν έναν ανεξάρτητο από τα ROS δρόμο για τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που μπορεί να προκύπτει από ελαττωμένη έκφραση των συνενεργοποιητών του PPAR γ , PGC-1 α και β , οι οποίοι είναι κύριοι μεταγραφικοί ρυθμιστές της μιτοχονδριακής βιογένεσης [247]. Καθώς οι PGC-1 α/β είναι οι κύριοι συνενεργοποιητές των μελών της οικογένειας PPAR, είναι ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι η ανεπάρκεια του *Lkb1* μπορεί να επηρεάζει αρνητικά την ηρεμία των HSC και τη δραστηριότητά τους ελαττώνοντας τη FAO μέσω των δράσεών της στο μεταβολικό άξονα PML/PPAR δ /FAO. Είναι ενδιαφέρον ότι η ελάττωση των υγιών μιτοχονδρίων αλλά όχι η εξάλειψη των HSC, εκφράζεται φαινοτυπικά σε ποντίκια με έλλειψη του *Ampk* [274] και οι δύο καταλυτικές περιοχές της AMPK εκφράζονται σε υψηλό βαθμό στα HSCs οδηγώντας στην πιθανότητα ότι η AMPK μπορεί να παίζει ένα συνεργιστικό ρόλο με την LKB1 στη ρύθμιση της υγείας των μιτοχονδρίων σε συνδυασμό με άλλες κινάσες που έπονται της LKB1. Επιπλέον καθώς ο άξονας LKB1/AMPK είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής της αυτοφαγίας μέσω μονοπατιών εξαρτώμενων και μη από τον mTOR [275,276] είναι πιθανό

ότι τα αλλαγμένα μεταβολικά χαρακτηριστικά (ιδίως οι αλλαγές στη μιτοχονδριακή μάζα και τα ελαττωμένα επίπεδα ATP) που ανευρίσκονται σε απουσία των LKB1 και AMPK μπορεί να οφείλονται επίσης σε ελαττωμένα επίπεδα αυτοφαγίας. Ωστόσο παραμένει να καθοριστεί αν η βλάβη στην αυτοφαγία συμβάλλει στους φαινοτύπους των HSCs στα ποντίκια με έλλειψη *Lkb1* και *Ampk*.

4.6 Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός : ένας δρόμος διαφυγής των λευχαιμικών αρχέγονων κυττάρων

Μια αλλαγή στην ισορροπία μεταξύ ηρεμίας, αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης υπόκειται την έναρξη των περισσότερων αιματολογικών κακοηθειών. Οι μυελικές διαταραχές όπως η χρόνια ή η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι κλωνικές και μπορούν να αναπτυχθούν από μεταμορφωμένα HSCs με τα ιδιότητες αρχέγονων κυττάρων που δίνουν γένεση στη λευχαιμία (leukemia initiating stem cell LSC) και απεριόριστο δυναμικό αυτό-ανανέωσης και έκπτυξης [277]. Τα LSCs πιστεύεται ότι είναι τα αρχικά κύτταρα που οδηγούν στην ανάπτυξη λευχαιμίας και τη θεραπευτική αντοχή [278]. Πρόσφατες μελέτες στο μεταβολισμό των HSC παρέχουν καινούρια δεδομένα στη πιθανή σύνδεση μεταξύ της μεταβολικής δυσλειτουργίας των HSCs και την έναρξη αιματολογικών κακοηθειών.

Το φαινόμενο Warburg αφορά στην αυξημένη εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων στην αναερόβια γλυκόλυση ακόμα και παρουσία οξυγόνου. Παρότι αυτό μπορεί να ισχύει για τους περισσότερους τύπους κακοηθειών, τα LSCs στην οξεία μυελογενή λευχαιμία εξαρτώνται σημαντικά από τη μιτοχονδριακή αναπνοή για την επιβίωσή τους [279]. Στην πραγματικότητα τα ήρεμα LSCs αποτυγχάνουν να αυξήσουν ή να χρησιμοποιήσουν το γλυκολυτικό μηχανισμό όταν τα μιτοχονδριακά ενεργειακά μονοπάτια μπλοκάρονται. Αυτή είναι η χαρακτηριστική διαφορά από τα φυσιολογικά HSCs και προσφέρει μια σημαντική θεραπευτική δυνατότητα ειδικά στοχεύοντας τα «ύπουλα» αρχέγονα κύτταρα στη λευχαιμία. Το μονοπάτι PML/PPARδ/FAO προσφέρει μια συναρπαστική ευκαιρία υπό αυτή την έννοια. Στοχεύοντας το PML με χημικές ουσίες όπως το τριοξειδίο του αρσενικού ωθεί τα LSCs εκτός ηρεμίας και επάγει την είσοδο σε κυτταρικό κύκλο [219] και αυτό υποδηλώνει ότι οι αναστολές της FAO μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προάγουν την εξάντληση των LSC σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά που στοχεύουν τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα [218]. Στην πραγματικότητα η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι ουσιαστικά ανέπαφη στα λευχαιμικά κύτταρα, η σύνθεση του ATP αποδεδειγμένη από την κατανάλωση οξυγόνου και αυτό οδηγεί σε ελαττωμένη είσοδο του πυροσταφυλικού οξέος στον TCA κύκλο και αυξημένη οξειδωση εναλλακτικών πηγών άνθρακα όπως τα λιπαρά οξέα [280]. Αυτή η αυξημένη εξάρτηση από τη FAO έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για να ευαισθητοποιήσει τα λευχαιμικά κύτταρα σε επαγωγείς της απόπτωσης [280]. Η μιτοχονδριακή λειτουργία και τα επίπεδα ROS μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως ελκυστικοί τροποποιητές της λειτουργίας των LSC και της επιβίωσής τους. Τα χαμηλά επίπεδα ROS και μεταβολικού ρυθμού χαρακτηρίζουν την πλειονότητα των λειτουργικά χαρακτηρισμένων LSCs στην οξεία μυελογενή λευχαιμία [279], τα οποία εκφράζουν επίσης υψηλά επίπεδα των γονιδίων BCL2 όπως έχει ήδη ανευρεθεί στα φυσιολογικά HSCs [281]. Ωστόσο αυτά τα χαμηλά σε ROS LSCs αποτυγχάνουν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκόλυση όταν η μιτοχονδριακή αναπνοή παρεμποδίζεται, καθιστώντας έτσι την επιβίωσή τους μοναδικά εξαρτώμενη από την άθικτη μιτοχονδριακή λειτουργία [279]. Είναι ενδιαφέρον ότι η μελέτη αυτή έχει αναδείξει έναν νέο κυτταροτοξικό ρόλο της αναστολής του BCL2, η οποία στηρίζεται στην αναστολή της οξειδωτικής φωσφορλίωσης και την επιλεκτική αναστολή της παραγωγής ενέργειας στα

χαμηλά σε ROS LSX πυροδοτώντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο. Αυτά ρίχνει φως στην ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ κοινά μελετώμενων ρυθμιστών της κυτταρικής επιβίωσης και του μοναδικού δικτύου του μεταβολισμού στα LSCs που θα μπορούσε να παρέχει ειδικούς θεραπευτικούς στόχους. Η εξάρτηση των LSCs από την οξειδωτική φωσφορλίωση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάδειξη ενζύμων των μιτοχονδρίων που θα μπορούσαν να στοχευθούν και υπόκεινται της εξάρτησης των LSCs σε μιτοχονδριακά οξειδωτικά μονοπάτια. Η τροποποίηση των ROS έχει αναδειχθεί επίσης ως έναν από τους επαγωγείς κλειδιά για τα θεραπευτικά οφέλη των στρατηγικών διαφοροποίησης. Για παράδειγμα η θεραπεία στέρησης σιδήρου που ελαττώνει τους λευχαιμικούς βλάστες προωθώντας την ωρίμανση των μονοκυττάρων εξαρτάται από τη δημιουργία ROS από χηλικούς παράγοντες προκειμένου να πυροδοτήσουν τη διαφοροποίηση μέσω ενός JNK εξαρτώμενου τρόπου [282].

Οι μεταβολίτες του TCA κύκλου που παρατηρούνται σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα εντοπίζονται επίσης και στα HSCs. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την αφυδρογονάση του ισοκιτρικού (isocitrate dehydrogenase IDH) έχουν εντοπισθεί ως μεταλλαγμένα ογκογονίδια σε υψηλά ποσοστά σε γλοιώματα και σε οξεία μυελογενή λευχαιμία [283,284]. Οι IDH1 και IDH2 είναι ομοδιμερή, εξαρτώμενα από NADP⁺ και NAD⁺ ένζυμα αντίστοιχα. Και οι δύο μετατρέπουν το ισοκιτρικό σε 2-οξογλουταρικό (2-oxoglutarate - 2-OG) και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Η δραστηριότητα της IDH2 αποτελεί ένα περιοριστικό βήμα του ρυθμού του κύκλου TCA, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση ATP, ενώ η IDH1 λειτουργεί σε αναερόβιες συνθήκες. Το μεταβολικό προφίλ δείχνει ότι τα κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένες IDH1 ή IDH2 παράγουν υψηλά επίπεδα 2-υδροξυγλουταρικού (2-hydroxyglutarate - 2-HG), ενός μεταβολίτη που ανιχνεύεται επίσης στα λευχαιμικά κύτταρα [285]. Η διαμόλυνση των αιμοποιητικών κυττάρων με μεταλλαγμένη IDH2 επηρεάζει τη διαφοροποίησή τους [255]. Η διαμεσολαβούμενη από τη μεταλλαγμένη IDH νέο-αντίδραση απαιτεί 2-OG προερχόμενο από τη γλουταμίνη. Η γλουταμίνη μετατρέπεται σε γλουταμικό από τη γλουταμινάση και καταβολίζεται περαιτέρω σε 2-OG για να εισέλθει στον κύκλο TCA. Η γλουταμινόλυση ελέγχεται από το c-Myc μέσω ενός συντονισμένου μεταγραφικού προγράμματος [286]. Πολλά καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν απουσία εξωγενούς γλουταμίνης και παρουσιάζουν εξάρτηση από τη γλουταμίνη [287].

Σε σύνδεση με το 2-OG, η απώλεια του TET2 (ten-eleven translocation 2) επάγει αυξημένη αυτό-ανανέωση των HSCs και μυελική μετατροπή οδηγώντας σε καταστάσεις όπως η ΟΜΛ και τα ΜΔΣ [288]. Το TET2 κωδικοποιεί ένα συνδεδεμένο με το O₂, εξαρτώμενο από το 2-OG ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της 5-μεθυλκυτοσίνης σε 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη οδηγώντας σε ακόλουθη απομεθυλίωση του DNA [289]. Η έκφραση μεταλλαγμένης IDH μιμείται την απώλεια λειτουργίας της TET2. Η μεθυλίωση της κυτοσίνης αποτελεί μια βασική ομοιοπολική μετατροπή του γενωμικού DNA και μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της επιγενετικής κατάστασης των HSCs [288].

Κεφάλαιο 5: Αυτοφαγία και αιμοποίηση

5.1 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια κυτταρική διεργασία ανακύκλωσης, μέσω της οποίας κυτταρικά στοιχεία αποδομούνται μέσω ενσωμάτωσης οργανιδίων ή τμημάτων του κυτταροπλάσματος σε διπλής μεμβράνης αυτοφαγοσώματα, τα οποία συντήκονται με λυσοσώματα, οδηγώντας στη διάσπαση μέσω υδρολασών.

Η κυτταρική ομοιόσταση επιτυγχάνεται μέσω της ισορροπίας βιοσύνθεσης και αποδόμησης. Στα ευκαριωτικά κύτταρα το λυσόσωμα αποτελεί το κύριο οργανίδιο αποδόμησης, μέσω του μεγάλου εύρους υδρολασών που περιέχει. Η αυτοφαγία, ως μηχανισμός προσαρμογής, σε μη ευνοϊκές για το κύτταρο συνθήκες, όπως η στέρση θρεπτικών συστατικών, διαμεσολαβεί μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διεργασία αποδόμησης των ίδιων των συστατικών του κυττάρου μέσω των λυσοσωμάτων. Τα αυτοφαγοσώματα, τα οποία ουσιαστικά αποτελούν «μεταφορείς» διπλής μεμβράνης, ενσωματώνουν στο εσωτερικό τους γηρασμένες πρωτεΐνες, κατεστραμμένα οργανίδια ή ακόμη και παθογόνους μικροοργανισμούς, και μεταφέρουν αυτό τους το «φορτίο» στα λυσοσώματα. Η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με τη λυσοσωμική μεμβράνη και το εσωτερικό του αυτοφαγοσώματος αποδομείται. Τα μακρομόρια που προκύπτουν μπορούν να αποδοθούν πίσω στο κυτταρόπλασμα και να επαναχρησιμοποιηθούν σε συνθήκες στέρσης θρεπτικών συστατικών [290]. Η δυσλειτουργία της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει σε μια ποικιλία νόσων, μεταξύ των οποίων ο καρκίνος, η νευροεκφύλιση, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και οι λοιμώξεις από μικρόβια, καθώς η αποδοτική κάθαρση των μη απαραίτητων ή κατεστραμμένων κυτταρικών ή ξένων στοιχείων είναι ζωτική για την κυτταρική επιβίωση και λειτουργία.

5.1.1 Μοριακοί μηχανισμοί της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία είναι μια διεργασία που διαίρεται σε μηχανιστικά διακριτά βήματα, την επαγωγή, την αναγνώριση και επιλογή των προς αποδόμηση στοιχείων, τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος, τη σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσοσώματος και την αποδόμηση των κυτταρικών στοιχείων που έχουν επιλεγεί με την ακόλουθη απελευθέρωση των προϊόντων αποδόμησης πίσω στο κυτταρόπλασμα. Διαφορετικοί συνδυασμοί σχετιζόμενων με την αυτοφαγία πρωτεϊνών (Atg) συμμετέχουν στα βήματα αυτά και αποτελούν τον πυρήνα του αυτοφαγικού μηχανισμού.

Επαγωγή – Σε φυσιολογικές συνθήκες τα βασικά επίπεδα αυτοφαγίας διατηρούνται χαμηλά. Επομένως απαιτείται ένας αποδοτικός μηχανισμός για την επαγωγή της αυτοφαγίας σε συνθήκες στρες ή σε απάντηση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Στα θηλαστικά, οι κινάσες ULK1 (Unc-51-like kinase 1) και ULK2 (Unc-51-like kinase 2) σχηματίζουν σύμπλεγμα τις πρωτεΐνες FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200kD) και Atg13 και εντοπίζονται στο φαγοφόρο σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών [291,292]. Έχει προταθεί ότι η FIP200 και η Atg13 φωσφορυλιώνονται από τις ULKs και ότι οι ίδιες οι ULKs αυτοφωσφορυλιώνονται, με αποτέλεσμα την αλλαγή στη διαμόρφωσή τους και την επαγωγή αυτοφαγίας [292]. Φαίνεται ότι το σύμπλεγμα ULKs-Atg13-FIP200 είναι σχετικά σταθερό ανεξάρτητα από τις συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα των θηλαστικών. Ο mTOR αλληλοεπιδρά, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τις ULKs και την Atg13 σε συνθήκες

αυξημένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Η αναστολή του mTOR, είτε μέσω στέρησης θρεπτικών συστατικών είτε μέσω δράσης της ραπαμυκίνης, οδηγεί σε ενεργοποίηση των ULK1 και ULK2 και φωσφορυλίωση των Atg13 και FIP200, συμβάλλοντας στην επαγωγή της αυτοφαγίας [292].

Αναγνώριση και επιλογή των προς αποδόμηση κυτταρικών στοιχείων – Στην επιλεκτική αυτοφαγία, τα προς αποδόμηση κυτταρικά στοιχεία αναγνωρίζονται μέσω αλληλεπιδράσεων ειδικών πρωτεϊνικών υποδοχέων. Μια σημαντική δράση της αυτοφαγίας είναι η κάθαρση κυτταροπλασματικών ουβικιτινιωμένων υποστρωμάτων ή πρωτεϊνών που έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα. Αυτή η επιλεκτική διεργασία της αποδόμησης διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη p62/SQSTM1 (sequestosome 1) [293]. Η p62/SQSTM1 δεσμεύει απευθείας τόσο πολύ-ουβικιτινιωμένα όσο και μονο-ουβικιτινιωμένα υποστρώματα μέσω της σχετιζόμενης με ουβικιτίνη περιοχής της (UBA – ubiquitin associated) και μέσω της πρωτεΐνης LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), συνδέοντας έτσι τα ουβικιτινιωμένα υποστρώματα με την αυτοφαγική μηχανή για ακόλουθη αποδόμηση [294,295].

Σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος – Τα διπλής μεμβράνης αυτοφαγοσώματα σχηματίζονται στην προαυτοφαγοσωματική δομή (PAS – pre-autophagosomal structure) μέσω προσθήκης μεμβρανών. Ο σχηματισμός του αρχικού πυρήνα και η συναρμολότητα της αρχικής φαγοφόρου μεμβράνης απαιτεί το σύμπλεγμα της κινάσης της φωσφατιδυλινωσινόλης 3 (PI3K, phosphatidylinositol 3), το οποίο αποτελείται από τα PI3K-Vps34 (vacuolar protein sorting 34), p150, mAtg14 και Beclin 1 [296-298]. Η λειτουργία της Beclin 1 στην αυτοφαγία ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη Bcl2 (B-cell lymphoma/leukemia 2), μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη που αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω σύνδεσης και απομόνωσης της Beclin 1 σε συνθήκες υψηλής παροχής θρεπτικών συστατικών. Η επαγωγή της αυτοφαγίας απαιτεί την αποδέσμευση της Beclin 1 από την Bcl2. Το σύμπλεγμα της PI3K παράγει PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) και εμπλέκεται στη στρατολόγηση προς το PAS αρκετών αυτοφαγικών πρωτεϊνών οι οποίες δεσμεύονται στην PI3P, όπως η Atg18, Atg20, Atg21 και Atg24 [299-301]. Το σύμπλεγμα της PI3K μαζί με τις ανωτέρω Atg πρωτεΐνες, στρατολογεί επιπλέον δύο σχετιζόμενα μεταξύ τους συστήματα σύζευξης που μοιάζουν με ουβικιτίνη (Ubl – ubiquitin like), τα Atg12-Atg5-Atg16 και Atg8-PE (phosphatidylethanolamine), τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στην επιμήκυνση της μεμβράνης και την έκπτυξη του σχηματιζόμενου αυτοφαγοσώματος [302,303]. Η Atg7 προωθεί την επιμήκυνση της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος καταλύοντας την ομοιοπολική σύνδεση της Atg12 με την Atg5 και εκείνη των μελών της οικογένειας Atg8 (συμπεριλαμβανομένης της LC3) με τη PE [304]. Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών, η Atg8 ή LC3 είναι κυρίως κυτταροπλασματική. Κατά την έναρξη της αυτοφαγίας η LC3 ανευρίσκεται συζευγμένη με λιπίδια και εντοπίζεται και στις δύο πλευρές του φαγοφόρου [305]. Η LC3 ελέγχει το μέγεθος του αυτοφαγοσώματος, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά της να καθορίζει την καμπυλότητα της μεμβράνης [306]. Η σύζευξη της LC3 με λιπίδια χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της επαγωγής της αυτοφαγίας. Ποικίλες πηγές, μεταξύ των οποίων τα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο, έχουν προταθεί ως η προέλευση της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος [307]. Ωστόσο δεν είναι σαφές μέσω ποιου μηχανισμού οι επιπρόσθετες μεμβράνες αποδίδονται και συντήκονται με το αναπτυσσόμενο φαγόσωμα. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο αυτοπολυμερισμός της Atg9 μπορεί να διευκολύνει τη σύνδεση ή/και τη σύντηξη των μεμβρανών [308]. Η Atg9 μετατοπίζεται από

το trans-Golgi δίκτυο στα τελικά ενδοσώματα, τα οποία σημαίνονται επίσης με την LC3, 'κατά την έναρξη της αυτοφαγίας. Η ανακατανομή της Atg9 από το Golgi στα τελικά ενδοσώματα εξαρτάται από την ULK1 και την Atg13 [309,310].

Σύντηξη του αυτοφαγοσώματος και τελική αποδόμηση – Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος, η Atg8/LC3 που είναι δεσμευμένη στην εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος αποδεσμεύεται την PE με τη δράση της Atg4 και απελευθερώνεται πίσω στο κυτταρόπλασμα [311]. Η σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσσοσώματος διαμεσολαβείται από τους ίδιους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ομοτυπική σύντηξη μεμβράνης των κενοτοπίων. Η σύντηξη απαιτεί τη λυσοσωμική μεμβρανική πρωτεΐνη LAPM-2 και τη μικρή GTPάση Rab7 [312,313]. Μετά τη σύντηξη, η αποδόμηση του περιεχομένου του αυτοφαγολυσσοσώματος εξαρτάται από μια σειρά υδρολασών, μεταξύ των οποίων οι πρωτεΐνάσες A και B και οι καθεψίνες B, D και L [314](148). Τα μικρά μόρια που προκύπτουν από την αποδόμηση, ειδικά τα αμινοξέα, μεταφέρονται πίσω στο κυτταρόπλασμα για τη σύνθεση πρωτεϊνών και τη διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών σε συνθήκες ελαττωμένης παροχής θρεπτικών συστατικών.

5.1.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης της αυτοφαγίας

Σηματοδότηση σχετιζόμενη με την παροχή θρεπτικών συστατικών

Κατά τη στέρηση θρεπτικών συστατικών, επάγεται σημαντικά ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος. Δύο καλά μελετημένα σηματοδοτικά μονοπάτια που λειτουργούν ως αισθητήρες της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου, ενεργοποιούν την κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη, και ρυθμίζουν αρνητικά την αυτοφαγία είναι εκείνα του mTOR και του Ras-cAMP-PKA.

mTOR complex 1 (mTORC1) – Το mTORC1 είναι ευαίσθητο στην αναστολή μέσω ραπαμυκίνης. Η απενεργοποίηση του mTORC1 από τη ραπαμυκίνη επάγει την αυτοφαγία παρουσία θρεπτικών συστατικών, δείχνοντας ότι το mTORC1 ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία [315]. Τα εξωκυττάρια αμινοξέα εισέρχονται στα κύτταρα των θηλαστικών μέσω μεταφορέων, όπως ο SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5) και ο SLC7A5, και έχει προταθεί ότι το mTORC1 ανιχνεύει άμεσα και φωσφορυλιώνεται σε απάντηση των θρεπτικών σημάτων [316,317]. Ωστόσο, πρόσφατες παρατηρήσεις προτείνουν οι Rag πρωτεΐνες, οι σχετιζόμενες με το Ras μικρές GTPάσες, ενεργοποιούν το mTORC1 σε απάντηση στα αμινοξέα, διαμεσολαβώντας τη μεταφορά του mTORC1 σε ένα ενδοκυττάριο διαμέρισμα όπου εντοπίζεται ο ενεργοποιητής του mTORC1, Rheb (Ras homolog enriched in brain) [318]. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα αμινοξέα ενεργοποιούν επίσης τον mTOR μέσω της τάξης III PI3K (hVps34) [319,320]. Η παρουσία αμινοξέων ενεργοποιεί την hVps34, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTOR και την αναστολή της αυτοφαγίας. Ωστόσο, αυτό δημιουργεί μια ασυμφωνία με το ρόλο της τάξης III PI3K στην προώθηση της συσσώρευσης των αυτοφαγικών πρωτεϊνών κατά τα αρχικά στάδια της δημιουργίας του αυτοφαγοσώματος [321]. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελεί ότι η PI3K ανευρίσκεται σε διακριτούς υποπληθυσμούς ή πρωτεϊνικά συμπλέγματα στο κύτταρο, που επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες ή που λειτουργούν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Το μονοπάτι Ras/PKA – Το μονοπάτι Ras/cAMP εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A – PKA) παίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση της γλυκόζης. Σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών, οι μικρές GTPάσες Ras1 και Ras2 είναι ενεργές και

αυξάνουν την παραγωγή cAMP από την αδενυλική κυκλάση. Η αύξηση του cAMP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA. Η συνεχής ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/PKA καταστέλλει την αυτοφαγία που επάγεται από την αναστολή του TOR [322,323]. Η αναστολή της αυτοφαγίας από το μονοπάτι Ras/PKA μπορεί επίσης να επάγεται μέσω ρύθμισης της Atg1, η οποία έχει φανεί να αποτελεί υπόστρωμα φωσφορυλίωσης της PKA [324]. Παρουσία θρεπτικών συστατικών η φωσφορυλίωση της Atg1 από την PKA κάνει την Atg1 κυρίως κυτταροπλασματική και την αποσυνδέει από το PAS, ενώ σε συνθήκες στέρησης θρεπτικών συστατικών η Atg1 αποφωσφορυλιώνεται και εντοπίζεται στο PAS.

Σηματοδοτικά μονοπάτια ινσουλίνης/αυξητικών παραγόντων

Όταν οι αυξητικοί παράγοντες αποσύρονται από τον εξωκυττάριο χώρο, παρά την επαρκή παροχή θρεπτικών συστατικών, η αυτοφαγία επάγεται και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών και την παραγωγή ενέργειας [325]. Τα μονοπάτια μέσω των οποίων οι ορμόνες ρυθμίζουν την αυτοφαγία είναι διαφορετικά από εκείνα της ρύθμισης μέσω της επάρκειας θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο και τα δύο καταλήγουν στον mTOR. Η ινσουλίνη και οι IGFs (insulin-like growth factors) ρυθμίζουν τον mTOR μέσω της τάξης I PI3K. Με τη δέσμευση της ινσουλίνης, η αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης σε κατάλοιπα τυροσίνης έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση και τη φωσφορυλίωση των IRS1 και IRS2 (insulin receptor substrate 1 και 2), που λειτουργούν ως άγκυρα για τη δέσμευση πρωτεϊνών προσαρμογέων, μεταξύ των οποίων και υπομονάδες της τάξης I PI3K. Η δημιουργία της PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5) – triphosphate), από την τάξη I PI3K αυξάνει τη στρατολόγηση στη μεμβράνη τόσο της Akt όσο και του ενεργοποιητή της PDK1 (phosphoinositide dependent protein kinase 1), οδηγώντας σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Akt από την PDK1 [326,327]. Η φωσφατάση της 3-PI, PTEN, αναστρέφει την παραγωγή PIP3, ελαττώνει τη σηματοδότηση της Akt και έτσι ρυθμίζει θετικά την αυτοφαγία [328]. Η Akt προωθεί τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TSC2. Η φωσφορυλίωση αναστέλλει την αλληλεπίδραση του TSC2 με το TSC1 και αποτρέπει το σχηματισμό του συμπλέγματος TSC1/2, το οποίο επάγει το Rheb να ανευρίσκεται στην ενεργό και συνδεδεμένη με το GTP μορφή του και του επιτρέπει να δεσμεύεται απευθείας και να ενεργοποιεί το mTORC1 [329-332]. Απουσία ορμονών, ο mTOR απενεργοποιείται, με αποτέλεσμα την άρση της ανασταλτικής του δράσης στην αυτοφαγία.

Εκτός από τον mTOR, η σηματοδότηση μέσω Ras παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας από αυξητικούς παράγοντες. Το Ras μεταδίδει σήματα από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων με δράση τυροσινικής κινάσης σε ενδοκυττάρια εκτελεστικές πρωτεΐνες, όπως οι Raf-1/MAP (mitogen activated protein) κινάσες και η τάξης I PI3K. Σε NIH3T3 MEFs, το ενεργοποιημένο Ras καταστέλλει την αυτοφαγία μέσω της τάξης I PI3K, αλλά όχι μέσω του Raf-1 [333]. Σε αντίθεση με την PI3K, το εκτελεστικό μόριο του Raf-1, Ras, αποτελεί έναν αισθητήρα των αμινοξέων και ρυθμίζει θετικά την αυτοφαγία σε HT-29 κύτταρα καρκίνου του κόλου [334]. Στην περίπτωση αυτή, τα αμινοξέα στοχεύουν και αναστέλλουν τη δραστηριότητα της Raf-1 κινάσης, η οποία ρυθμίζει αρνητικά τις κινάσες MEK1/2 [MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK kinase 1/2] και ERK1./2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) και τη δράση της αυτοφαγίας. Η στέρηση αμινοξέων αναστρέφει αυτή την αναστολή και επάγει την ERK1/2 και την αυτοφαγία. Ως αποτέλεσμα, δύο επιτελεστικά μονοπάτια του Ras, το Ras-PI3K και το Ras-Raf-1-ERK1/2, είναι πιθανό να έχουν αντιθετικές δράσεις στη ρύθμιση της αυτοφαγίας μέσω σηματοδότησης σε απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες έναντι της απουσίας αμινοξέων.

Είναι επίσης πιθανό ότι γενετικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων να καθορίζουν πώς η σηματοδότηση του Ras ρυθμίζει την αυτοφαγία.

Ανίχνευση της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου

Σε περιόδους ενδοκυττάρου μεταβολικού στρες, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Τα ελαττωμένα επίπεδα κυτταρικής ενέργειας (ATP) ανιχνεύονται από την AMPK (5'-AMP-activated protein kinase). Η AMPK ενεργοποιείται από έναν ελαττωμένο λόγο ATP/AMP μέσω της κινάσης LKB1. Η ενεργοποιημένη AMPK οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του συμπλέγματος TSC1/2, το οποίο αναστέλλει τη δραστηριότητα του mTOR μέσω του Rheb [335]. Η αυτοφαγία που επάγεται από την αρνητική ρύθμιση του mTOR έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ATP μέσω ανακύκλωσης θρεπτικών συστατικών. Επιπρόσθετα, το μονοπάτι LKB1-AMPK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την p27^{kip1}, έναν εξαρτώμενο από κυκλίνη αναστολέα κινάσης που οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου που είναι απαραίτητη για την αποτροπή της αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων και την επαγωγή της αυτοφαγίας για την επιβίωση σε απάντηση στο βιοενεργητικό στρες κατά την απόσυρση των αυξητικών παραγόντων και τη στέρηση θρεπτικών συστατικών [336].

Απάντηση στο στρες

Ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο στρες μπορεί να επάγουν αποδοτικά την αυτοφαγία, η οποία είναι σημαντική για τους οργανισμούς προκειμένου να προσαρμοστούν και να ανταπεξέλθουν σε μη ευνοϊκές συνθήκες.

Ενδοπλασματικό στρες- Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί ένα βασικό τμήμα του κυττάρου όπου πραγματοποιείται η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και η έναρξη της μετακίνησης μεμβρανικών σωματιδίων και πρωτεϊνών σε ποικίλα οργανίδια και στην κυτταρική επιφάνεια. Στα κύτταρα των θηλαστικών, το ενδοπλασματικό δίκτυο λειτουργεί επίσης ως το κύριο σημείο αποθήκευσης του ενδοκυττάρου Ca²⁺. Ένας αριθμός ερεθισμάτων στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως η έκφραση πρωτεϊνών με τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα, η στέρηση γλυκόζης, η υποξία και το οξειδωτικό στρες, καθώς και η εκροή Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγούν σε συσσώρευση μη αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η οποία ξεπερνά την ικανότητά του για αναδίπλωση. Μεγάλος αριθμός μελετών δείχνει ότι η αυτοφαγία επάγεται από το ενδοπλασματικό στρες. Ωστόσο, η σηματοδοτική μηχανισμοί που συνδέουν το ενδοπλασματικό στρες με την αυτοφαγία ποικίλουν και εξαρτώνται από τις ειδικές συνθήκες στρες.

Η αποσιώπηση του ρυθμιστή της απάντησης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPR – unfolded protein response) Grp78/BiP μέσω siRNA αναστέλλει τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος που επάγεται τόσο από το ενδοπλασματικό στρες όσο και από τη στέρηση θρεπτικών συστατικών, αλλά δεν επηρεάζει τη μετατροπή της LC3-I σε LC3-II, προτείνοντας το Grp78/BiP είναι ένας απαραίτητος παράγοντας για την αυτοφαγία και μπορεί να λειτουργεί στο επίπεδο την έκπτυξης του φαγοφόρου παρά στο επίπεδο της επαγωγής της αυτοφαγίας [337]. Επιπλέον μελέτες που εστιάζουν στους στόχους της UPR έχουν δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την επαγόμενη από το ενδοπλασματικό στρες αυτοφαγία. Η UPR σηματοδότηση στα θηλαστικά περιλαμβάνει τρία βασικά μονοπάτια, το IRE1, τον ATF6 (activating transcription factor 6) και την PERK (RNA-dependent protein kinase-like ER kinase). Οι παράγοντες αυτοί σηματοδοτούν τα επίπεδα των όχι σωστά

αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ενεργοποιούν τη μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων στόχων. Ένας από τους στόχους του IRE1 είναι η κινάση JNK (c-Jun N-terminal kinase), η οποία είναι απαραίτητη για τη λιπιδιακή σύζευξη της LC3 η οποία επάγεται από την τουνικαμυκίνη ή από τη συσσώρευση κυτταροπλασματικών όχι σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών λόγω αναστολής του πρωτεασώματος σε MEFs και καρκινικά κύτταρα [338,339]. Πρόσφατα δεδομένα σε μοντέλα ποντικών προτείνουν ότι στην απάντηση στο ενδοπλασματικό στρες που επάγεται από την έκφραση όχι σωστά αναδιπλωμένης polyQ72 ή από μεταλλαγμένες πρωτεΐνες δυσφερλίνης, η φωσφορυλίωση του eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) από την κινάση του eIF2 α PERK απαιτείται για τη μετατροπή της LC3 και την αυτοφαγική αποδόμηση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο [340,341]. Έτσι, τα μονοπάτια IRE1-JNK και PERK-eIF2 α φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από την UPR αυτοφαγία.

Εκτός από την UPR σηματοδότηση, το ενδοπλασματικό στρες επάγει επίσης της απελευθέρωση Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποιούμενη από το ασβέστιο εξαρτώμενη από καλμοδουλίνη κινάση κινάση β (calcium-activated calmodulin-dependent kinase kinase β – CaMKK β) ενεργοποιείται από την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca²⁺ και ενεργοποιεί περαιτέρω την AMPK, η οποία επάγει αποδοτικά την αυτοφαγία [342]. Τα αυξημένα επίπεδα Ca²⁺ πυροδοτούν τη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης C θ (PKC θ), η οποία επάγει τη μετατροπή της LC3 και την αυτοφαγία σε αθανατοποιημένα ηπατοκύτταρα σε απάντηση σε επαγωγείς στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [343].

Παρότι οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι η επαγόμενη από το ενδοπλασματικό στρες αυτοφαγία έχει ένα ρόλο που συμβάλει στην κυτταρική επιβίωση, άλλα ερευνητικά δεδομένα προτείνουν ότι παράγοντες που επάγουν ενδοπλασματικό στρες μπορεί να επάγουν αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Η έγχυση τουνικαμυκίνης στα νεφρικά σωληνάκια ποντικών επάγει κυτταρικό θάνατο των νεφρικών σωληναρίων μέσω απόπτωσης όσο και μέσω αυτοφαγίας, οι οποίες διαμεσολαβούνται από την καταλυτική δραστηριότητα της ογκοκατασταλτικής DAPk (calmodulin-regulated serine/threonine kinase death-associated protein kinase). Η ενεργοποιημένη DAPk επάγει την αυτοφαγία πιθανά μέσω της ικανότητάς της να φωσφορυλιώνει τη Beclin-1 και να προωθεί την αποδέσμευση της Beclin-1 από τη Bcl-2 [344]. Είναι πιθανό ότι η αυτοφαγία διαδραματίζει διττό ρόλο στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και των ερεθισμάτων.

Υποξία – Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου $\leq 1\%$ (υποξικό στρες) έναντι 2-9% (νορμοξία για τα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών) ανιχνεύονται φυσιολογικά στα αναπτυσσόμενα έμβρυα καθώς και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως οι συμπαγείς όγκοι, η καρδιαγγειακή ισχαιμία και το τραύμα του εγκεφάλου. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ευθύνονται για την επαγόμενη από την υποξία αυτοφαγία και οι κυτταρικές τους συνέπειες φαίνεται να διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τα αυτοφαγικά μονοπάτια. Για παράδειγμα η αυξημένη αυτοφαγία των μιτοχονδρίων ή μιτοφαγία κατά την υποξία θεωρείται μια απάντηση προσαρμογής ελαττώνοντας τα επίπεδα των ROS και προστατεύοντας την κυτταρική ακεραιότητα, παρότι σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος και καρκίνου του μαστού, η παρατεταμένη υποξία διαμεσολαβεί τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο [345]

Σε MEFs, τα μιτοχόνδρια απομακρύνονται μέσω μιτοφαγίας σε απάντηση στην υποξία, μια διεργασία εξαρτώμενη από τον HIF-1 και την επαγωγή του στόχου του BNIP3 (Bcl-2

adenovirus E1a nineteen kDa interacting protein 3), μέλους της προαποπτωτικής οικογένειας του Bcl-2 [67]. Επιπρόσθετα, κατά τη δικτυοερυθροκυτταρική ωρίμανση στα ποντίκια, το BNIP3L (BNIP3-like protein), ένας ακόμη στόχος του HIF-1, απαιτείται για την κάθαρση των μιτοχονδρίων μέσω αυτοφαγίας [346,347]. Το BNIP3 ανταγωνίζεται με τη Beclin 1 για τη δέσμευση του Bcl-2 και έτσι απελευθερώνει τη Beclin 1, προκειμένου αυτή να λάβει μέρος στη μιτοφαγία. Πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός από τον έλεγχο του HIF-1, το BNIP3 αποτελεί επίσης γονίδιο στόχο των E2F μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι αναστέλλονται από το ογκοκατασταλτικό RB κατά την επαγόμενη από το RB αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου [348]. Έτσι η υποξία επάγει τη μεταγραφή του BNIP3 μέσω δέσμευσης του HIF-1 ή/και των E2F στον προμότορα του BNIP3, ενώ και η σηματοδότηση RB-E2F-BNIP3 εμπλέκεται επίσης στην επαγόμενη από την υποξία αυτοφαγία.

Ένα επιπλέον γονίδιο στόχος του HIF-1, το *DDIT4* (DNA Damage Inducible Transcript 4), το οποίο κωδικοποιεί τον REDD1 (regulated in development and DNA damage responses 1) συμμετέχει στην επαγωγή αυτοφαγίας σε συνθήκες υποξίας. Ο REDD1 δεσμεύεται στο σύμπλεγμα 14-3-3, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση του TSC2 από το 14-3-3, την ενεργοποίηση του TSC1/2 και την τελική αναστολή του mTOR, η οποία θα οδηγήσει σε επαγωγή της αυτοφαγίας [349,350].

Η αύξηση της μαζικής αυτοφαγίας από την υποξία στα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ανεξάρτητη από το μονοπάτι του HIF-1. Στην περίπτωση αυτή, τα μονοπάτια AMPK-mTOR [351,352] και PKCδ (protein kinase Cδ)-JNK1 [353] είναι υπεύθυνα για τη σηματοδότηση της επαγωγής αυτοφαγίας. Επιπρόσθετα η υποξία αναστέλλει τον TOR και μπλοκάρει το σχηματισμό του συμπλέγματος eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) και τη μετάφραση του mRNA [350,354]. Έτσι η επαγόμενη από την υποξία αυτοφαγία μπορεί να είναι τουλάχιστον εν μέρει εξαρτώμενη από τον TOR και το επαγόμενο από την υποξία ενδοπλασματικό στρες μπορεί να παίζει επίσης ρόλο στην επαγωγή αυτοφαγίας.

Οξειδωτικό στρες – Ένα κοινό ενδοκυττάριο στρες που επάγει αποδοτικά την αυτοφαγία είναι ο σχηματισμός ROS. Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής ROS, τα οποία εν συνεχεία θα καταστρέψουν τα ίδια τα οργανίδια παραγωγής τους. Παράγοντες που επάγουν την παραγωγή ROS ή χημικοί παράγοντες που αναστέλλουν τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επάγουν την παραγωγή ROS και τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές [355,356]. Είναι ενδιαφέρον ότι τα φάρμακα αυτά επάγουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα ROS σε μη μεταμορφωμένα πρωτογενή αστροκύτταρα ποντικών σε σχέση με καρκινικά κύτταρα και δεν επάγουν αυτοφαγία, προτείνοντας ότι τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να διατηρούν τα ROS σε αποδεκτά επίπεδα και είναι ικανά να προστατεύονται από τη μιτοχονδριακή καταστροφή, πιθανά μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD – superoxide dismutase), η καταλάση και το σύστημα οξειδοαναγωγής, καθώς η εφαρμογή χημικών παραγόντων που εξουδετερώνουν τα ROS ή η υπερέκφραση της SOD2 ελαττώνουν την αυτοφαγία [355,356]. Επιπλέον, τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια αποδομούνται επιλεκτικά μέσω μιτοφαγίας στα κύτταρα των θηλαστικών, γεγονός το οποίο μπορεί να αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό ελάττωσης των επιπέδων ROS και διατήρησης της κυτταρικής επιβίωσης [357-359]. Επομένως τα ROS στοχεύουν επιλεκτικά τα κακοήθη, αλλά όχι τα φυσιολογικά κύτταρα για επαγωγή της αυτοφαγίας, γεγονός το οποίο έχει σημαντικές προεκτάσεις στη θεραπεία των κακοηθειών.

Η σύνδεση μεταξύ ROS και επαγωγής της αυτοφαγίας μπορεί να είναι η πρωτεάση κυστεΐνης Atg4, η οποία διασπά την Atg8/LC3 από την εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος πριν ή σύντομα μετά τη σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσosώματος. Τα ROS στοχεύουν μια συντηρημένη Cys81 στην Atg4, η οποία βρίσκεται σε εγγύτητα με την καταλυτική Cys77. Η οξειδωση των κυστεΐνων αναστέλλει τη δραστηριότητα πρωτεάσης της Atg4 και προάγει την προσθήκη PE στη Atg8/LC3, ένα βασικό βήμα της αυτοφαγίας [360]. Επιπρόσθετα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου ενεργοποιεί την PARP-1 (poly ADP-ribose-polymerase-1), η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι LKB1-AMPK και οδηγεί σε επαγωγή αυτοφαγίας [361]. Είναι πιθανό ότι η βλάβη του DNA που επάγεται από το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της PARP-1 και την αυτοφαγία [362](95).

5.1.3 Αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος (Autosis)

Παρά τον καλά τεκμηριωμένο ρόλο της αυτοφαγίας ως μηχανισμού επιβίωσης των κυττάρων, φαίνεται ότι η αυτοφαγία ειδικά σε αυξημένα επίπεδα μπορεί να λειτουργεί ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου [363]. Ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος ορίστηκε αρχικά ως ένας τύπος κυτταρικού θανάτου κατά τον οποίο δεν παρουσιάζεται συμπύκνωση της χρωματίνης και παρουσιάζει σε μεγάλο βαθμό κενοδοπιώδη εκφύλιση του κυτταροπλάσματος. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα γονίδια της αυτοφαγίας είναι απαραίτητα για την επαγωγή κυτταρικού θανάτου υπό ορισμένες συνθήκες. Αυτές περιλαμβάνουν περιπτώσεις υποστρώσης ιστών κατά την ανάπτυξη των ασπόνδυλων, καθώς και σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών που στερούνται μονοπάτια απόπτωσης [364]. Σε κύτταρα με επαρκείς μηχανισμούς απόπτωσης, τα υψηλά επίπεδα αυτοφαγίας μπορούν να οδηγήσουν επίσης σε εξαρτώμενο από γονίδια της απόπτωσης και ανεξάρτητο από κασπάσες κυτταρικό θάνατο [365,366]. Σε νεογνά ποντικών η ειδική για τους νευρώνες διαγραφή του Atg7 προστατεύει από τον επαγόμενο από υποξία-ισχαιμία θάνατο των νευρώνων του ιπποκάμπου [367] και σε ενήλικα ποντίκια shRNA με στόχο το *beclin1* ελαττώνει τον επαγόμενο από φλοιικό έμφρακτο θάνατο των νευρώνων στο θάλαμο [368].

Οι Liu και συνεργάτες προκειμένου να μελετήσουν τον κυτταρικό θάνατο στο πλαίσιο των εξαιρετικά αυξημένων επιπέδων αυτοφαγίας, εκτίμησαν την επίδραση ενός πεπτιδίου που επάγει την αυτοφαγία, του Tat-Beclin 1, στον εξαρτώμενο από την αυτοφαγία κυτταρικό θάνατο. Παρατήρησαν ότι τουλάχιστον *in vitro* το Tat-Beclin 1 οδηγούσε στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου με χρονοεξαρτώμενο και δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο κυτταρικός αυτός θάνατος αναστελλόταν από τη φαρμακολογική ή γενετική αναστολή της αυτοφαγίας, αλλά όχι της απόπτωσης ή της νεκρόπτωσης, δεν αλληλοεπικαλυπτόταν γενετικά με την απόπτωση ή τη νεκρόπτωση και παρουσίαζε μοναδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αυτός ο εξαρτώμενος από την αυτοφαγία τύπος κυτταρικού θανάτου ονομάστηκε «autosis» και χαρακτηρίζεται από αυξημένη προσκόλληση κυττάρου-υποστρώματος, διατεταμένο και κατακερματισμένο ενδοπλασματικό δίκτυο αρχικά και εξαφάνιση του ενδοπλασματικού δικτύου ακολούθως, καθώς και περιέλιξη της πυρηνικής μεμβράνης αρχικά και εστιακή εξοίδηση του περιπυρηνικού χώρου ακολούθως. Η «autosis» αποτελεί μια ρυθμιζόμενη από Na^+/K^+ ATPάση μορφή κυτταρικού θανάτου και πυροδοτείται από πεπτιδία που επάγουν αυτοφαγία, από ένδεια θρεπτικών συστατικών και από την υποξία-ισχαιμία [369].

5.2 Ο ρόλος της αυτοφαγίας στην αιμοποίηση

Καθώς η αυτοφαγία έχει αποδειχθεί ότι έχει έμμεση αλλά σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των HSCs, μελέτες διερευνούν το ρόλο της αυτοφαγίας στην αιμοποίηση και τη γήρανση των HSCs [370-374]. Το στρες της διαίρεσης/αυτό-ανανέωσης, μέσω της ενεργοποίησης των σε ηρεμία ευρισκόμενων HSCs είναι γνωστό ότι οδηγεί σε συσσώρευση βλαβών στο DNA, τοξικούς μεταβολίτες και δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια, με τελικό αποτέλεσμα την απώλεια των ιδιοτήτων αρχέγονου κυττάρου [146,375,376]. Στην ασύμμετρη διαίρεση τα ελαττωματικά μιτοχόνδρια και τα ανεπιθύμητα οργανίδια μπορεί να διαχωρίζονται από τα στελεχιαία θυγατρικά κύτταρα των αρχέγονων κυττάρων και να κατανέμονται στα διαφοροποιούμενα θυγατρικά κύτταρα [377], αλλά στην περίπτωση της συμμετρικής διαίρεσης τα παθολογικά οργανίδια κατανέμονται και στα δύο θυγατρικά κύτταρα καθώς νέα και γηρασμένα μιτοχόνδρια έχουν ανευρεθεί εξίσου κατανεμημένα μεταξύ των δύο κυττάρων [378,379]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι σε κάποιο απροσδιόριστο βαθμό τα παθολογικά οργανίδια μπορεί να αναπαριστούν έναν περιοριστικό παράγοντα στη διαίρεση της αυτοανανέωσης και όντως έχει αποδειχθεί δύσκολο να εκπτυχθούν πληθυσμοί HSCs διατηρώντας τις ιδιότητες του αρχέγονου κυττάρου μέσω συμμετρικής διαίρεσης. Η ρύθμιση της αυτοφαγίας κατά την αιμοποίηση μπορεί να προστατεύει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από τη συσσώρευση παθολογικών οργανιδίων, αλλά και να εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολικού προφίλ κατά τη διαφοροποίηση.

5.2.1. Αυτοφαγία και HSCs

Η μελέτες που διερευνούν το ρόλο της αυτοφαγίας στα HSCs είναι σχετικά περιορισμένες [372,374,380], ενώ ο σημαντικός ρόλος της αυτοφαγίας στα αρχέγονα αυτά κύτταρα μπορεί να αναδειχθεί έμμεσα μέσω σχετιζόμενων μονοπατιών. Οι Cheung και συνεργάτες συνέκριναν τη γονιδιακή έκφραση των αρχέγονων κυττάρων που βρίσκονται σε ηρεμία μεταξύ πολλών κυτταρικών τύπων και διαπίστωσαν ότι αρκετά γονίδια σχετιζόμενα με το μονοπάτι της αυτοφαγίας μεταξύ των οποίων τα *Ulk2*, *Pink1*, *Atg8*, *Gabarrapl1*, *Map1lc3a* και *Foxo3* βρίσκονται ανάμεσα στα πρώτα 50 γονίδια που σχετίζονται με την υπογραφής του αρχέγονου κυττάρου [381]. Από αυτά, ο FOXO3, ένας μεταγραφικός παράγοντας που συμβάλλει στη διατήρηση της ηρεμίας των HSCs, φαίνεται να ρυθμίζει την αυτοφαγία στα HSCs και να τα προστατεύει από το μεταβολικό στρες κατά τη στέρηση θρεπτικών συστατικών ή την απόσυρση αυξητικών παραγόντων. Ο FOXO3 επάγει τη γονιδιακή έκφραση σχετιζόμενων με την αυτοφαγία γονιδίων μεταξύ των οποίων τα *Atg4b*, *Map1lc3b* και *Bnip3* [372]. Ενώ τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η αυτοφαγία είναι αυξημένη σε γενετικό επίπεδο στα αρχέγονα κύτταρα, λειτουργικές μελέτες επιβεβαιώνουν υψηλότερα επίπεδα αυτοφαγίας στα HSCs, τα οποία βγαίνουν ελαττούμενα καθώς τα προγονικά κύτταρα δεσμεύονται για διαφοροποίηση [382,383]. Τα υψηλά επίπεδα αυτοφαγίας σε HSCs ποντικών, όπως προσδιορίστηκαν μέσω των ειδικών για τα αυτοφαγοσώματα χρωστικών CytoID και LC3-II σε συνεντόπιση με το λυσοσωμικό LAMP-1+/- αναστολέα ροής BafilomycinA1 σε GFP-LC3 διαγενετικά ποντίκια μέσω κυτταρομετρίας ροής αντιστοιχούν σε εκείνα των ανθρώπινων HSCs [383]. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η αυξημένη αυτοφαγία ή μιτοφαγία είναι απαραίτητη για τα κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία, καθώς δεν είναι εύκολο να διοχετεύσουν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδριά τους και τα ROS στα θυγατρικά τους κύτταρα. Η υπόθεση ότι τα αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία χρειάζονται την αυτοφαγία μπορεί να υποστηριχθεί από αντίστοιχα δεδομένα στα T και B λεμφοκύτταρα μνήμης. Είναι γεγονός ότι σημαντική μιτοφαγική δραστηριότητα μπορεί να ενεργοποιηθεί στην υποξική αιμοποιητική φωλιά, μέσω της

επαγωγής του *Bnip3* και της μιτοχονδριακής αυτοφαγίας από τον HIF-1α [67], με αποτέλεσμα την ελάττωση της μιτοχονδριακής μάζας, της κατανάλωσης οξυγόνου και της παραγωγής ROS [384]. Με παρόμοιο τρόπο, η αναστολή του μονοπατιού του mTOR επάγει την αυτοφαγία και μπορεί επίσης να συμβάλει στη στην ηρεμία των HSCs καταστέλλοντας τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και προάγοντας τη γλυκόλυση. Κατά τη διαφοροποίηση, πραγματοποιείται μια αλλαγή του μεταβολικού προφίλ από την αναερόβια γλυκόλυση στη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορρυλίωση και η μεταβολική αυτή τροποποίηση μπορεί να είναι αρκετή για τον καθορισμό της τύχης των HSCs από την αυτοανανέωση στη διαφοροποίηση [247,273,274]. Παράδειγμα αποτελεί η διαγραφή της μιτοχονδριακής φωσφατάσης PTPMT1, η οποία διαταράσσει τη μετάβαση από την αναερόβια γλυκόλυση στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό και έχει ως αποτέλεσμα την αιμοποιητική ανεπάρκεια, η οποία σχετίζεται με συσσώρευση HSCs που δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν [229].

Η διαγραφή των αυτοφαγικών πρωτεϊνών Atg5 ή Atg7 σε μοντέλα *Vav-Cre* ποντικών οδηγεί σε μια αρχική έκπτυξη των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων στην ηλικία των 6 εβδομάδων, η οποία εξελίσσεται ωστόσο σε σοβαρή αναιμία και μυελική ανεπάρκεια μετά από την απώλεια των HSCs και οδηγεί σε θάνατο στην ηλικία των 10 εβδομάδων [380,383]. Η διαγραφή της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Fip200 οδηγεί σε εμβρυονικό θάνατο και χαρακτηρίζεται επίσης από απώλεια των HSCs. Τα HSPCs Ποντικών με διαγραφή της Atg7 παρουσιάζουν συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, αυξημένο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού *Ki67*, βλάβη του DNA και αυξημένα επίπεδα κασπάσης 3 [380]. Η απόπτωση μπορεί να προκαλείται είτε από τα ROS είτε από την εκσεσημασμένη βλάβη του DNA. Ωστόσο, δεν είναι σαφές το αν ο παρατηρούμενος αυξημένος πολλαπλασιασμός είναι αποτέλεσμα των κυτταροπενιών ή αν πρόκειται για εγγενές χαρακτηριστικό των κυττάρων. Υπέρ της υπόθεσης του εγγενούς χαρακτηριστικού είναι μια μελέτη που δείχνει ότι η αυτοφαγική σηματοδότηση σχετίζεται με διαμεσολαβόμενη από ουβικιτίνη αποδόμηση της κυκλίνης D3 στα HSPCs υπό συνθήκες στρες σχετιζόμενου με την ένδεια θρεπτικών συστατικών [385]. Η σύνδεση μεταξύ αυτοφαγίας και κυτταρικού κύκλου υποστηρίζεται καλύτερα από το εύρημα ότι κύτταρα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με ανεπάρκεια της αυτοφαγίας, τα οποία προέρχονται από το διαμέρισμα των HSPCs, πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα [383].

5.2.2. Αυτοφαγία και ερυθροποίηση

Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με τη σημασία της αυτοφαγίας στη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων προέρχονται από τη μελέτη της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων. Κατά την ερυθροποίηση η αποβολή του πυρήνα από τις ερυθροβλάστες οδηγεί στη δημιουργία των δικτυοερυθροκυττάρων στο MO. Ακολούθως, η απώλεια των περισσότερων κυτταρικών οργανιδίων κατά την τελική διαφοροποίηση δίνει γένεση στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η επαγωγή της αυτοφαγίας επισυμβαίνει στο στάδιο της πολυχρωματόφιλης ερυθροβλάστης και συμβαδίζει με την αυξημένη έκφραση πολλών αυτοφαγικών γονιδίων [386,387]. Η στοχευμένη διαγραφή αυτοφαγικών γονιδίων, μεταξύ των οποίων τα *Ulk1* [304], *Atg7* [387], *Bnip3l* [346] και *Fip200* [374], οδηγεί στην παθολογική ερυθροκυτταρική διαφοροποίηση και την αναιμία. Η κάθαρση των μιτοχονδρίων ελαττώνεται, αλλά δεν εξαλείφεται εντελώς απουσία των Atg5/7 [388,389] και η χορήγηση παραγόντων που διαταράσσουν την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορρυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε αποκατάσταση της μιτοχονδριακής κάθαρσης σε ερυθροβλάστες με έλλειψη του *Ulk1* ή του *BNIP3L*. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν την παρουσία εναλλακτικών

μονοπατιών κάθαρσης των μιτοχονδρίων κατά την ερυθροκυτταρική διαφοροποίηση [304,346]. Ένα τέτοιο μονοπάτι είναι η μη κανονική εναλλακτική αυτοφαγία, ένας μηχανισμός που επιτρέπει τη διαμεσολαβούμενη από αυτοφαγόσωμα αποδόμηση ακόμη και απουσία των Atg5 ή Atg7 υπό ορισμένες συνθήκες [390].

5.2.3. Επίδραση της αυτοφαγία στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο και τα μεταβολικά μονοπάτια των αιμοποιητικών κυττάρων

Παρότι συγκεκριμένοι υποδοχείς και ερεθίσματα για την επαγωγή της αυτοφαγίας δεν έχουν εκτενώς μελετηθεί στα HSCs ή τα HPCs, αναλύσεις της λειτουργίας των HSC/HPC σε μοντέλα knockout με έλλειψη αυτοφαγίας, συμπεριλαμβανομένων αυτών με έλλειψη FIP200 και Atg7, δείχνουν ότι η αυτοφαγία συμβάλει στην ομοίωση, και ειδικά τη μεταβολική, των αιμοποιητικών κυττάρων. Η διαγραφή του *Rb1cc1* σε αιμο-ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα σε ένα μοντέλο TEK/Tie2Cre ποντικών οδηγεί σε πρόωμο θάνατο λόγω σοβαρής αναιμίας. Τα *Rb1cc1*-null ποντίκια παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό των HSCs με έκπτυξη του μυελικού διαμερίσματος [374]. Επιπλέον, οι αιμοποιητικοί πληθυσμοί των *Rb1cc1*-null ποντικών εμπλουτισμένοι με HSCs και HPCs έχουν μεγαλύτερη μιτοχονδριακή μάζα και επίπεδα ROS σε σχέση με εκείνους που απομονώνονται από wild-type ποντικούς. Η διαγραφή του *Atg7* από αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα σε μοντέλα *Vav-Cre* ποντικών οδηγεί σε σταδιακή και τελικά θανατηφόρο αναιμία που συνοδεύεται από λεμφοπενία και άτυπο πολλαπλασιασμό των ιστιοκυττάρων [391]. Τα ζώα αυτά υφίστανται μια σταδιακή ελάττωση του αριθμού των HSC και HPC καθώς και της ικανότητάς τους για αυτό-ανανέωση, με δραστηκή εξαρτώμενη από την ηλικία ελάττωση της ικανότητας των κυττάρων να αποκαθιστούν την αιμοποίηση σε θανατηφόρα ακτινοβολημένα ποντίκια. Κύτταρα που ανήκουν στο Lin-ATXN+C-KIT+ διαμέρισμα των ποντικών με έλλειψη του *Atg7*, εμπλουτισμένα με HSCs και HPCs έχουν πιο πολλά μιτοχόνδρια, υψηλότερα επίπεδα μιτοχονδριακών ROS, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μεγαλύτερη βλάβη του DNA σε σχέση με τα wild-type [380].

Η μελέτη των Passegue και συνεργατών χρησιμοποίησε τη διαγραφή του *Atg12* για να διερευνήσει το ρόλο της αυτοφαγίας στην υγεία και τη μακροβιότητα των HSCs. Το ένα τρίτο των HSCs από μεγαλύτερης ηλικίας ποντίκια παρουσιάζουν υψηλή αυτοφαγική δραστηριότητα και χαμηλή μεταβολική κατάσταση και τα κύτταρα αυτά διατηρούν ένα δυναμικό αυτοανανέωσης παρόμοιο με εκείνο των HSCs νέων ποντικών. Όταν το *Atg12* διαγράφεται συστηματικά από τα HSCs η διαταραχή της αυτοφαγίας οδηγεί σε διαταραγμένη αναλογία κυκλοφορούντων μυελικών έναντι λεμφικών κυττάρων στα ποντίκια και ελαττωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης. Αυτοί οι φαινότυποι του αίματος στη γήρανση συνοδεύονται από επιγενετικές διαταραχές και αυξημένη οξειδωτική φωσφορύλιωση. Όταν τα HSCs εισέρχονται σε κυτταρικό κύκλο, η μεταβολική δραστηριότητα στρέφεται από τη γλυκόλυση στην μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορύλιωση. Αυτά τα πρόσφατα ενεργά HSCs πιστεύεται ότι σύντομα επιστρέφουν στη γλυκόλυση προκειμένου να διατηρήσουν τη δεξαμενή της αυτό-ανανέωσης. Ευρήματα μελετών από ποντίκια με συστηματική αποσιώπηση *Atg12* υποδηλώνουν ότι η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστροφή του μεταβολικά ενεργού status των HSCs προς την ηρεμία μέσω επαρκούς κάθαρσης των ενεργών μιτοχονδρίων το οποίο αποτρέπει την επαγωγή (επι)γενετικών προγραμμάτων που οδηγούν στη δέσμευση των HSCs και επομένως υποστηρίζει τη διατήρηση της υγιούς αιμοποίησης [392].

Το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζεται κατά κύριο λόγο στο ρόλο της μιτοφαγίας στη φυσιολογική αιμοποίηση. Παράγοντες όπως ο FOXO3 και το TSC1 ρυθμίζουν παράλληλα την μιτοχονδριακή λειτουργία και την αυτοφαγία. Ο FOXO3, ο μεταγραφικός παράγοντας που διατηρεί την ηρεμία των HSCs περιορίζοντας το κυτταρικό μιτοχονδριακό περιεχόμενο και δράση, έχει εμπλακεί επίσης στη ρύθμιση της επαγόμενης από το στρες αυτοφαγίας στα HSCs, η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των HSCs κατά τη γήρανση και την απάντηση στην ένδεια θρεπτικών συστατικών. Οι στόχοι του FOXO3 που εμπλέκονται στην αυτοφαγία περιλαμβάνουν τα *Atg4b*, *Map1lc3b* και *Bnip3* [372]. Με παρόμοιο τρόπο, η διαμεσολαβούμενη από το TSC-1 αναστολή του mTOR μονοπατιού, η οποία συμβάλει στην ηρεμία των HSC καταστέλλοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση και την παραγωγή ROS, προωθεί επίσης την αυτοφαγία [265,393].

Η σημαντική συμβολή της αυτοφαγίας στην αιμοποίηση έχει επίσης καταδειχθεί από τη μελέτη των Jin και συνεργατών σε μια μελέτη μοντέλων γενετικών ποντικών που παρουσίαζαν υπερενεργοποιημένη μιτοφαγία [394]. Η *Atad3a* (ATPase family, AAA domain containing 3A) είναι μια μιτοχονδριακή μεμβρανική πρωτεΐνη που ρυθμίζει τις δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμπλεγμάτων των έξω και έσω μιτοχονδριακών μεμβρανών. Φαίνεται ότι η *Atad3a* αποτρέπει τη συσσώρευση του *Pink1* επάγοντας την είσοδό του στα μιτοχόνδρια για αποδόμηση. Η οξεία διαγραφή του *Atad3a* φάνηκε να επάγει τη μιτοφαγία τόσο σε υγιή όσο και σε κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, η οποία παρεμπόδιζε την αιμοποιητική δέσμευση στο προγονικό στάδιο και οδηγούσε εκπτυσμένη δεξαμενή HSPCs. Οι φαινότυποι αυτοί είναι τουλάχιστον εν μέρει διαμεσολαβούμενοι από το *Pink1*, καθώς η καταστροφή/ablation του *Pink1* ελάττωνε τα επίπεδα μιτοφαγίας και εν μέρει διέσωζε τους παθολογικούς αιμοποιητικούς φαινοτύπους που προκαλούσε η διαγραφή του *Atad3a*. Συνολικά, οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν ότι η σωστή ρύθμιση τόσο της ειδικής όσο και της μη ειδικής αυτοφαγίας είναι ουσιαστική για την αιμοποιητική ομοιόσταση. Οι ακριβείς μηχανισμοί της σχέσης μεταξύ της μοίρας των HSCs και του κυτταρικού μεταβολισμού έχουν μόλις αρχίσει να γίνονται κατανοητοί.

Οι Ito και συνεργάτες, χρησιμοποιώντας το δείκτη *Tie2*, κατόρθωσαν να εντοπίσουν έναν καθαρό πληθυσμό HSCs και έδειξαν με το δικό τους πρωτόκολλο μεταμόσχευσης ότι η θετικότητα για το *Tie2* σχετίζεται ισχυρά με την ικανότητα επανεγκατάστασης αιμοποίησης [378]. Η υψηλή ικανότητα αυτό-ανανέωσης των *Tie2+* HSCs οδήγησε στη διερεύνηση στα κύτταρα αυτά ρυθμιστικών μηχανισμών. Η μιτοφαγία αναγνωρίστηκε ως διεργασία ελέγχου ποιότητας των μιτοχονδρίων, ως μηχανισμός κλειδί για την έκπτυξη μέσω αυτό-ανανέωσης των HSCs. Η μελέτη της έκφρασης γονιδίων σε επίπεδο ξεχωριστών κυττάρων (single-cell) αποκάλυψε ότι σημαντικός αριθμός γονιδίων εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα *Tie2+* σε σχέση με τα *Tie2-* HSCs, μεταξύ των οποίων δείκτες των HSCs, αλλά και κυτταρικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την οξειδωση των λιπαρών οξέων (fatty acid oxidation -FAO) μέσω της παλμιτοϋλτρανσφεράσης της καρνιτίνης 1a (carnitine palmitoyltransferase 1a - *Cpt1a*) και του peroxisome proliferator activated receptor delta (*Ppard*). Η ιεραρχική ομαδοποίηση και οι υπογραφές της FAO έδειξαν ότι τα *Tie2+* HSCs είναι μοριακά μακρινές τόσο από τα *Tie2-* HSCs όσο και από τα προγονικά κύτταρα [378]. Έχει φανεί ότι ο κυτταρικός μεταβολισμός είναι κομβικός για την έκπτυξη των HSCs, καθώς σε κυτταρικό επίπεδο η ελαττωματική ικανότητα αυτοανανέωσης *Pml* knockout *Tie2+* HSCs μπορεί να διασωθεί μέσω φαρμακολογικής ενεργοποίησης PRAF-FAO και μέσω της επακόλουθης προώθησης της μιτοφαγίας [378].

Δύο γονίδια σχετιζόμενα με τη νόσο του Parkinson, η μιτοχονδριακή κινάση Pten-induced putative kinase 1 (Pink1) και η λιγκάση ουβικιτίνης Parkin παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της μιτοφαγίας [395]. Η ενεργοποίηση του PRAF-FAO οδηγούσε σε έκπτυξη των Tie2+ πληθυσμών HSCs μέσω αυξημένης επιστράτευσης του Parkin στα μιτοχόνδρια. Αντίστροφα, η αναστολή της μιτοφαγίας μέσω αποσιώπησης του Parkin οδηγούσε σε εξασθένηση της έκπτυξης των HSCs. Τα μεταβολικά αυτά μονοπάτια βρέθηκαν να είναι διατηρημένα και λειτουργικά σε ανθρώπινα HSCs [378].

Η αυτοφαγία φαίνεται να παίζει επίσης ρόλο στην τελική διαφοροποίηση των ουδετερόφιλων. Οι Riffelmacher και συνεργάτες έδειξαν ότι η έλλειψη της Atg7 στα πρόδρομα κύτταρα των ουδετεροφίλων είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη γλυκολυτική δραστηριότητα, τη βλάβη της μιτοχονδριακής αναπνοής, την ελαττωμένη παραγωγή ATP και τη συσσώρευση λιπιδίων. Η αναστολή της επαγόμενης από την αυτοφαγία FAO οδηγούσε, επομένως, στην παθολογική διαφοροποίηση, ενώ η χορήγηση λιπαρών οξέων ή πυροσταφυλικού οξέος για την τροφοδότηση της μιτοχονδριακής αναπνοής κατόρθωνε να διασώσει τα ουδετερόφιλα. Έτσι φαίνεται ότι η διαμεσολαβούμενη από την αυτοφαγία λιπόλυση τροφοδοτεί τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για τη λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνοής, η οποία είναι απαραίτητη για την τελική διαφοροποίηση των ουδετεροφίλων [396].

5.3 Αυτοφαγία στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)

Δομικές μελέτες δείχνουν αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων και λυσοσωμάτων που περιέχουν μιτοχόνδρια σε πρώιμες ερυθροβλάστες ασθενών με χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ και διογκωμένα, παθολογικά μιτοχόνδρια με συσσώρευση σιδήρου και απουσία απόπτωσης σε ασθενής με υψηλού κινδύνου νόσο και εξάρτηση από μεταγγίσεις [397,398]. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μιτοχονδριακή βλάβη μπορεί να διαμεσολαβείται από την αυτοφαγία στα χαμηλού κινδύνου μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και ότι η πρόοδος της νόσου επισυμβαίνει καθώς η ικανότητα των κυττάρων να περιορίζουν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια ξεπερνιέται, οδηγώντας σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο (και εξάρτηση από τις μεταγγίσεις), και σε ορισμένες περιπτώσεις στην επικράτηση κλώνων ικανών να ξεπερνούν την αποπτωτική πίεση (εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία). Έτσι, η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ δυνάμεων που προωθούν τη μιτοχονδριακή βλάβη και την ικανότητα των κυττάρων να περιορίζουν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια μέσω αυτοφαγίας μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια της νόσου και την πρόοδο σε μια υποκατηγορία ασθενών με ΜΔΣ. Προς υποστήριξη αυτού του μοντέλου, χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν ΜΔΣ μπορεί να προκύψουν σε ποντίκια εισάγοντας ομόζυγη μετάλλαξη στη μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση POLG/POLGA που προκαλεί μια εξαρτώμενη από την ηλικία συσσώρευση σωματικών μιτοχονδριακών μεταλλάξεων [399](Chen 2009) ή διαταράσσοντας την αυτοφαγία σε αιμοποιητικά αρχέγονα/προγονικά κύτταρα χρησιμοποιώντας VanCre+Atgflox/flox ζώα [380]. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν στα ΜΔΣ είναι αρκετά διαφορετικά στα δύο αυτά μοντέλα, με τη μετάλλαξη *Polg* να οδηγεί σε μακροκυτταρική αναιμία, δυσπλαστική ερυθρόποιηση και λεμφοπενία και την διαγραφή του *Atg7* να οδηγεί σε μυελική ανεπάρκεια που συνοδεύεται από πολλαπλασιασμό άτυπων ιστιοκυττάρων.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η τεκμηριωμένη εξάρτηση των προγονικών κυττάρων των ΜΔΣ από το υποξικό περιβάλλον του μυελού των οστών έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον στον επαγόμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα 1 (Hypoxia Inducible Factor 1 – HIF-1). Ο HIF-1 διαμεσολαβεί τη διατήρηση της ηρεμίας και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση τροποποιώντας το μεταβολισμό των HSCs, αποτελώντας έτσι έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Στόχο της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της παθολογικής σταθεροποίησης του HIF-1 στο ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ καθώς και των διαφορετικών μεταβολικών προφίλ της μυελικής σειράς ΜΔΣ με χαμηλά και υψηλά ποσοστά βλαστών.

Κεφάλαιο 6: Ο ρόλος του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (Hypoxia Inducible Factor 1 – HIF-1) και της ψευδοϋποξίας στην παθοφυσιολογία των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

6.1 Εισαγωγή

Τα ΜΔΣ αποτελούν μια ομάδα αιματολογικών κακοηθειών που χαρακτηρίζονται από κλωνική έκπτυξη HSCs ή/και των HSPCs τα οποία χαρακτηρίζονται από παθολογικό δυναμικό διαφοροποίησης [1]. Αυτές οι κλωνικές μεταβολές καθορίζουν έναν ετερογενή κλινικό φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μορφολογική δυσπλασία, μη αποδοτική αιμοποίηση με κυτταροπενίες στο περιφερικό αίμα και αυξημένο κίνδυνο εκτροπής σε ΟΜΛ [2]. Η προέλευση αυτών των προλευχαιμικών κλώνων που παρουσιάζουν εντοπίζεται σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα που αποκτούν ικανότητα αυτοανανέωσης με αναστολή της ικανότητας διαφοροποίησης [38], παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία και εκπτύσσονται κατά την εκτροπή σε ΟΜΛ, εδραιώνοντας όχι μόνο το νεοπλασματικό δυναμικό της νόσου, αλλά και τη χειρίστη πρόγνωση της σχετιζόμενης με ΜΔΣ ΟΜΛ [39].

Η ανεύρεση και η περιγραφή των βιολογικών μονοπατιών που οδηγούν στη μετατροπή αυτή μπορεί να αναδείξει θεραπευτικούς στόχους και έχει έτσι συγκεντρώσει ερευνητικό ενδιαφέρον. Παρότι επαναλαμβανόμενες γενετικές βλάβες, μεταξύ των οποίων οι σημειακές μεταλλάξεις σε επιγενετικούς ρυθμιστές, γονίδια ματίσματος του RNA, μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια σχετιζόμενα με την απάντηση στη βλάβη του DNA, ανιχνεύονται στα HSCs/HPCs των ασθενών με ΜΔΣ, αιτιοπαθογενετική συσχέτιση δεν έχει τεκμηριωθεί [30]. Υπολογίζεται ότι 10-20% των υγιών ατόμων ηλικίας 65-90 ετών παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις σχετιζόμενες τα ΜΔΣ, μια οντότητα που χαρακτηρίζεται ως κλωνική αιμοποίηση απροσδιόριστου δυναμικού (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential - CHIP), ενώ οι πλειονότητα των ΜΔΣ κλώνων παρουσιάζουν ένα εντυπωσιακό εύρος μοναδικών για τον κάθε κλώνο γενετικών διαταραχών [14,400]. Η παγκόσμια οικονομική επίπτωση της υποστηρικτικής φροντίδας που παρέχεται στους ασθενείς με ΜΔΣ, η κακή πρόγνωση της σχετιζόμενης με ΜΔΣ ΟΜΛ και η εντυπωσιακή γενομική ετερογένεια του συνδρόμου απαιτούν μια ολιστική προσέγγιση.

Με βάση την αωρότητα του φαινοτύπου και τουλάχιστον την αρχική εξάρτηση των δυσπλαστικών προγονικών κυττάρων από το υποξικό μικροπεριβάλλον του ΜΟ, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν τονίσει τις ομοιότητές τους με τα υγιή HSCs [191,192]. Τα υγιή HSCs εξαρτώνται από την τάση οξυγόνου του ΜΟ για να διατηρήσουν τις ιδιότητες του αρχέγονου κυττάρου και αυτό το επιτυγχάνουν μεταβάλλοντας τη γονιδιακή τους έκφραση προκειμένου να αποκτήσουν ένα κυρίως γλυκολυτικό παρά μιτοχονδριακό μεταβολικό προφίλ [401,402]. Ο μεταγραφικός παράγοντας που κατέχει κεντρικό ρόλο στην προσαρμογή αυτή είναι ο HIF-1 [163,203,403], ένας ετεροδιμερής παράγοντας

αποτελούμενος από μια σταθερά εκφραζόμενη β υπομονάδα και μια ευαίσθητη στο οξυγόνο α υπομονάδα [46]. Σε συνθήκες υποξίας, η υπομονάδα α διασώζεται από την αποδόμηση στο πρωτεάσωμα και ο το σταθερό διμερές του HIF-1 επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς γλυκόζης και ένζυμα που εμπλέκονται στην εξωμιτοχονδριακή της αποδόμηση, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg [404,405]. Μέσω θετικής ρύθμισης της μιτοφαγίας, η οποία αποτελεί έναν τύπο αυτοφαγίας λειτουργικών μιτοχονδρίων, και μέσω βελτιστοποίησης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transport Chain -ETC) των μιτοχονδρίων που παραμένουν, ο HIF-1 ελαττώνει την απελευθέρωση ROS εξασφαλίζοντας την ηρεμία [67,406,407]. Η δέσμευση για διαφοροποίηση αντανάκλαται στη μεταβολική αλλαγή από τη γλυκόλυση Warburg στο μιτοχονδριακό TCA και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλαγή η οποία χαρακτηρίζεται από την αποσταθεροποίηση του HIF-1α και την ταχεία αποδόμηση του [163,401,402]. Η αποτυχία αυτής της μετάβασης μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αναστολή της διαφοροποίησης, τη μη αποδοτική αιμοποίηση και το κακόηθες δυναμικό των ΜΔΣ κλώνων, τοποθετώντας τον HIF-1 σε κεντρική θέση στην ασαφή παθοβιολογία των ΜΔΣ.

Στη μελέτη αυτή, διερευνήσαμε την παθολογική σταθεροποίηση του HIF-1α σε CD34+ κύτταρα και διαφοροποιούμενα κύτταρα της μυελικής σειράς ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ χρησιμοποιώντας ένα μεταγραφικό στόχο του HIF-1, τον DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4) ή regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1) [408]. Δείξαμε ότι η σταθεροποίηση του HIF-1 αποτελεί χαρακτηριστικό όλο των υποτύπων ΜΔΣ, με το φαινόμενο να είναι ανεξάρτητο από το οξυγόνο και ως εκ τούτου να χαρακτηρίζεται εφεξής ως ψευδοϋποξία [409]. Προτείνουμε επίσης ότι το σημασμένο με ινδοκυανίνη (Indocyanine – IDC) παράγωγο του νιτροϊμιδαζολίου (Nitroimidazole – NIM) λειτουργεί ως δείκτης της εδραιωμένης ψευδοϋποξίας τόσο στα απομονωμένα κύτταρα της μυελικής σειράς, όσο και σε οστεομυελικές βιοψίες και προτείνουμε ότι ο βαθμός συσσώρευσης του NIM-IDC σχετίζεται άμεσα με τη βαρύτητα του ΜΔΣ, δηλαδή με το ποσοστό των βλαστών του ΜΟ. Τέλος, εκτιμήσαμε το ρόλο της συμβολής του HIF-1 στη μη αποδοτική μυελοποίηση των ΜΔΣ και έτσι το δυναμικό της θεραπευτικής του στόχευσης. Χρησιμοποιώντας ένα λειτουργικό αναστολέα του HIF-1α σε *in vitro* καλλιέργειες CD34+ HSCs από ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ, μετά από κατεύθυνση των καλλιιεργειών προς μυελική διαφοροποίηση, δείχνουμε ότι η αναστολή του HIF-1α έχει μετρίου βαθμού θετική επίδραση, τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική, στις καλλιέργειες των χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ, ενώ δεν επαρκεί για να διασώσει την καλλιέργεια στα ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών. Συμπεραίνουμε ότι η αναστολή του HIF-1 μπορεί να αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για τη βελτίωση της ουδετεροπενίας σε ορισμένους ασθενείς με ήπια ΜΔΣ, ωστόσο παραμένει ένα επιφανόμενο μιας σφαιρικής διαταραχής του μικροπεριβάλλοντος του ΜΟ που απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

6.2. Υλικά και μέθοδοι

6.2.1. Πληθυσμός μελέτης

Δείγματα αναρρόφησης μυελού των οστών, καθώς και οστεομυελικές βιοψίες, συλλέχθηκαν από 16 ασθενείς με πρωτοδιάγνωση ΜΔΣ, στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί θεραπεία, και από 7 μάρτυρες χωρίς κακοήγη αιματολογική διαταραχή. Οι υπότυποι των ΜΔΣ ταξινομήθηκαν βάσει της κατηγοριοποίησης WHO 2016 (Arber). Συγκεκριμένα η μελέτη περιέλαβε: 1 ασθενή με ΜΔΣ με δυσπλασία μιας κυτταρικής σειράς (single lineage

dysplasia -SLD), 10 ασθενείς με ΜΔΣ με δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών (multilineage dysplasia – MLD), 2 ασθενείς με ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών 1 (excess blasts 1- EB1), 2 ασθενείς με ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών 2 (excess blasts 2- EB2), 1 ασθενής με μεμονωμένη έλλειψη του χρωμοσώματος 5q (del5q). Στην ομάδα των ασθενών με ΜΔΣ συμπεριλήφθηκαν 4 γυναίκες και 12 άνδρες με εύρος ηλικιών από 63 έως 90 έτη και στην ομάδα των μαρτύρων 4 γυναίκες και 3 άνδρες με εύρος ηλικιών από 40 έως 83 έτη. Στην ομάδα των μαρτύρων, η αναρρόφηση του μυελού των οστών και η οστεομυελική βιοψία πραγματοποιήθηκαν για διαγνωστικούς λόγους ρουτίνας. Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΜΔΣ συνοψίζονται στον πίνακα 6.1.

Κωδικός ασθενή	Ηλικία (έτη)	Φύλο	Τύπος ΜΔΣ	IPSS-R	Hb (g/dl)	WBC (K/μl)	Ουδετερόφιλα (K/μl)	Αιμοπετάλια (K/μl)	Κυτταρογενεϊκή μελέτη ΜΟ	Βλάστες περιφερικού αίματος (%των εμπύρηνων κυττάρων)†	BM Blasts (%των εμπύρηνων κυττάρων)††	Κυτταροβρίθεια ΜΟ*	Εξάρτηση από μεταγγίσεις
1	81	Θήλυ	MLD	1	11,3	4,74	2,70	139	46,XX[20]	0	2	Φυσιολογική	Όχι
2	83	Άρρεν	MLD	1	13,0	3,53	1,90	142	46,XY[20]	0	2	Ελαττωμένη	Όχι
3	78	Άρρεν	MLD	2,5	6,6	3,25	1,25	116	46,XY[20]	0	3	Ελαττωμένη	Ναι
4	74	Θήλυ	Isolated del(5q)	2	8,5	2,77	1,67	386	46,XX,del(5q)[20]	0	1	Φυσιολογική	
5	82	Θήλυ	MLD	1	10,6	4,50	3,15	177	46,XX[20]	0	2	Φυσιολογική	Όχι
6	77	Άρρεν	MLD	1	9,3	4,90	2,74	324	46,X,-Y[20]	2	3	Φυσιολογική	Ναι
7	80	Άρρεν	SLD	3	8,8	8,18	5,64	520	46,XY[20]	0	0	Αυξημένη	Ναι
8	78	Άρρεν	MLD	3	9,5	2,38	1,67	148	46,XY[20]	0	4	Φυσιολογική	Ναι
9	77	Άρρεν	EB 1	6	9,4	1,83	0,60	56	46,XY, del(5)(q11.2q33), del(20)(q11.2~13.1)[18]/46,XY[1]	1	8	Φυσιολογική	
10	85	Άρρεν	MLD	3,5	5,6	3,48	2,50	131	47,XY,+8[20]/46,XY[5]	0	0	Φυσιολογική	Ναι
11	63	Άρρεν	MLD	2	10,7	3,16	0,90	274	46,XY, inv(9)(p12q13)[12]	0	0	Ελαττωμένη	Όχι
12	79	Θήλυ	EB 2	6	9,0	4,47	2,00	103	47,XX,+8[20]	5	15	Αυξημένη	Όχι
13	90	Άρρεν	EB 1	7,5	4,7	9,32	6,90	184	46,XY, del(7)(q21)[6]/45,XY?add(1)(p36),add(2)(q37),del(7)(q21),-20[15]	2	8	Φυσιολογική	Ναι
14	75	Άρρεν	EB 2	7	8,6	1,90	0,50	58	47,XY,+8[23]/46,XY[2]	3	15	Αυξημένη	Ναι
15	81	Άρρεν	MLD	3	8,0	1,78	0,50	145	47,XY,+8[23]/46,XY[2]	0	0	Αυξημένη	Όχι
16	81	Άρρεν	MLD	2	8,9	2,11	1,0	120	46,XY, del(20)(q11.2)[30]	0	1	Αυξημένη	Όχι

Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικά ασθενών με ΜΔΣ.

IPSS-R: Revised International Prognostic Scoring System, Hb: hemoglobin, WBC: white blood cells, BM: bone marrow, MLD: multilineage dysplasia, SLD: single lineage dysplasia, EB: excess blasts † εκτιμήθηκε με βάση τη μορφολογία σε επιχρίσματα περιφερικού αίματος, †† εκτιμήθηκε με βάση τη μορφολογία σε επιχρίσματα μυελού των οστών, *εκτιμήθηκε σε οστεομυελική βιοψία

6.2.2. Απομόνωση των κυττάρων του ΜΟ

Μετά την αναρρόφηση των δειγμάτων του μυελού από τους συμμετέχοντες στη μελέτη, το αναρρόφημα του ΜΟ τοποθετήθηκε επί διπλής στιβάδας φικόλης (Histopaque 10771, Histopaque 11191 – Sigma Aldrich). Μετά από φυγοκέντρηση, η χαμηλής πυκνότητας (πάνω) και η υψηλής πυκνότητας (κάτω) στιβάδα απομονώθηκαν και πλήθυσαν με PBS. Ακολούθησε χαρακτηρισμός των κυτταρικών στοιχείων κάθε στιβάδας τόσο με βάση τη μορφολογία, μετά από μελέτη σε οπτικό μικροσκόπιο, όσο και με βάση τη μελέτη κυτταρομετρίας ροής. Η υψηλής πυκνότητας στιβάδα περιείχε κύτταρα της μυελικής σειράς (χαρακτηρισμός με βάση τη μορφολογία: προμυελοκύτταρα 1,25%, μυελοκύτταρα 7,75%, μεταμυελοκύτταρα 5,5%, ραβδοπύρηνα 5,5%, ουδετερόφιλα 80%). Τα ποσοστά δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των μαρτύρων και των ασθενών με ΜΔΣ ($P > 0.05$, Mann Whitney test). Τα CD34+ κύτταρα εντοπίστηκαν στη χαμηλής πυκνότητας στιβάδα, μαζί με άλλα μονοπύρηνα κύτταρα του ΜΟ. Η χαμηλής πυκνότητας στιβάδα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των CD34+ κυττάρων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (Miltenyi Biotec), με βάση της οδηγίες του κατασκευαστή.

6.2.3. Απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και qRT-PCR

Τα CD34+ και τα κύτταρα της μυελικής σειράς του ΜΟ (υψηλής πυκνότητας στιβάδα) χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση mRNA, με χρήση πρωτοκόλλου εκχύλισης με χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA (Takara Bio Inc.). Η qRT-PCR (Kapa Biosystems) για τα γονίδια του *HIF1A* και του *DDIT4/REDD1* πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στον πίνακα 6.2.

Γονίδιο	Εκκιντής	Αλληλουχία εκκινητών	Συνθήκες RT-PCR
<i>DDIT4</i>	Forward	5' -GAGGAAGACACGGCTTAC 3'	Annealing/Elongation 52oC 40 min
	Reverse	5' -GCATCAGGTTGGCACAC 3'	
<i>HIF1A</i>	Forward	5' -CAGGACACAGATTTAGACTTGGAGA 3'	Annealing/Elongation 52oC 40 min
	Reverse	5' -AGTGGTAGTGGTGGCATTAGC 3'	
<i>GAPDH</i>	Forward	5' -GGGAAGCTTGTCATCAATGG 3'	Annealing/Elongation 52oC 40 min
	Reverse	5' -CATCGCCCCACTTGATTTTG 3'	

Πίνακας 6.2: Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την qRT-PCR

6.2.4. Κυτταρομετρία ροής

Η έκφραση των πρωτεϊνών HIF-1α και REDD1, με βάση τη μέση ένταση φθορισμού (median fluorescence intensity – MFI), προσδιορίστηκε σε κύτταρα buffy coat του ΜΟ, μετά από τη λύση των ερυθρών (Cytognos). Μετά από μονιμοποίηση και διαπερατοποίηση της μεμβράνης (IncellDX), η ενδοκυττάρια σήμανση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός αντι-ανθρώπινου HIF-1α-PE αντισώματος με προέλευση από ποντίκι (BioLegend) και ενός πολυκλωνικού αντι-ανθρώπινου REDD1 αντισώματος με προέλευση από κουνέλι (Proteintech). Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα έναντι IgG κουνελίου με προέλευση από όνο (Biolegend).

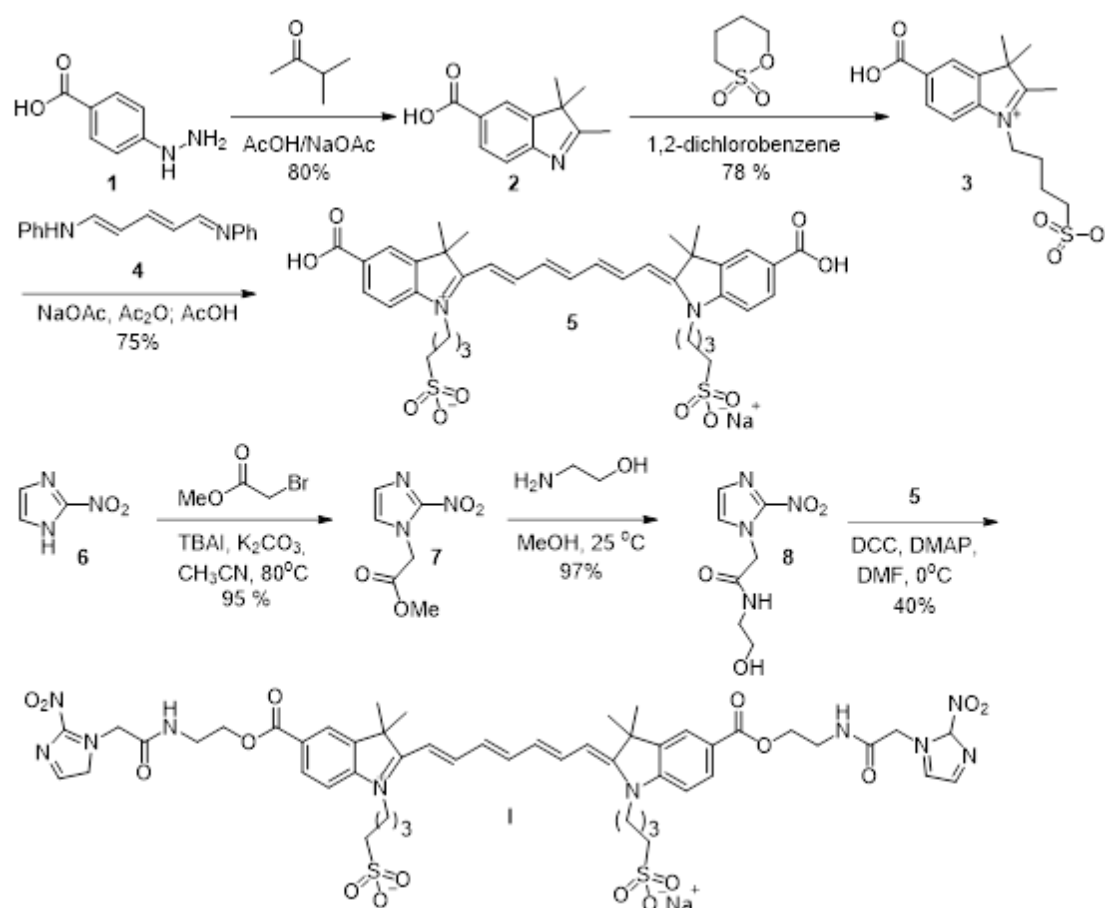
Η MFI των HIF-1α και NIM στις καλλιέργειες των CD34+ κυττάρων ΜΟ εκτιμήθηκε σε διαφορετικές μέρες τις καλλιέργειας (συγκεκριμένα ημέρα 0 και ημέρα 9). Για τον HIF-1α ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Η μελέτη της έκφρασης του NIM στην κυτταρομετρία ροής διενεργήθηκε μετά από άμεση επώαση των κυττάρων της καλλιέργειας με το σημασμένο με IDC NIM.

Για τη διάκριση των πληθυσμών των κυττάρων του ΜΟ χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των CD45, CD34, CD117, CD11b, CD14, CD66b.

Η διενέργεια της μελέτης κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο FACSCanto II.

6.2.5. Σύνθεση του σημασμένου με φθοριόχρωμα νιτροϊμιδαζολίου (NIM)

Το σημασμένο με ινδοκυανίνη (indocyanine – IDC) NIM που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη κατασκευάστηκε με βάση προηγούμενη δημοσιευμένη εργασία των Pavlik και συνεργατών [410]. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν κυρίως τις μεθόδους χειρισμού ή κάθαρσης των ενδιάμεσων παραγώγων (Πίνακας 6.3)



Πίνακας 6.3: Σύνθεση του συζευγμένου με φθοριόχρωμα NIM, με βάση την εργασία των Pavlik και συνεργατών [410]. Οι τροποποιήσεις που έγιναν αφορούν κυρίως το χειρισμό και την κάθαρση των ενδιάμεσων παραγώγων. Συγκεκριμένα, στη σύνθεση του 2,3,3-trimethyl-3H-indole-5-carboxylic acid **2**, το παράγωγο που προκύπτει συμμετείχε μεταξύ των CH₂Cl₂ και H₂O, οι δύο φάσεις διαχωρίστηκαν, η υδρική φάση πλήθυκε με CH₂Cl₂ και οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις

στέγνωσαν με Na₂SO₄ και εξατμίσθηκαν σε κενό/ Η κάθαρση του παραγώγου πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφία flash στήλης (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH 95:5) και το 2 προέκυψε ως ένα φωτεινό πορτοκαλί στερεό. Με τη χρήση του καθαρού 2 στη σύνθεση του 5-carboxy-1-(d-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolium betaine 3, η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 5 ώρες reflux και το 3 προέκυψε ως ένα πορτοκαλί στερεό. Το Methyl 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetate 7 υπέστη κάθαρση με short pad flash χρωματογραφία στήλης (SiO₂, CHCl₃/MeOH 95:5 to 9:1) και ελήφθη ως ένα λευκό στερεό.

6.2.6. Χρώση και ανοσοφθορισμός του NIM σε οστεομυελικές βιοψίες

Αμέσως μετά τη λήψη τους από του συμμετέχοντες στη μελέτη, οι οστεομυελικές βιοψίες εμβαπτίσθηκαν πλήρως σε 200μM διάλυμα NIM για 10 λεπτά στους 37°C, πλύθηκαν 2 φορές με PBS για 1 λεπτό και μετά τοποθετήθηκαν άμεσα σε φορμόλη. Μια οστεομυελική βιοψία επώασθηκε με indocyanine green και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας χρώση για τον ανοσοφθορισμό. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη, απαοβεστοποιήθηκαν με EDTA/HCl και τοποθετήθηκαν σε παραφίνη. Μελετήθηκαν σειριακές τομές (πάχους 7μm) από κάθε δείγμα. Τα δείγματα αποπαραφινολογήθηκαν με ξυλόλη και επανενυδατώθηκαν με επώαση σε αιθανόλη 100% για 5 λεπτά, αιθανόλη 96% για 2 λεπτά, αιθανόλη 80% για 2 λεπτά, 50% αιθανόλη για 2 λεπτά και dH₂O για 1-3 λεπτά. Οι τομές πλύθηκαν σε PBS, εμβαπτίσθηκαν σε buffer κυτταρικού (10Mm, pH 6) και επώασθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων. Μετά το κρύωμα, οι τομές πλύθηκαν σε PBS και ακολούθησε blocking με διάλυμα blocking (2% Ορός αλόγου) για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Ο ανοσοφθορισμός μελετήθηκε και αποτυπώθηκε με μεγέθυνση 10x και 40x σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP8. Σαρώθηκαν ολόκληρες οστεομυελικές βιοψίες ανά τμήματα και κατασκευάστηκε ένα πλήρες προφίλ του μυελού των οστών με μεγέθυνση 10x. Κοντινές λήψεις των 60x ελήφθησαν επίσης από κάθε δείγμα. Η ένταση του φθορισμού υπολογίσθηκε με διόρθωση των artifacts του background τόσο για το NIM-IDC όσο και για το DAPI μέσω ενδεδειγμένης περικοπής των περιοχών ενδιαφέροντος. Κάθε τιμή που ελήφθη standardized με διαίρεση με τον αρνητικό μάρτυρα NIM-IDC και τον ανοσοφθορισμό DAPI αντίστοιχα. Για τη διόρθωση της συνεντόπισης NIM-IDC/DAPI στανταρισμένες τιμές NIM-IDC διαιρέθηκαν με τις αντίστοιχες στανταρισμένες τιμές φθορισμού του DAPI. Η στατιστική ανάλυση των λόγων που υπολογίσθηκαν παρουσιάζεται στην εικόνα 3.

6.2.7. Ανοσοφθορισμός

Η μελέτη του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα MO μετά από την απομόνωση σε διπλή στιβάδα φικόλης. Τα κύτταρα της υψηλής και της χαμηλής πυκνότητας στιβάδας μελετήθηκαν ξεχωριστά. Τα κύτταρα εμφυτεύθηκαν σε καλυμμένες με λυσίνη γυάλινες καλυπτρίδες και καλλιεργήθηκαν σε RPMI ως καλλιεργητικό μέσο με προσθήκη 2% ανθρώπινου ορού στους 37°C και σε 5% CO₂ για 30min προκειμένου να attach. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν σε 4% διάλυμα παραφορμαλδεΰδης για 1 ώρα στους 4°C. Τα σημεία μη ειδικής δέσμωσης αποκλείστηκαν με 5% ορό αλόγου σε PBS.

Για την ανίχνευση αυτοφαγίας σε ειδικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, τα δείγματα σημάνθηκαν με ανι-ανθρώπινο LC3B αντίσωμα με προέλευση από κουνέλι (αραίωση 1:300; Sigma-Aldrich), παράλληλα με με ανι-ανθρώπινο CD34 με προέλευση από ποντίκι (Agilent) ή ανι-ανθρώπινο MPO με προέλευση από ποντίκι (Agilent) μονοκλωνικό αντίσωμα. Για περαιτέρω ποιοτική ανάλυση της αυτοφαγίας, ένα μονοκλωνικό ανι-ανθρώπινο LAMP1 αντίσωμα με προέλευση από ποντίκι (αραίωση 1:200; OriGene) ή ένα μονοκλωνικό ανι-ανθρώπινο TOMM20 με προέλευση από ποντίκι αντίσωμα (αραίωση 1:200; Novus Biologicals), χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με το ανι-LC3B μονοκλωνικό αντίσωμα. Ένα πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι αντιγόνων ποντικού με προέλευση από όνο και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι αντιγόνων ποντικού με προέλευση από αίγα

χρησιμοποιήθηκαν ως δευτερογενή αντισώματα. Η χρώση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση DAPI. Κατάλληλα IgGs ποντικού χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Ο ανοσοφθορισμός παρατηρήθηκε και σαρώθηκε με μεγέθυνση 63x/1.4NA σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP8.

6.2.8. Μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Για τη μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα κύτταρα της μυελικής σειράς μετά την απομόνωσή τους (υψηλής πυκνότητας στιβάδα) μετατράπηκαν σε πελλέτες στα 800g για 5min. Οι πελλέτες μονιμοποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη 2,5% σε 0,1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffer – PB) για 1ώρα στους 4° C. Μετά τα ακόλουθα πλυσίματα του ρυθμιστικού διαλύματος, οι πελλέτες τοποθετήθηκαν σε 4% low-melting αγαρόζη σε 0,1M PB. Μετά τη σταθεροποίησή τους, μικροί κύβιοι κόπηκαν και μονιμοποιήθηκαν με 1% τετροξίδιο του οσμίου για 1 ώρα σε πάγο. Μετά το πλύσιμο του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος, τα δείγματα αφυδατώθηκαν με αιθανόλη με πρωτόκλλο σταδιακών συγκεντρώσεων και τοποθετήθηκαν σε Epon/Araldite resin mixture. Λεπτές τομές κόπηκαν με Diatome μαχαίρι διαμαντιού σε πάχος 65nm σε μικροτόμο Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Vienna, Austria) και τοποθετήθηκαν επί πλεγμάτων άνθρακα 300mesh και βάφθηκαν με Uranyl acetate και κιτρικό μόλυβδο. Οι τομές μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Philips 420 σε τάση επιτάχυνσης 60kV και φωτογραφήθηκαν με κάμερα Megaview G2 CCD (Olympus SIS, Münster, Germany).

6.2.9. Καλλιέργειες των CD34+ κυττάρων

Μετά την απομόνωσή τους, τα CD34+ (καθαρότητα 91% με 98%) από 3 ασθενείς με ΜΔΣ-MLD, 3 ασθενείς με MDS-EB και 3 μάρτυρες καλλιεργήθηκαν και εκπύχθηκαν σε πλάκες 6-θέσεων (100.000/θέση). Οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για επώαση στους 37°C με 5% CO₂, 85% υγρασία και 21% O₂ στον αέρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στο καλλιεργητικό μέσο Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Biosera), με προσθήκη 10% FBS, πενικιλίνης G(5U/ml) και στρεπτομυκίνης (5μg/ml). Ένα πρωτόκολλο καλλιέργειας με διαφορετικά στάδια πραγματοποιήθηκε για την ex vivo έκπτυξη και τη διαφοροποίηση ως τροποποίηση ενός δημοσιευμένου πρωτοκόλλου [411], το οποίο περιελάμβανε στο στάδιο 1 (ημέρες 0-3) και το στάδιο 2 (ημέρες 4-16). Για κάθε στάδιο διαφορετικοί συνδυασμοί αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών προστέθηκαν στο καλλιεργητικό μέσο. Οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: για το στάδιο 1 SCF 100μg/ml (Peprotech), IL-3 10ng/ml (Peprotech), FLT-3L 100ng/ml (Peprotech), G-CSF 75ng/ml (Peprotech), GM-CSF 15ng/ml (Peprotech) και για το στάδιο 2 SCF 100ng/ml, FLT-3L 100ng/ml, G-CSF 100ng/ml. Οι κυτταροκίνες αντικαθιστούνταν με νέες κάθε 3 μέρες. Για την αναστολή του HIF-1, οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με τις ίδιες συνθήκες με την επιπλέον προσθήκη 10μM αναστολέα του HIF-1α (methyl 3-[[2-[4-(2-adamanty)phenoxy]acetyl]amino]-4-hydroxybenzoate, Santa Cruz Biotechnology) από την ημέρα 0. Ο αριθμός των κυττάρων και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά προσδιορίζονταν κάθε 3 μέρες με αυτοματοποιημένο σύστημα μέτρησης κυττάρων (Coulter) και cytospins με χρώση May-Grunwald-Giemsa (Merck) αντίστοιχα.

6.2.10. Στατιστική ανάλυση

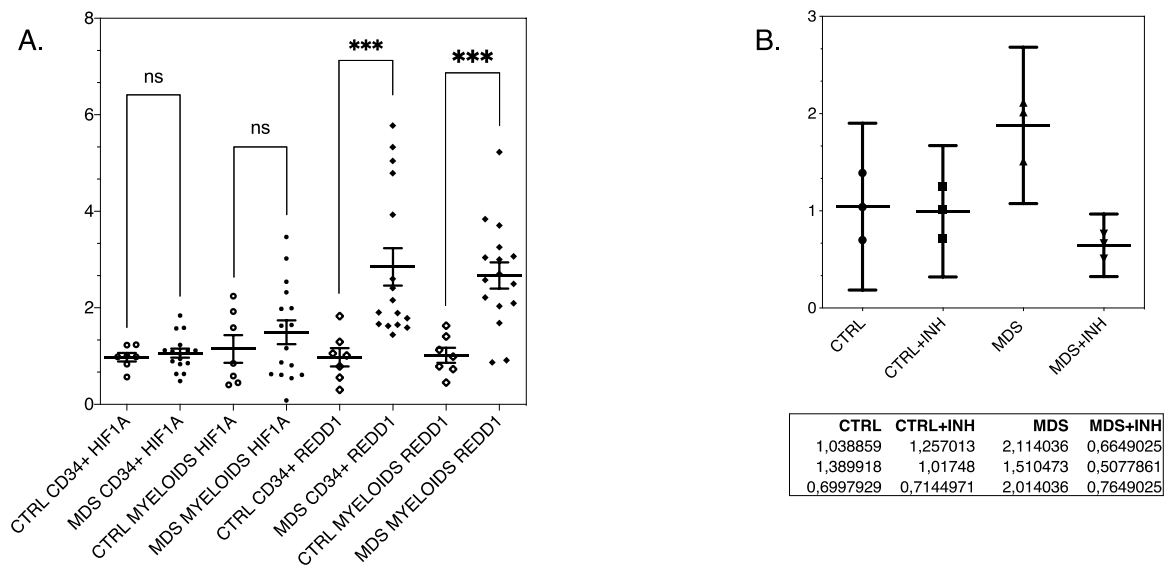
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού τεστ Mann Whitney. Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism v8 (San Diego, California USA, www.graphpad.com). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean ± SD. Οι διαφορές που θεωρούνται στατιστικά σημαντικές ορίζονται στο επίπεδο P < 0.05.

6.3. Αποτελέσματα

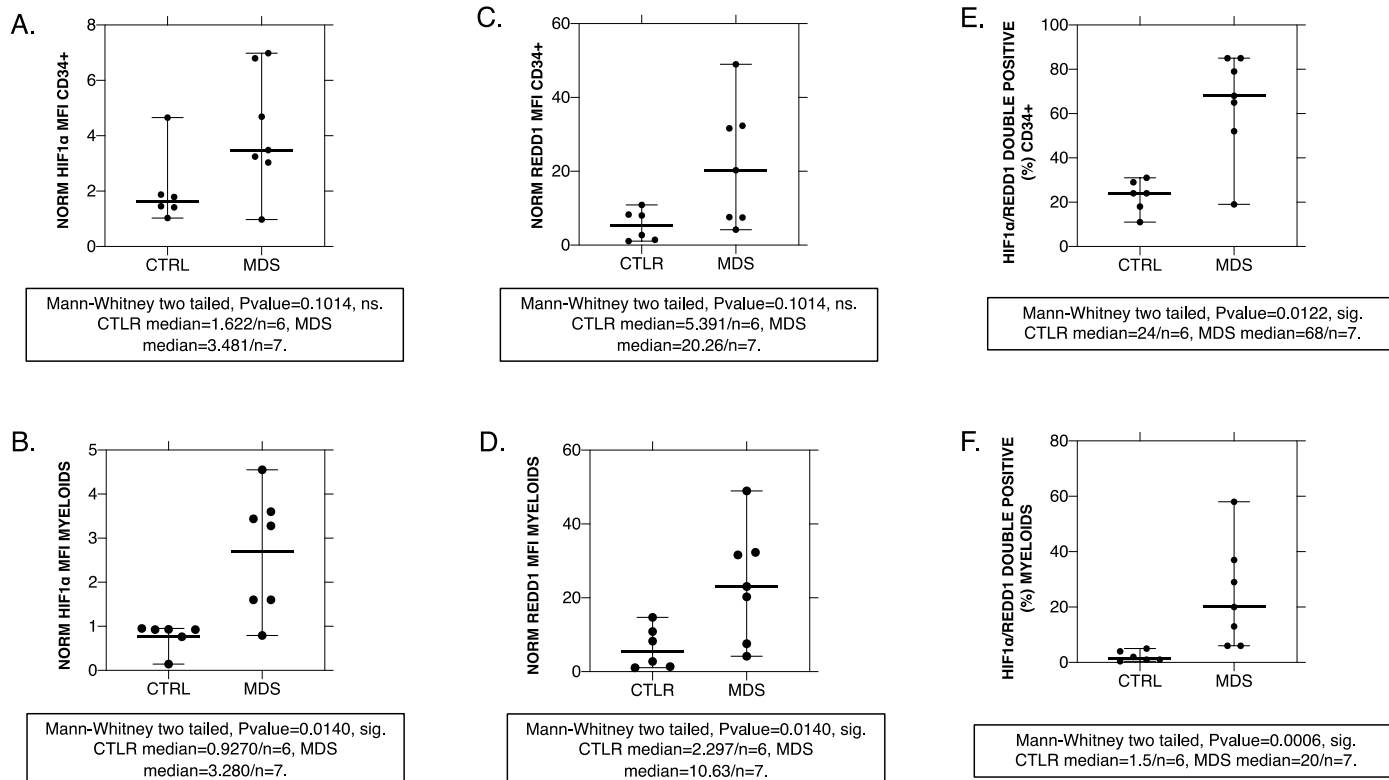
6.3.1. Τα CD34+ και τα μυελικά κύτταρα του ΜΟ των ασθενών με ΜΔΣ παρουσιάζουν ένα προφίλ ενεργοποίησης της HIF1 με αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης του REDD1

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη σηματοδότηση του HIF-1 στη μυελοδυσπλασία, μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του HIF-1α και του μεταγραφικού στόχου του HIF-1, REDD1, σε δείγματα μυελού των οστών 16 ασθενών με διάγνωση ΜΔΣ, οι οποίοι δεν είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία (ή 7 για τα επίπεδα πρωτεΐνης) και 7 μαρτύρων (ή 6 για τα επίπεδα πρωτεΐνης). Τα επίπεδα mRNA του HIF1A, όπως εκτιμήθηκαν με ποσοτική real-time PCR (qRT-PCR), δε διέφεραν μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ και των μαρτύρων, ενώ τα επίπεδα mRNA του REDD1 ήταν σημαντικά αυξημένα στα CD34+ και τα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ (εικόνα 6.1A).

Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, όπως εκτιμήθηκαν με κυτταρομετρία ροής σε 7 ασθενείς με ΜΔΣ [n=4 ΜΔΣ με δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών (multilineage dysplasia-MLD), n=2 ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών 1 (excess blasts1 -EB1), n=1 ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών 2 (excess blasts2-EB2)] και σε 6 μαρτύρες, έδειξαν αυξημένη έκφραση των πεπτιδίων τόσο του HIF-1α, όσο και του REDD1 στα CD34+ και τα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ. Με στατιστική σημαντικότητα να τεκμηριώνεται μόνο στα μυελικά κύτταρα ωστόσο (εικόνα 6.2A, 6.2B, 6.2D, 6.2E). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εγγενή θετικότητα των CD34+ κυττάρων για τον HIF-1, η οποία ακολούθως οδηγεί σε πρωτεϊνική έκφραση του REDD1 σε φυσιολογικές συνθήκες. Όταν ωστόσο εκτιμήθηκε η διπλή θετικότητα των κυττάρων για της πρωτεΐνες του HIF-1α και του REDD1 σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν τόσο στα CD34+, όσο και στα μυελικά κύτταρα (εικόνα 6.2C, 6.2F). Το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει εναλλακτικά ρυθμιστικά μονοπάτια που μπορεί να οδηγούν σε επιπλέον μεταγραφική ενεργοποίηση του REDD1, τα οποία είναι παρόντα ήδη από το στάδιο των CD34+ HSCs στην ομάδα των μαρτύρων, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε περαιτέρω όταν τα επίπεδα mRNA του REDD1 εκτιμήθηκαν σε καλλιέργειες CD34+ κυττάρων μυελού των οστών μαρτύρων με αναστολή του HIF-1 (εικόνα 6.1B). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο HIF-1 είναι παθολογικά ενεργός στα ΜΔΣ ήδη από το στάδιο των CD34+ HSCs και αυτό οφείλεται σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση του πεπτιδίου του HIF-1α. Επίσης παρατηρούμε ότι ο μεταγραφικός στόχος του HIF-1, REDD1, εκφράζεται επίσης παθολογικά και ότι αυτό οφείλεται μερικώς και πιθανά κυρίως σε μια εξαρτώμενη από τον HIF-1 ρύθμιση, εδραιώνοντας το λειτουργικό μεταγραφικό πρόγραμμα του HIF-1. Πρέπει να σημειωθεί η μεγάλη μεταβλητότητα της πρωτεϊνικής έκφρασης τόσο στα CD34+, όσο και στα μυελικά κύτταρα, η οποία αποδίδεται στην πολυμορφική φύση της παθοφυσιολογίας των ΜΔΣ και στον επακόλουθο συνδρομικό κλινικό φαινότυπο (εικόνα 6.2A-6.2F).



Εικόνα 6.1: (A) Έκφραση του mRNA των *HIF1A* και *REDD1* στα CD34+ και μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ (n=16) και των μαρτύρων (n=7) ns: non-significant, sig: significant. Mann-Whitney Pvalue>0.05 ή <0.05 αντίστοιχα (B) Η έκφραση του mRNA του *REDD1* στις in vitro καλλιέργειες των CD34+ κυττάρων μετά από 16 μέρες διαφοροποίησης. Δεδομένα από 3 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζονται μαζί με τα mean±SD. Ο πίνακας περιλαμβάνει τις τιμές που απεικονίζονται στο γράφημα.

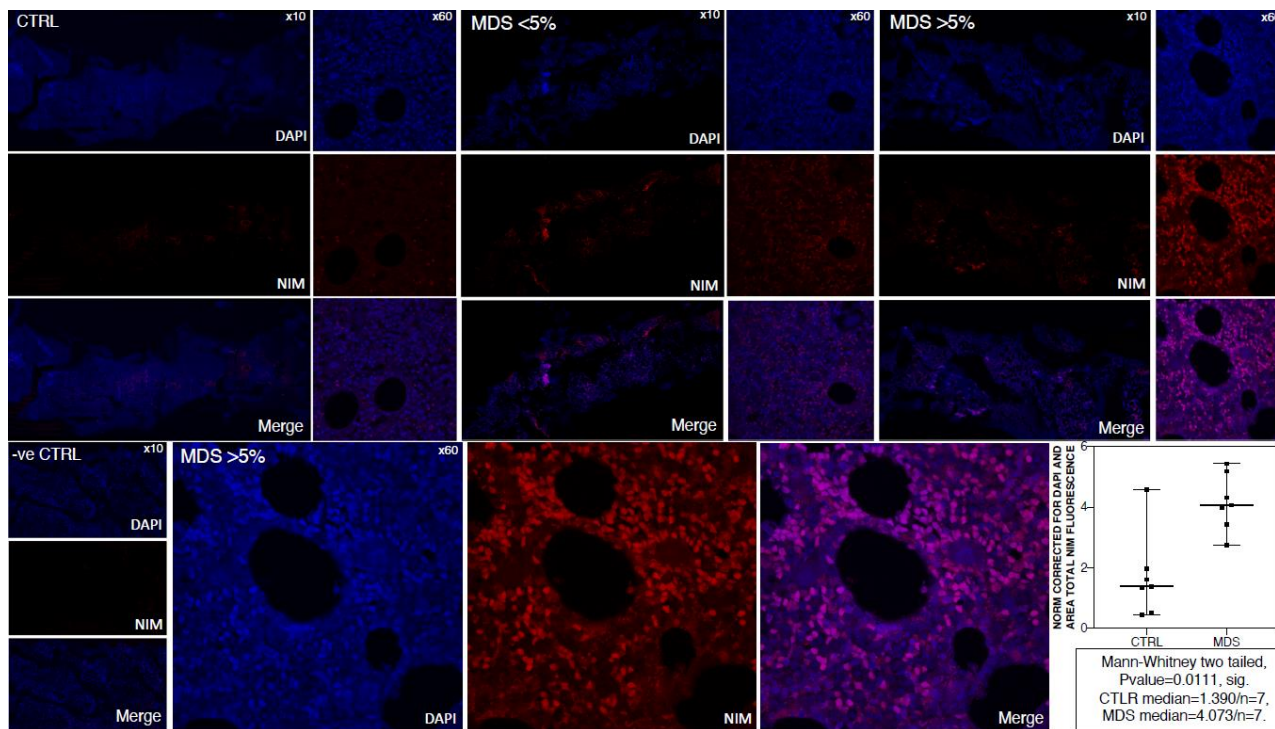


Εικόνα 6.2: Η κινητική των πρωτεϊνών HIF-1α και REDD1 στα CD34+ και στα διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα μαρτύρων (CTRL/n=6) και ασθενών με ΜΔΣ (MDS/ n=7). Η έκφραση του HIF-1α (Α και Β), του REDD1 (C και D), καθώς και η συν-έκφραση των HIF-1α/REDD1 (E και F) εκτιμήθηκαν με κυτταρομετρία ροής με ακόλουθη στατιστική ανάλυση για την ανάδειξη σημαντικότητας. Παρότι στην ομάδα των ΜΔΣ διαπιστώνεται μεγάλη μεταβλητότητα η οποία αντικατοπτρίζει τη συνδρομική φύση αυτής της κλινικής οντότητας, διαπιστώνεται διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των ΜΔΣ, παρότι δεν τεκμηριώνεται σημαντικότητα (Α και Β). Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση με τη βαρύτητα του ΜΔΣ, με αποτέλεσμα όλα τα δείγματα, δηλαδή με βλάστες μυελού <5% και βλάστες >5%, εκτιμήθηκαν συνολικά. Επισημαίνεται ωστόσο ότι οι μέγιστες τιμές MFI (Median Fluorescence Intensity) των HIF-1α και REDD1 στα μυελικά κύτταρα, δηλαδή σε ένα στάδιο διαφοροποίησης όπου τα επίπεδα του HIF-1α άρα και η MFI θα έπρεπε φυσιολογικά να ελαττώνονται, παρατηρούνται σε χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ (B και D). Στα CD34+ κύτταρα, τέτοια συσχέτιση δεν παρατηρείται (Α και C). Το φαινόμενο αποτυπώνεται επίσης στο πρότυπο της συν-έκφρασης HIF-1α/ REDD1 (E και F), όπου η μέγιστη συν-έκφραση αντιστοιχεί στον ίδιο χαμηλού κινδύνου ασθενή. Η μεγάλη μεταβλητότητα στη συν-έκφραση στην ομάδα των ΜΔΣ υποδηλώνει μια πιο σύνθετη φύση της ρύθμισης του REDD1 πέρα από τη σταθεροποίηση του HIF-1 που παρατηρείται όχι μόνο στα κύτταρα της μυελικής σειράς (F), αλλά και στα CD34+ κύτταρα (E). ns: non-significant, sig.: significant. Mann-Whitney P value >0.05 ή <0.05 αντίστοιχα.

6.3.2. Ο ΜΟ των ΜΔΣ παρουσιάζει αυξημένη ενδοκυττάρια συσσώρευση NIM που σχετίζεται θετικά με τη σοβαρότητα του ΜΔΣ

Προκειμένου να ισχυροποιήσουμε την υπόθεση ότι η σταθεροποίηση του HIF-1α είναι το αποτέλεσμα ενός προβληματικού μικροπεριβάλλοντος ΜΟ των ΜΔΣ καθώς και του ενδοκυττάριου περιβάλλοντος, μελετήσαμε την αναπνοή του ΜΟ χρησιμοποιώντας ένα συμβατικό υποξικό δείκτη παράγωγο του νιτροιμιδαζολίου, 2-NIM, συζευγμένου με μια φθορίζουσα χρωστική ινδοκυανίνης (IDC) (πίνακας 6.3). Δείγματα ολόκληρων οστεομυελικών βιοψιών επωάσθησαν αμέσως μετά τη λήψη τους στο διάλυμα του ιμιδαζολίου. Η μελέτη σε συνεστιακό μικροσκόπιο οστεομυελικών βιοψιών μαρτύρων

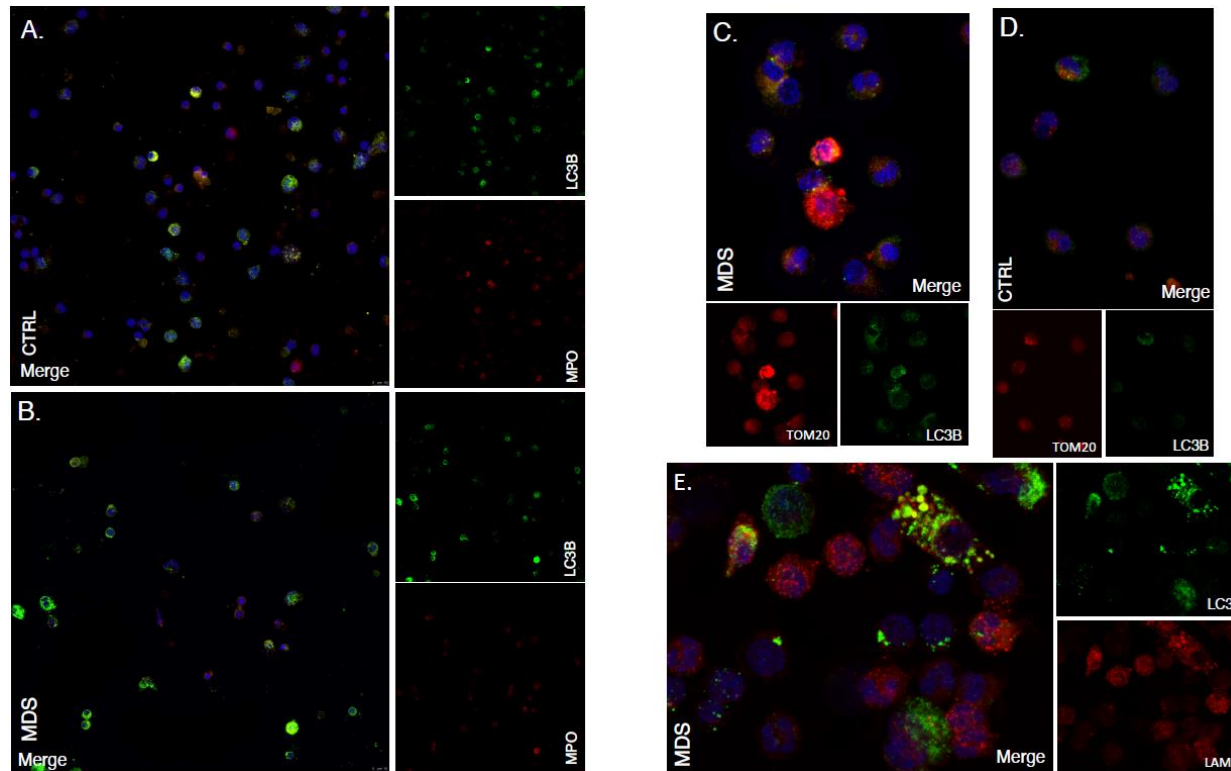
(n=3) και ασθενών με ΜΔΣ n=3 MDS-EB1/2, n=4 MDS-MLD) απέδωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές στον ανοσοφθορισμό του NIM-IDC μεταξύ των δύο ομάδων (εικόνα 6.3 – κάτω δεξιό τμήμα). Για να αυξήσουμε την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων διορθώσαμε τον ανοσοφθορισμό NIM-IDC για την κυτταροβρίθεια και την περιοχή διαιρώντας με τον ανοσοφθορισμό του DAPI. Επίσης διορθώσαμε τις περιοχές συνεντόπισης DAPI/NIM. Τεκμηριώθηκε στατιστικά σημαντική αυξημένη ενδοκυττάρια εντόπιση NIM-IDC στην ομάδα των ΜΔΣ (εικόνα 6.3 κάτω δεξιό τμήμα). Επιπλέον, ο διορθωμένος συνολικός NIM-IDC ανοσοφθορισμός σχετίζεται άμεσα με τη βαρύτητα του ΜΔΣ, όπως αυτή εκτιμάται από το ποσοστό βλαστών του ΜΟ. Η παρατηρούμενη συνεντόπιση DAPI/NIM ήταν επίσης σημαντικά αυξημένη καθώς αυξάνεται η βαρύτητα του ΜΔΣ (εικόνα 6.3). Σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων σε σημεία όπου η συνεντόπιση ήταν εμφανής, προτείνουμε ότι μπορεί να αντιστοιχούν σε αποπτωτικούς πυρήνες (συζήτηση). Η αυξημένη συσσώρευση NIM-IDC στο δυσπλαστικό ΜΟ δεν αποδίδεται στους αυξημένους CD34+ βλάστες του ΜΟ. Το δείγμα με δυσπλασία πολλαπλών κυτταρικών σειρών και 0% βλάστες ΜΟ έδειχνε σημαντικά αυξημένη συσσώρευση NIM-IDC σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Κοντινές λήψεις (x63/1.4 NA objective) και ακόλουθα z stacks αναδεικνύουν διαφοροποιούμενα κύτταρα της ερυθράς και της μυελικής σειράς με κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις NIM-IDC (εικόνα 6.3-μεσαία τμήματα). Αποφύγαμε τη χρήση διπλής χρώσης ανοσοφθορισμού στα δείγματα των οστεομυελικών βιοψιών που είχαν επωασθεί με το NIM-IDC προκειμένου να ελαττώσουμε biased σήματα, δεδομένων των ιδιοτήτων αυτό-φθορισμού του IDC. Συμπεραίνουμε ότι σε κυτταρικό επίπεδο στο ΜΟ των ασθενών με ΜΔΣ ψευδοϋποξικές συνθήκες προκαλούν τη συσσώρευση του NIM-IDC και προτείνουμε ότι η χρώση NIM-IDC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ψευδοϋποξίας που παρατηρείται στα ΜΔΣ με μερικούς ωστόσο περιορισμούς.



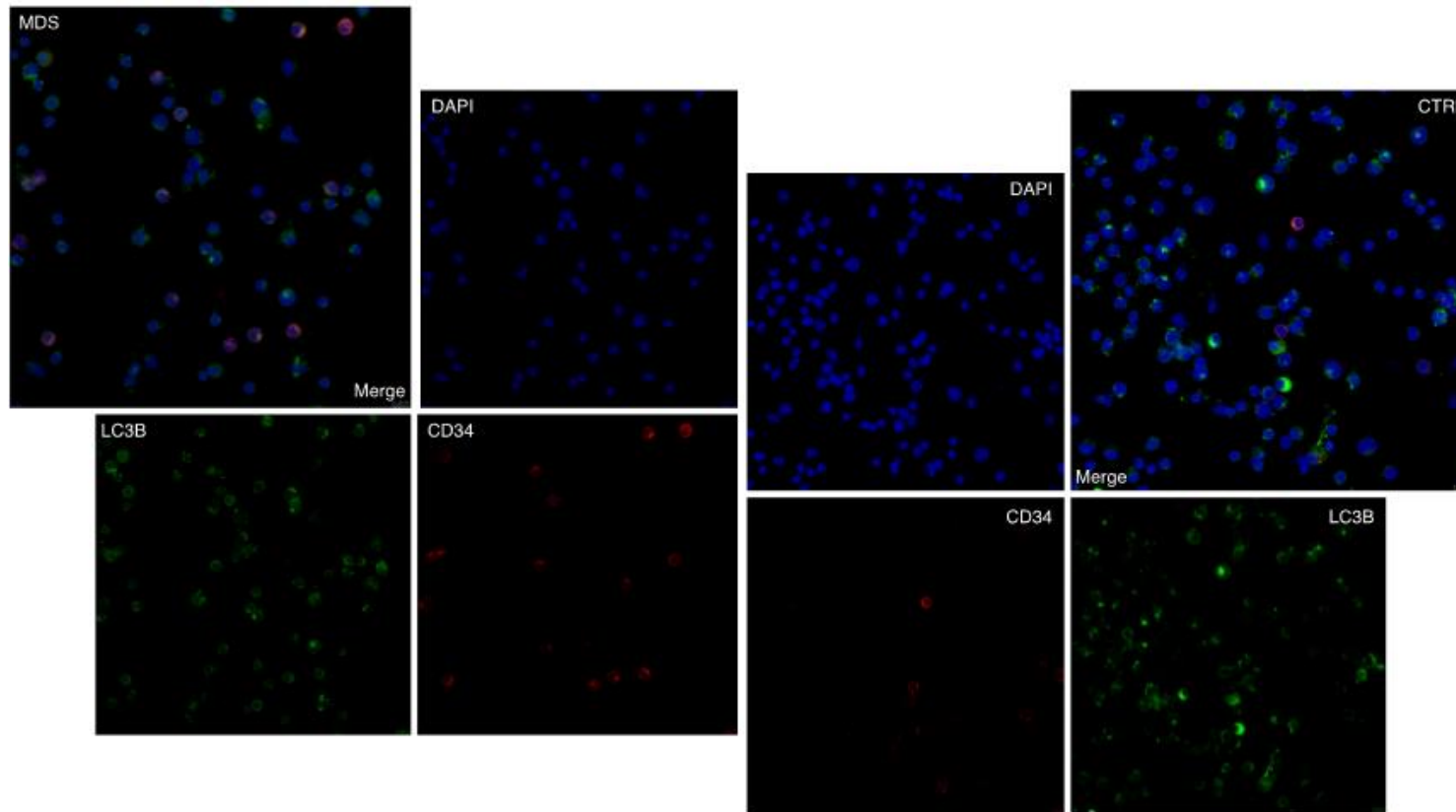
Εικόνα 6.3: Ανοσοφθορισμός 2-NIM-IDC (κόκκινο) σε οστεομυελικές βιοψίες μαρτύρων (CTRL/n=7) και ασθενών με ΜΔΣ (MDS/n=7). Αντιπροσωπευτικά δείγματα ενός μάρτυρα και δύο ασθενών με ΜΔΣ, καθώς και αρνητικού μάρτυρα (-ve CTRL) παρουσιάζονται. Το DAPI (μπλε) χρησιμοποιήθηκε σα χρώση αντίθεσης δεδομένου του διαφορετικού φάσματος διέγερσης και εκπομπής από το NIM-IDC. Η σάρωση τόσο ολόκληρης της τομής (x10 και x20) όσο και η εστίαση (x60) παρουσιάζονται. Εικόνες της εστίασης από τα ΜΔΣ με >5% βλάστες μυελού παρουσιάζονται επίσης σε μεγέθυνση για την οπτικοποίηση της ενδοκυττάριας χρώσης του 2-NIM-IDC. Η συνεντόπιση του 2-NIM-IDC με το DAPI αποδίδεται σε αυξημένη απόπτωση και διορθώθηκε προκειμένου να υπολογισθεί ο ανοσοφθορισμός του INM-IDC λαμβάνοντας υπόψιν και τις διαφορές στις περιοχές της τομής. Προκειμένου να εξασφαλισθεί η ακρίβεια της μεθόδου παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά δύο τομές διαφορετικού βάθους εντός του κάθε δείγματος της βιοψίας για τα δείγματα των μαρτύρων και των ασθενών με ΜΔΣ. Παρουσιάζουμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριου ανοσοφθορισμού του 2-NIM-IDC στα δείγματα των ασθενών με ΜΔΣ, με τη συσσώρευσή του να αυξάνεται ανάλογα με τη βαρύτητα του ΜΔΣ. Να σημειωθεί ότι η βαρύτητα του ΜΔΣ σχετίζεται επίσης οπτικά με τη βαρύτητα της απόπτωσης. ns: non-significant, sig: significant. Mann-Whitney Pvalue>0.05 ή <0.05 αντίστοιχα

6.3.3. Η μιτοφαγία και ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά της μυελικής σειράς των ασθενών με ΜΔΣ, με τη σοβαρότητά τους να αυξάνεται με την αύξηση των βλαστών του ΜΟ

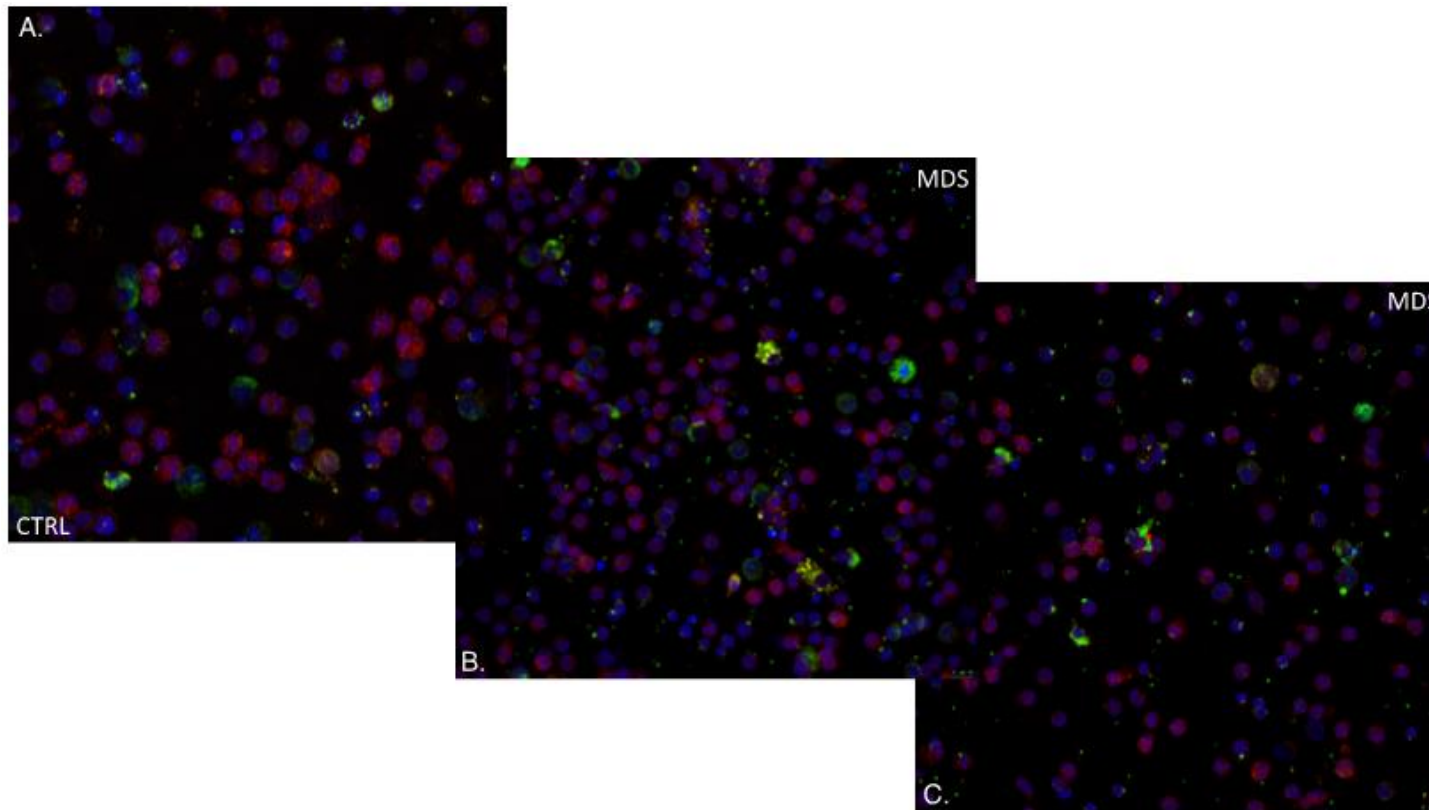
Η επαγόμενη από την υποξία αυτοφαγία αποτελεί μέρος ενός γενικού μηχανισμού κυτταρικής προσαρμογής που ελέγχεται από τον HIF-1 και θα μπορούσε επομένως να ενεργοποιείται ακόμα και σε συνθήκες μη κανονικής ενεργοποίησης του HIF-1. Μελετήσαμε λοιπόν το αυτοφαγικό στάτους CD34+ και MPO+ κυττάρων από 5 ασθενείς με ΜΔΣ και 3 μάρτυρες. Ο ανοσοφθορισμός για την LC3B (Microtubule Associated Protein Light Chain 3B) έδειξε αυξημένο σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων, συγκεκριμένα αυξημένα σήματα puncta στα MPO+ κύτταρα, δηλαδή τα διαφοροποιούμενα κύτταρα της μυελικής σειράς (εικόνα 6.4A και B), ενώ το φαινόμενο ήταν ουσιαστικά απόν από τα CD34+ κύτταρα (εικόνα 6.5). Η συνεντόπιση LC3B/TOMM20 ((Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) στη διαφοροποιούμενη μυελική σειρά των ασθενών με ΜΔΣ ανέδειξε εντόπιση των μιτοχονδρίων εντός της LC3B+ μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος, ενώ η συνεντόπιση LC3B/LAMP1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1) τεκμηρίωσε την ολοκλήρωση της αυτοφαγίας με τη σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσosώματος (εικόνες 6.4C, 6.4D και 6.4E αντίστοιχα, εικόνα 6.6).



Εικόνα 6.4: Η αυτοφαγία παρουσιάζεται αυξημένη στα διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ (Α και Β). Τα επίπεδα της αυτοφαγίας στα μυελικά κύτταρα (στιβάδα υψηλής πυκνότητας), μετά το density gradient διαχωρισμό, όπως εκτιμήθηκε με ανοσοφθορισμό για LC3B. Κόκκινο: MPO, Πράσινο: LC3B, Μπλε: DAPI. Μεγέθυνση 63x/1,4NA. Ένα από 4 ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζεται. (C και D) Ενεργός μιτοφαγία στα μυελικά κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ και μάρτυρα όπως εκτιμήθηκε με ανοσοφθορισμό LC3B/TOMM20. Κόκκινο: TOMM20, Πράσινο: LC3B, Μπλε: DAPI. Μεγέθυνση 63x/1,4NA αντιπροσωπευτικό close-up. Ένα από δύο ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζεται. (E) Ανοσοφθορισμός των LC3B και LAMP1 στα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ. Μεγέθυνση 63x/1,4NA αντιπροσωπευτικό close-up. Κόκκινο: LAMP1, Πράσινο: LC3B, Μπλε: DAPI. Ένα από 3 αντιπροσωπευτικά πειράματα παρουσιάζεται. LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, MPO: Myeloperoxidase, TOMM20: Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20, LAMP1: Lysosomal-associated membrane protein

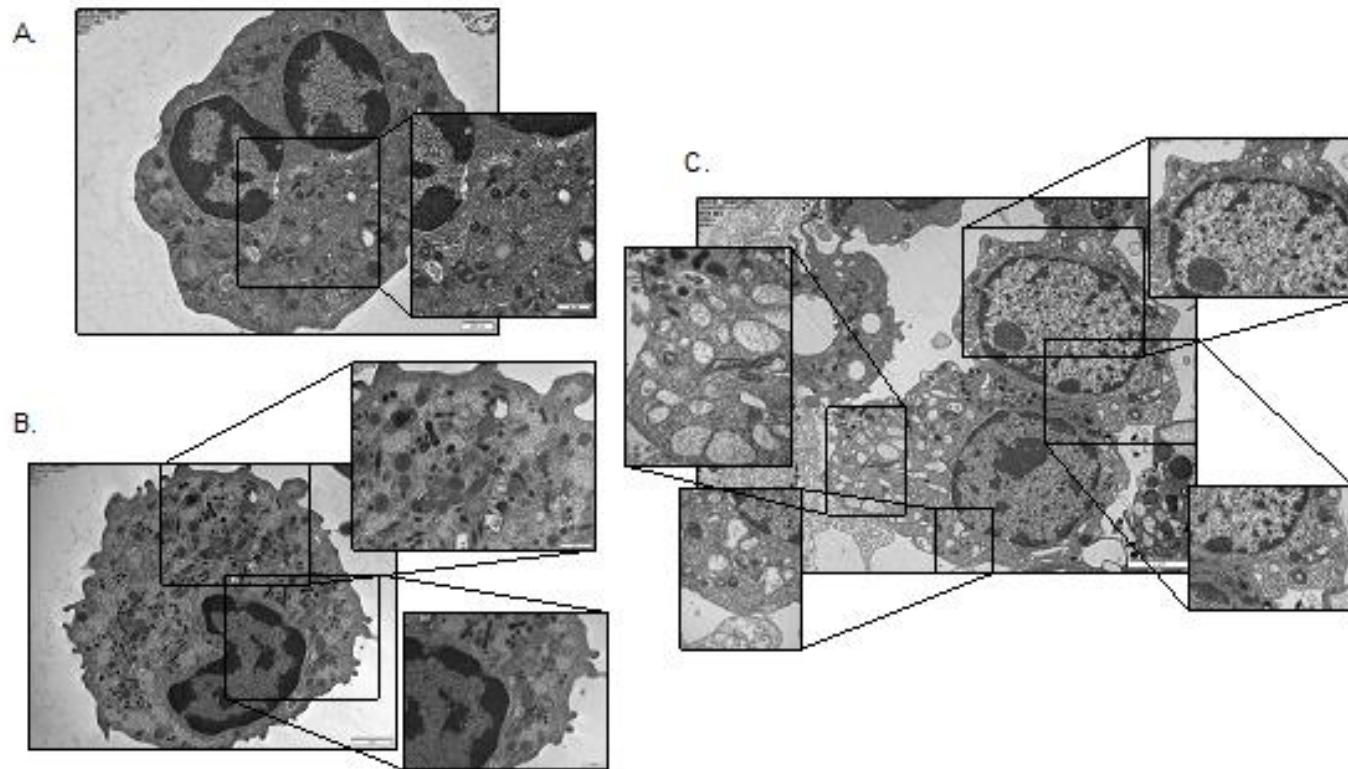


Εικόνα 6.5: Ανοσοφθορισμός για CD34 και LC3B σε δείγματα ενός μάστρυα (CTRL) και ενός ΜΔΣ. Κόκκινο: MPO, Πράσινο: LC3B, Μπλε: DAPI. Μεγέθυνση 63x/1.4NA. Ένα από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα παρουσιάζεται. Τα κύτταρα που απεικονίζονται αντιστοιχούν σε μονοπύρηνια κύτταρα της χαμηλής πυκνότητας στιβάδας μετά τη φυγοκέντρηση δειγμάτων αναρρόφησης μυελού σε διπλή στιβάδα φικόλης. Ανεξάρτητα από το ποσοστό των CD34+ κυττάρων δεν παρατηρείται διαφορά στον ανοσοφθορισμό του LC3B. Ο ασθενής με ΜΔΣ παρουσίαζε ποσοστό βλαστών μυελού >5%, όπως φαίνεται και από τον ανοσοφθορισμό του CD34. LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B.

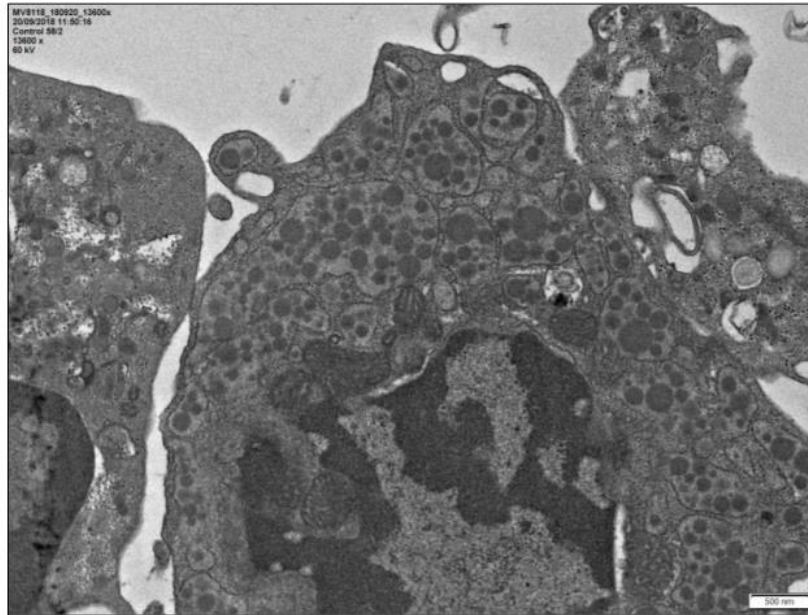


Εικόνα 6.6: Ανοσοφθορισμός των LC3B και LAMP-1 στα μυελικά κύτταρα μάρτυρα (CTRL -A) και ασθενών με ΜΔΣ (MDS -B και C). Objective 63x/1.4NA. Red: LAMP1, Green: LC3B, Blue: DAPI. LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LAMP-1: Lysosomal-associated membrane protein 1. Παρουσιάζονται μόνο οι συγχωνευμένες εικόνες.

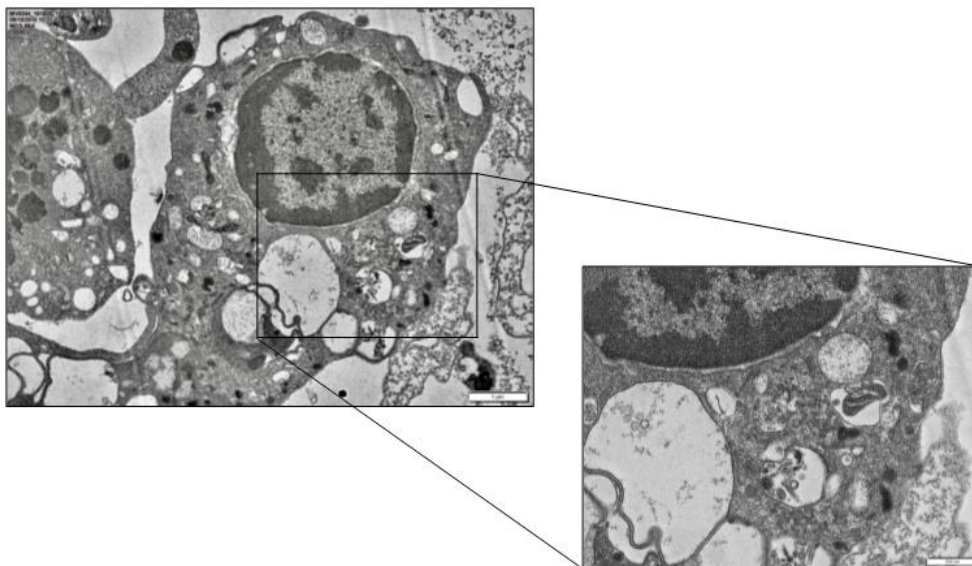
Ακολουθώς, η μυελική σειρά των ασθενών με ΜΔΣ μελετήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (εικόνα 6.7). Η αφθονία των αυτοφαγικών κενοδοπιών, μεταξύ των οποίων αυτοφαγώματα διπλής μεμβράνης με εσωτερικευμένα μιτοχόνδρια, επιβεβαίωσε την αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα με ενεργό μιτοφαγία (εικόνες 6.7B και 6.7C). Τα χαρακτηριστικά αυτά ήταν απόντα στους μάρτυρες (εικόνα 6.7A). Το πιο σημαντικό εύρημα κατά την παρατήρηση της μυελικής σειράς των ΜΔΣ ήταν οι ενδιαφέρουσες αλλαγές του μιτοχονδριακού περιεχομένου. Ενώ τα δείγματα από τα πιο ήπια ΜΔΣ με <5% βλάβες έδειχναν πλήρη απουσία μιτοχονδρίων παράλληλα με ενεργό μιτοφαγία (εικόνα 6.7B), τα αντίστοιχα δείγματα των πιο επιθετικών ΜΔΣ με >5% βλάβες παρουσίαζαν εξαιρετικά διαταραγμένη μιτοχονδριακή μορφολογία (εικόνες 6.7C, εικόνα 6.8, εικόνα 6.9). Εκτός από σημαντικά αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα, τα μυελικά κύτταρα των υψηλού κινδύνου ΜΔΣ εμφανίζουν επιμηκυμένα, παθολογικά και ακόμη και εξαιρετικά μεγέθους μιτοχόνδρια για το στάδιο της διαφοροποίησής τους (εικόνες 6.7C εικόνα 6.9). Η μιτοχονδριακή μορφολογία των κυττάρων αυτών προβληματίζει σχετικά με το κατά πόσο η αυξημένη σταθεροποίηση του HIF-1α που παρατηρείται τουλάχιστον στην ομάδα αυτή είναι όντως ένα επιφαινόμενο της ψευδοϋποξίας που εμπλέκεται στη διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας.



Εικόνα 6.7: Μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των διαφοροποιούμενων κυττάρων της μυελικής σειράς μετά από διαχωρισμό δειγμάτων αναρρόφησης μυελού των οστών σε στιβάδα διπλή φικόλης (υψηλής πυκνότητας στιβάδα. (A) Μάρτυρας (B) ΜΔΣ με <5% βλάστες μυελού (C) ΜΔΣ με >5% βλάστες μυελού. (A). Ωριμα υγιή ουδετερόφιλα με πολλαπλά μικρά υγιή μιτοχόνδρια (επισημαίνεται στο μαύρο πλαίσιο) (B) ώριμα κύτταρα της μυελικής σειράς με πλήρη απουσία μιτοχονδρίων και παρουσία αυτοφαγοσωμάτων διπλής μεμβράνης σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (C) Εμφανώς άτυπη μυελική σειρά χωρίς κοκκία και αωρότητα πυρήνα. Αφθονία μεγάλων, επιμηκυμένων μιτοχονδρίων και πολλαπλών ωριμάζοντων αυτοφαγοσωμάτων, μερικά εκ των οποίων να έχουν εσωτερικεύσει μιτχόνδρια. Στην πάνω αριστερή γωνία κάθε εικόνας αναγράφονται η scale bars και οι μεγεθύνσεις



Εικόνα 6.8: Μελέτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φυσιολογικής διαφοροποιούμενης μυελικής σειράς (δείγμα μάρτυρα) στο στάδιο του μυελοκυττάρου-μεταμυελοκυττάρου. Φυσιολογικά μιτοχόνδρια με φυσιολογική στρόγγυλη εμφάνιση και λειτουργικές λάχνες. Scale bars Και μεγέθυνση αναγράφονται στο πάνω αριστερό μέρος της εικόνας



Εικόνα 6.9: Μελέτη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ώριμων κυττάρων της μυελικής σειράς ασθενούς με ΜΔΣ που παρουσιάζει εμφανή αυτοφαγία, μιτοφαγία και τελικά αυτοφαγικό θάνατο (Autosis) με αφθονία αυτοφαγοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα και συμπύκνωση της περιπυρηνικής μεμβράνης. Μεγάλα επιμηκυμένα παθολογικά μιτοχόνδρια είναι επίσης εμφανή. Ένα από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Scale bars Και μεγέθυνση αναγράφονται στο πάνω αριστερό μέρος της εικόνας. Σημειώνεται ότι οι ασθενείς που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αυτοφαγικού θανάτου στη μυελική σειρά αντιστοιχούν σχεδόν αποκλειστικά στην υπο-ομάδα των υψηλού κινδύνου ΜΔΣ με >5% βλάστες.

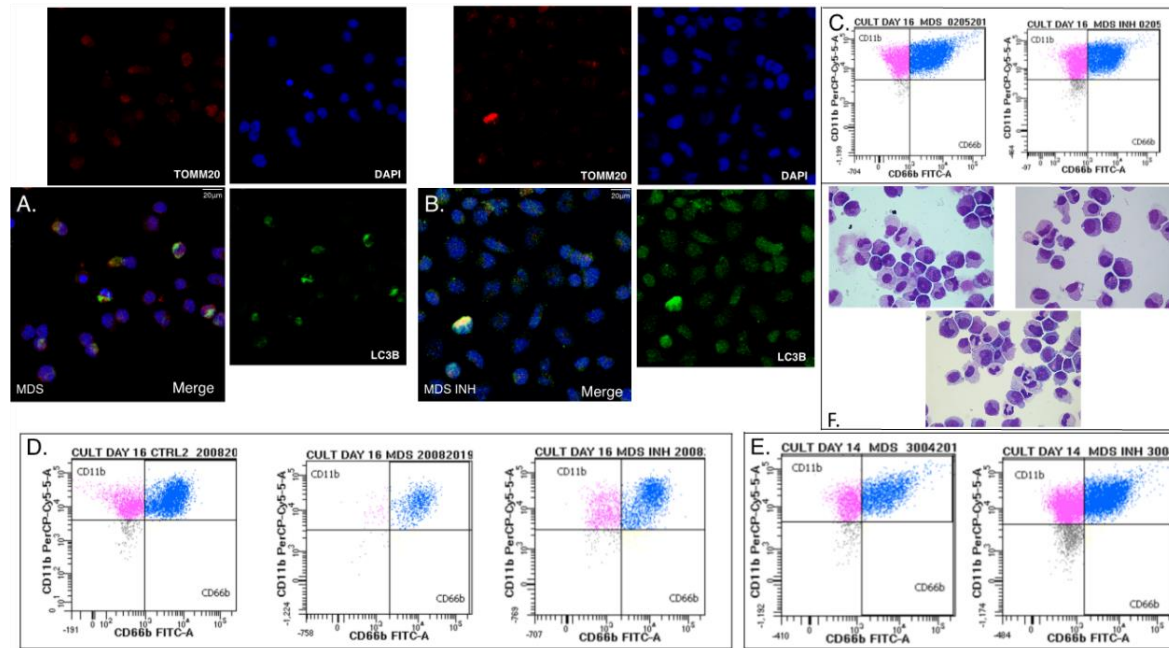
Επομένως η εκσεσημασμένη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας οδηγεί τα διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ σε θάνατο. Ο περιελιγμός και η συρρίκνωση της πυρηνικής μεμβράνης, η εστιακή ρήξη της πυρηνικής επιφάνειας, το εστιακό ballooning του περιπυρηνικού χώρου, τα πολυάριθμα αυτοφαγισώματα και αυτολυσοσώματα, τα οποία μαζί με το διατεταμένο και κατακερματισμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα διογκωμένα, πυκνά μιτοχόνδρια με την παθολογική εσωτερική δομή ουσιαστικά μεταφράζονται σε ένα χαρακτηριστικό τύπο αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου που αποκαλείται autosis (εικόνες 6.7 και 6.9). Τα κλασικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης ήταν ποικιλοτρόπως παρόντα μόνο στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ. Συμπεραίνουμε ότι η αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα γενικά και η μιτοφαγία ειδικά είναι επικρατή χαρακτηριστικά στα διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ. Δείχνουμε ότι τα επίπεδά τους ποικίλουν αρκετά ανάλογα με τη βαρύτητα/κίνδυνο του ΜΔΣ και ότι σχετίζονται άμεσα με το ποσοστό των βλαστών του ΜΟ. Επιπρόσθετα προτείνουμε ότι την autosis ως τον κύριο μηχανισμό που οδηγεί σε μη αποδοτική μυελοποίηση στους πιο επιθετικούς υποτύπους των ΜΔΣ, ενώ ένα μικτό αποπτωτικό αυτοφαγικό πρότυπο αντιστοιχεί καλύτερα στα πιο ήπιας βαρύτητας ΜΔΣ. Υπό το πρίσμα αυτό η σταθεροποίηση του HIF-1 μπορεί να είναι δευτερογενές χαρακτηριστικό στο ψευσο-οξικό ενδοκυττάριο μικροπεριβάλλον μιας σημαντικά διαταραγμένης μιτοχονδριακής λειτουργίας.

6.3.4 Η αναστολή του HIF-1α αυξάνει την ικανότητα για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των CD34+ κυττάρων ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ

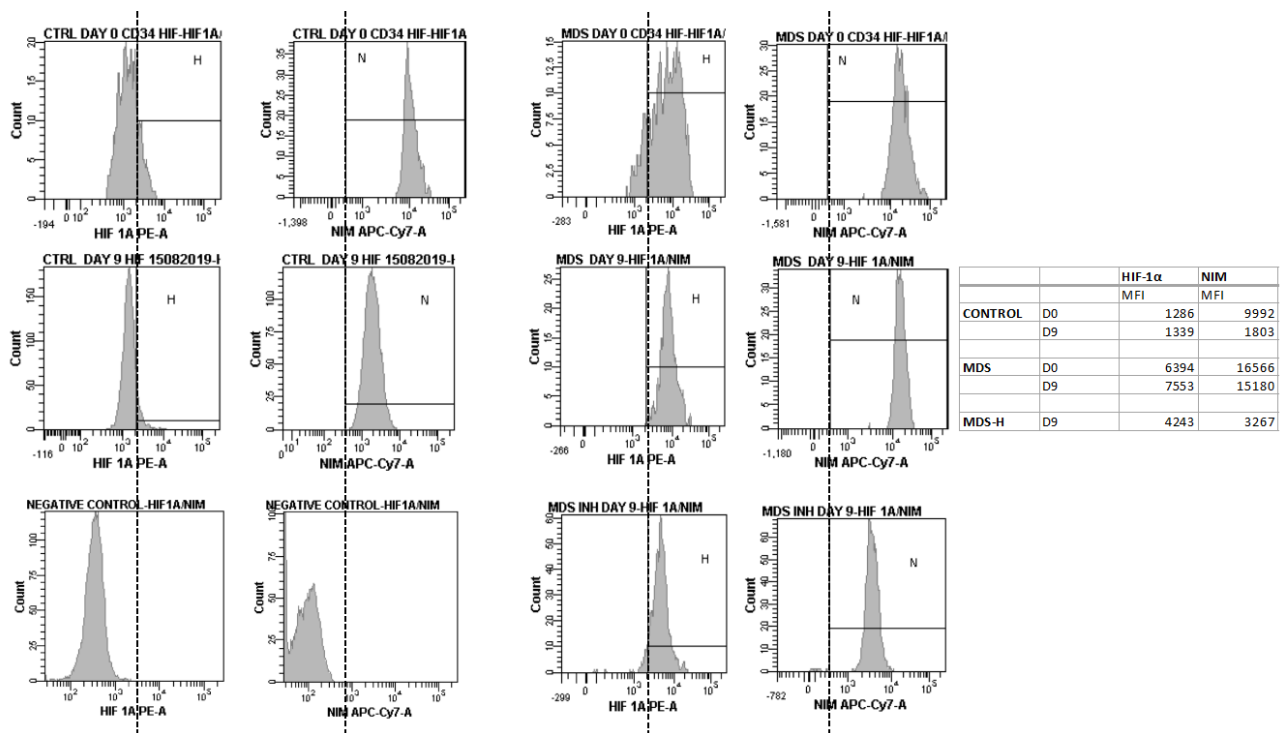
Προκειμένου να μελετήσουμε την αιτιολογική σχέση μεταξύ της ανεξάρτητης από το οξυγόνο δραστηριότητας του HIF-1 και τη σχετιζόμενη με το ΜΔΣ αποτυχία αποδοτικής αιμοποίησης, χρησιμοποιήσαμε ένα λειτουργικό αναστολέα του HIF-1α σε νορμοξικές *in vitro* καλλιέργειες σε CD34+ μυελού ασθενών με ΜΔΣ τα οποία κατευθύνθηκαν προς μυελική διαφοροποίηση. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 6 πειράματα. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι 3 καλλιέργειες CD34+ κυττάρων των ασθενών με ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών1/2 δεν προχώρησαν είτε με είτε χωρίς αναστολή του HIF-1α. Από την άλλη πλευρά, όλες οι καλλιέργειες των CD34+ κυττάρων ασθενών με ΜΔΣ Με <5% βλάστες αντέδρασαν ποικιλοτρόπως στην αναστολή του HIF-1α, συνολικά όμως επωφελήθηκαν από αυτή (εικόνα 6.10). Στην ημέρα 16 (ή 14) της καλλιέργειας, εκτιμήθηκε το στάδιο διαφοροποίησης και η μορφολογία με οπτικό μικροσκόπιο και κυτταρομετρία ροής για τους μυελικούς δείκτες CD11b και CD66b (εικόνες 6.10C, 6.10D, 6.10E). Από τις 3 καλλιέργειες των χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ, μια έδειξε σημαντική βελτίωση στην κυτταροβρίθεια και τη διαφοροποίηση (εικόνα 6.10D, 6.10F), μία μέτρια αύξηση του αριθμού των ώριμων μορφών (εικόνα 6.10E) και μία μόνο ήπια βελτίωση στη διαφοροποίηση (εικόνα 6.10C). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός η αντίδραση της καλλιέργειας στην αναστολή του HIF-1α σχετίστηκε αντιστρόφως με τη συμπεριφορά της καλλιέργειας χωρίς την αναστολή. Η επιτυχής αναστολή του HIF-1α επιβεβαιώθηκε επιπλέον με τα ελαττωμένα επίπεδα REDD1 mRNA, όπως εκτιμήθηκε με qRT-PCR (εικόνα 6.1B). Όπως αναμενόταν, η αναστολή του HIF-1 στις καλλιέργειες των μαρτύρων δε άλλαξε σημαντικά τα επίπεδα REDD1 mRNA, λόγω ανεξάρτητης από τον HIF-1 κυρίως επαγόμενης από το στρες ρύθμιση του REDD1 σε φυσιολογικές καταστάσεις.

Η αναστολή του HIF-1α βελτίωσε επίσης την αυτοφαγική κατάσταση των μυελικών κυττάρων των χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ (εικόνα 6.10A, 6.10B). Ο ανοσοφθορισμός για LC3B και TOMM20 την ημέρα 16 (ή 14) έδειξε ότι τα κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ στα οποία

είχε χορηγηθεί αναστολέας έδειχναν ελαττωμένη αλλά όχι απύσα μιτοφαγία σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που δεν είχαν καλλιεργηθεί με την προσθήκη αναστολές του HIF-1α. Το μιτοχονδριακό περιεχόμενο όπως εκτιμήθηκε οπτικά με τον ανοσοφθορισμό του TOMM20 δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων. Να σημειωθεί ότι η αναστολή του HIF-1α δεν επαρκούσε για τη διάσωση οποιασδήποτε καλλιέργειας είτε των χαμηλού είτε των υψηλού κινδύνου ΜΔΣ από το θάνατο. Βελτιώνει τη μυελοποίηση οδηγώντας σχεδόν σε φυσιολογικοποίηση των καλλιεργιών που ήταν ήδη βιώσιμες χωρίς τον αναστολέα. Προτείνουμε ότι παρότι ο HIF-1α μπορεί να συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στη μη αποδοτική μυελοποίηση που παρατηρείται στα ΜΔΣ, η συμβολή του ποικίλει με τη σοβαρότητα του ΜΔΣ, ενώ η θεραπευτική δυναμική της αναστολής του περιορίζεται σε μια επιλεγμένη ομάδα με καλή πρόγνωση σε ασθενείς με <5% βλάστες ΜΟ. Όντως, στις καλλιέργειες αυτές που επωφελήθηκαν από την αναστολή του HIF-1α, η εκτίμηση με κυτταρομετρία ροής της συσσώρευσης NIM-IDC έδωσε αντίστοιχη κινητική εδραιώνοντας την ψευδοϋποξική φύση της συσσώρευσης της χρωστικής στα ΜΔΣ (εικόνα 6.11).



Εικόνα 6.10: Η επίδραση της αναστολής του HIF-1 σε *in vitro* καλλιέργειες CD34+ κυττάρων MO με κατεύθυνση προς τη μυελική διαφοροποίηση. (A και B) Εκτίμηση της διαφοροποίησης, του μιτοχondριακού περιεχομένου και της αυτοφαγίας με ανοσοφθορισμού για DAPI (μπλε), TOMM20 (κόκκινο) και LC3B (πράσινο), μεγέθυνση 63x/1.4NA. (A) ΜΔΣ (B) ΜΔΣ με αναστολέα του HIF-1, ημέρα 16 της καλλιέργειας. (C) κυτταρομετρία ροής για τους δείκτες διαφοροποίησης CD66b/CD11b και μικροσκόπηση cytopsin καλλιέργειας που αναδεικνύει βελτίωση της διαφοροποίησης σε μια από τις τρεις καλλιέργειες που παρουσιάζονται. (D και E) Κυτταρομετρία ροής για τους δείκτες διαφοροποίησης CD66b/CD11b δύο διαφορετικών πειραμάτων την ημέρα 16 (D) και την ημέρα 14 (E) δείχνει σημαντική ποσοτική και ποιοτική βελτίωση. (F) Μικροσκόπηση cytopsin με χρώση May-Grunwald/Giemsa από καλλιέργεια (D) την ημέρα 16 που δείχνει αριθμητική έκπτωση και βελτίωση της διαφοροποίησης. Μεγέθυνση (x100). Πάνω αριστερά: μάρτυρας, πάνω δεξιά: ΜΔΣ, κάτω και κεντρικά: ΜΔΣ+ αναστολέας. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε CD34+ κύτταρα από ασθενείς με ΜΔΣ με <5% βλάστες μυελού. Ένας αντιπροσωπευτικός μάρτυρας παρουσιάζεται. Για κάθε μια από τις καλλιέργειες των ΜΔΣ πραγματοποιήθηκε μια ή περισσότερες αντίστοιχες καλλιέργειες μαρτύρων. LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, MPO: Myeloperoxidase, TOMM20: Translocase of Outer Mitochondrial Membrane.



Εικόνα 6.11: Έκφραση του HIF-1α και του 2-NIM με κυτταρομετρία ροής σε διαφοροποιούμενα CD34+ μαρτύρων και ασθενών με ΜΔΣ σε in vitro καλλιέργεια υπό νορμοξικές συνθήκες. Τα κύτταρα των μαρτύρων παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση HIF-1α κατά τη διαφοροποίηση, με σχετικά σταθερή MFI του HIF-1α (d0: 1286, d9: 1339). Τα κύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ διατηρούν υψηλότερα επίπεδα MFI του HIF-1α κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης ακόμη και υπό νορμοξικές συνθήκες, με υψηλότερα επίπεδα MFI του HIF-1α σε σύγκριση με τους μάρτυρες και μια τάση αύξησης της MFI του HIF-1α από την ημέρα 0 (d0) στην ημέρα 9 (d9) (d0: 6394, d9: 7553). Η MFI του NIM παρουσιάζει τάση ελάττωσης κατά τη διάρκεια της νορμοξικής καλλιέργειας των CD34+ κυττάρων των μαρτύρων (d0: 9992, d9: 1803), ενώ εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα τα οποία παραμένουν υψηλά κατά τη διάρκεια της νορμοξικής καλλιέργειας των CD34+ κυττάρων ασθενών με ΜΔΣ (d0:16566, d9: 15180). Η αναστολή του HIF-1α στα CD34+ κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ ελαττώνει τα επίπεδα της έκφρασης του NIM τη ημέρα 9 (NIM MFI 3267 έναντι 15180 χωρίς αναστολή). Λόγω του αυτοφθορισμού του NIM-IDC, διαφορετικά δείγματα από κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του ανοσοφθορισμού του HIF-1α και του NIM-IDC κάθε μέρα

6.4 Συζήτηση

Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην σταθεροποίηση του HIF-1 στο ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ δεν έχουν ουσιαστικά διερευνηθεί. Η υπομονάδα α, ανιχνευτής του οξυγόνου, του ετεροδιμερούς βρέθηκε συνολικά αυξημένη στη μυελική σειρά του ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ τη παρά την επαρκή παροχή οξυγόνου. Δεδομένου ότι ακόμη και η καλλιέργεια των CD34+ κυττάρων του ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ σε 21% FiO₂, παροχή οξυγόνου αρκετά υψηλότερη από αυτή του ΜΟ τόσο των μαρτύρων όσο και των ασθενών με ΜΔΣ, δεν επαρκούσε για την αποδόμηση του HIF-1α, στηρίζουμε ισχυρά την ύπαρξη ενός μη κανονικού μονοπατιού ενδοκυττάριας δυσλειτουργίας που οδηγεί σε μια αυξημένη δράση του HIF-1, γεγονός το οποίο αποτελεί θέμα της συζήτησης σχετικά με τις θεωρίες μας ως μελλοντικών πειραματικών και κατ' επέκταση θεραπευτικών στόχων.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν υπάρχει ένδεια O₂, η «αναερόβια αναπνοή» έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση περίσσειας ελεύθερων ηλεκτρονίων, την αναγωγή του

NIM και την ενδοκυττάρια κατακράτησή του, καθιστώντας το έναν δείκτη ανεπαρκούς παροχής O₂ [412]. Μια διαταραγμένη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μπορεί να οδηγεί επίσης σε απελευθέρωση περίσσειας ελεύθερων ηλεκτρονίων και να έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του NIM και την επακόλουθη ενδοκυττάρια παραμονή του, παράγοντας το φαινόμενο της ψευδοϋποξίας [409]. Η ακόλουθη ενδοκυττάρια παραμονή απαιτεί δέσμευση του αναχθέντος μορίου στη γλουταθειόνη (GSH) και την επακόλουθη οξειδωση της GSH σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) [413]. Η εξάλειψη της GSH θεωρείται υπεύθυνη για την επίδραση του NIM έναντι αρκετών συμπαγών όγκων [414]. Στην περίπτωση μας αύξηση του NIM-IDC παρατηρείται με την αύξηση της βαρύτητας του ΜΔΣ και η συσσώρευση τουλάχιστον μορφολογικά δεν παρατηρείται στα βλαστικά κύτταρα. Επιπλέον, η απουσία συσσώρευσης NIM-IDC σε οστεομυελικές βιοψίες μαρτύρων, η οποίες συλλέχθηκαν στις ίδιες συνθήκες με εκείνες των ασθενών με ΜΔΣ, υποδηλώνει μια ανεξάρτητη από το οξυγόνο παθολογία. Δεδομένου ότι η θεωρία των υποξικών αιμοποιητικών φωλιών έχει αποδειχθεί να είναι μάλλον απαρχαιωμένη και ότι τόσο τα CD34+ HSCs όσο και τα διαφοροποιούμενα κύτταρα της μυελικής σειράς εντοπίζονται σε αντίστοιχες συνθήκες παροχής οξυγόνου [158,163,204], μπορούμε με ασφάλεια να υποθέσουμε ότι η διαφορετική ενσωμάτωση του NIM-IDC στο ΜΟ τόσο των μαρτύρων όσο και των ασθενών με ΜΔΣ βασίζεται σε ενδογενείς για το κάθε κύτταρο συνθήκες. Παρατηρήσαμε επίσης ότι η αυξημένη συνεντόπιση DAPI/NIM-IDC σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό βλαστών του ΜΟ. Οι περιοχές συνεντόπισης είναι μορφολογικά συμβατές με αποπτωτικούς πυρήνες και δεδομένου ότι η απόπτωση είναι ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας των ΜΔΣ [415], παρά το ότι δε διαθέτουμε επαρκή πειραματικά δεδομένα, προτείνουμε ότι οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν όντως σε αποπτωτικά κύτταρα. Αναμφίβολα, η υπόθεσή μας χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να αποδειχθεί ή να απορριφθεί. Είναι πιθανό ότι ο κατακερματισμός της πυρηνικής μεμβράνης κατά την αποπτωτική διαδικασία επιτρέπει στο NIM-IDC που έχει κατακρατηθεί να εισέλθει στον πυρήνα (εικόνα 6.3). Σε συμφωνία με την υπόθεση αυτή, η ομάδα μας έχει αποδείξει, όπως αναλύεται στο κεφάλαιο 7, την εξάρτηση των διαφοροποιούμενων κυττάρων των υψηλού κινδύνου ΜΔΣ στην αναχθείσα GSH για την επιβίωση και την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση [416]. Το NIM-IDC είναι γνωστό ότι κατακρατάται ενδοκυτταρίως μέσω δέσμευσης με την GSH, επάγοντας έτσι την εξάλειψή της [412,417]. Δεδομένου ότι η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, συγκεκριμένα ο αυξημένος λόγος GSH/GSSG, είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των μυελικών κυττάρων των ΜΔΣ, ειδικά των υψηλού κινδύνου, προτείνουμε ότι οι περιοχές συνεντόπισης DAPI/NIM-IDC αντιστοιχούν σε αποπτωτικούς πυρήνες κυττάρων που έχουν ανεπάρκεια GSH. Υπό αυτές τις συνθήκες, η εσωτερικευμένη χρώση εισέρχεται στον πυρήνα κατά τον κατακερματισμό της αποπτωτικής πυρηνικής μεμβράνης και ανιχνεύεται ως συνεντόπιση DAPI/NIM-IDC. Στην περίπτωση αυτή ο διορθωμένος normalized ανοσοφθορισμός του NIM-IDC υποεκτιμά σαφώς τον αληθινό φθορισμό του NIM-IDC. Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν άλλοι δείκτες ανοσοφθορισμού για να τεκμηριώσουμε τη θεωρία μας δεδομένων των ιδιοτήτων αυτόφθορισμού της χρησιμοποιούμενης χρώσης.

Ενώ τόσο η παθολογική σταθεροποίηση του HIF-1α όσο και η συσσώρευση του NIM-IDC έρχονται σε συμφωνία με τη θεωρία της ψευδοϋποξίας, το αν αυτή η κατάσταση οφείλεται σε μια πρωτογενή σταθεροποίηση του HIF-1α ή αν η σταθεροποίηση αυτή είναι ένα επιφανόμενο άγνωστης αιτιολογίας είναι ακόμη υπό συζήτηση. Με άλλα λόγια, είναι η εκσεσημασμένη μιτοφαγία λόγω ενεργοποίησης του HIF-1 μέσω ενός μονοπατιού που δεν

έχει διευκρινισθεί το πρωτογενές γεγονός ή οφείλεται σε ενδογενείς διαταραχές της μιτοχονδριακής αναπνοής για παράδειγμα, οδηγώντας σε σταθεροποίηση του HIF-1 και εγκαθιστώντας μια ψευδοϋποξική κατάσταση; Η απάντηση βρίσκεται στην ίδια τη μιτοχονδριακή μορφολογία. Η μορφολογία των μιτοχονδρίων αντανακλά σε μεγάλο βαθμό τη μιτοχονδριακή λειτουργία και κινητική [418]. Η σχάση και η σύντηξη ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή μάζα επιτρέποντας την αυτοφαγική αποδόμηση μικρότερων οργανιδίων με ελαττωματικά συμπλέγματα, ενώ τα μεγάλα επιμηκυσμένα μιτοχόνδρια διασώζονται από την αποδόμηση ακόμη και μετά από την ενσωμάτωσή του σε αυτοφαγοσώματα μέσω αναστολής της σύντηξης του λυσοσώματος με το φαγόσωμα [359,419]. Επιπλέον, η κινητική των μιτοχονδρίων επιτρέπει τη βελτιστοποίηση του ETC των οργανιδίων που επιβιώνουν ανανεώνοντας τα συμπλέγματά τους. Η μιτοφαγία, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των πειραμάτων μας, ρυθμίζει περαιτέρω την ποιότητα της ενδοκυττάριας αναπνοής [420]. Η σημαντικά διαταραγμένη μιτοχονδριακή μορφολογία που παρατηρήσαμε στη μυελική σειρά των ΜΔΣ EB1/2 υποδηλώνει έναν δευτερογενή υποξικό φαινότυπο που προκαλείται από μια διαταραγμένη αναπνοή και τη δευτεροπαθή σταθεροποίηση του HIF-1. Στην πραγματικότητα η επιμήκυνση των οργανιδίων στα κύτταρα αυτά θεωρείται ένα αντιροπιστικό φαινόμενο (εικόνα 6.7). Η ομάδα μας έχει αποδείξει, όπως αναλύεται στο Κεφάλαιο 7, τη διαταραγμένη μιτοχονδριακή λειτουργία τόσο στα ΜΔΣ με χαμηλό ποσοστά βλαστών όσο και στα ΜΔΣ με υψηλά ποσοστά βλαστών μέσω ενός διαταραγμένου μεταβολισμού [416]. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτή έρχονται να επιβεβαιώσουν τα δεδομένα με τα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ να παρουσιάζουν σημαντική αποδόμηση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων τους οδηγώντας δε ψευδοϋποξία και σταθεροποίηση του HIF-1 ενώ καθώς η νόσος προχωρά γενετική ή επιγενετική πίεση οδηγεί σε αντιροπιστικές αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία και στην κινητική που παραμένοντας ελαττωματικές προκαλούν σταθεροποίηση του HIF-1 αλλά διασώζονται επίσης από την αποδόμηση. Οι καλλιέργειες που πραγματοποιήσαμε τεκμηριώνουν τη θέση αυτή (εικόνες 6.10 και 6.11).

Η σηματοδότηση του HIF-1 επάγει την αυτοφαγία είτε μέσω του εξαρτώμενου από τον mTOR άξονα HIF-1/REDD1, είτε μέσω του μη εξαρτώμενου από τον mTOR άξονα BNIP3-Beclin-Bcl2 [350,421]. Η αυτοφαγία έχει πολλαπλούς ρόλους στην τύχη και τη διαφοροποίηση των HSPC [422]. Η μιτοφαγία ελαττώνει τη μιτοχονδριακή μάζα και την επακόλουθη παραγωγή ROS, προστατεύοντας τα HSCs από τη βλάβη του DNA και εξασφαλίζοντας την ηρεμία τους [407]. Επιπλέον κατά την τελική διαφοροποίηση των ουδετερόφιλων, η αυτοφαγία παρέχει ενέργεια μέσω της οξειδωσης των λιπαρών οξέων μέσω αποδόμησης των σταγονιδίων λίπους [396]. Είναι επομένως σημαντικό για τον HIF-1 να αποδομηθεί προκειμένου να επιτευχθεί η διαφοροποίηση, γεγονός το οποίο εξηγεί τη βελτίωση στην κινητική και τη μορφολογία των καλλιεργείων που επωφελήθηκαν από την αναστολή του HIF-1 και τεκμηριώνει την υπόθεσή μας ότι η παθολογική του δραστηριότητα είναι δευτεροπαθής σε μια ευρύτερη διαταραχή.

Αντίστροφα, η διαμεσολαβούμενη από τον HIF-1 παθολογική έκπτυξη της αυτοφαγίας οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω κατανάλωσης της διπλοστιβάδας λιπιδίων όλου του ενδοπλασματικού δικτύου κατά τη διαδικασία της δημιουργίας του αυτοφαγοσώματος διπλής μεμβράνης [198,369]. Ένας νέος τύπος μη αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου που ρυθμίζεται από μια ΑΤΡαση Na⁺/K⁺ και ονομάζεται "autosis" έχει πρόσφατα εντοπισθεί, ο οποίος μεταξύ άλλων ερεθισμάτων μπορεί να επαχθεί από την υποξική σηματοδότηση [369]. Η μελέτη μας έδειξε αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα στα μυελικά κύτταρα

των ασθενών με ΜΔΣ, ειδικά όσον αφορά στα μιτοχόνδρια (εικόνες). Η μελέτη στο ηλεκτρονικό μιτοχόνδριο ανέδειξε μορφολογικά κριτήρια συμβατά με autosis, ισχυρά υποδηλωτικά του κυρίαρχου ρόλου αυτού του φαινομένου στις σχετιζόμενες με το ΜΔΣ κυτταροπενίες, ειδικά στην υποομάδα των ΜΔΣ με υψηλό ποσοστό βλαστών (εικόνες 6.7 και 6.9), ενώ ο θάνατος στην υποομάδα των ΜΔΣ με χαμηλό ποσοστό βλαστών ήταν κυρίως αποπτωτικός συμβατός με στέρηση ενέργειας. Μετά τη σταθεροποίηση του HIF-1 η μιτοφαγία προκύπτει, δεσμεύοντας τα διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα σε αυτόν τον κύκλο θανάτου είτε μέσω μη αντιρροπούμενης αυτοφαγίας και αυτοφαγικού θανάτου είτε μέσω απόπτωσης λόγω ένδειας ενέργειας και οξειδοαναγωγικής ισορροπίας.

Καθώς τα νεότερα δεδομένα στο πεδίο έρευνας των ΜΔΣ περιστρέφονται ενεργά γύρω από τον HIF-1 και έχουν καταφέρει να αποδώσουν τη συμβολή του ή ακόμα και την αναγκαιότητά του για την εδραίωση των φαινομένων δυσαιμοποίησης [198], ένα μοντέλο που να αφορά σε ανθρώπους δεν έχει μελετηθεί ακόμη μαζί με τη θεραπευτική του δυναμική. Τα *in vitro* πειράματά μας όντως επισημαίνουν ότι μπορεί ο HIF-1 να έχει ένα ρόλο που επιτρέπει τη δυσαιμοποίηση και συγκεκριμένα τη δυσμυελοποίηση, η αναστολή του σίγουρα δεν επαρκεί να διασώσει όλα τα CD34+ HSCs των καλλιέργειών που διαφοροποιήθηκαν προς μυελική σειρά (εικόνα 6.10). Όλες οι καλλιέργειες των ασθενών με ΜΔΣ EB1/2 απέτυχαν αρχικά να εκπτυχθούν, υπογραμμίζοντας την εξάρτηση αυτών των CD34+ από το μικροπεριβάλλον του μυελού και επιβεβαιώνοντας τη φύση της σταθεροποίησης του HIF-1 ως επιφαινομένου. Τα αποτελέσματα στις καλλιέργειες των χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ ήταν γενικά πιο ποικίλα και αισιόδοξα, αναδεικνύοντας έναν πιθανό θεραπευτικό ρόλο της αναστολής του HIF-1 για τη σχετιζόμενη με τα ΜΔΣ ουδετεροπενία.

6.5 Συμπεράσματα

Στη μελέτη αυτή ελέγχουμε πειραματικά την υπόθεση μιας παθολογικής, μη κανονικής, ανεξάρτητης από το οξυγόνο δραστηριότητας του HIF-1 ως ένα βασικό χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας των ΜΔΣ, παράλληλα με την πιθανότητα της θεραπευτικής του στόχευσης. Συμπεραίνουμε ότι παρότι ο HIF-1α εκφράζεται παθολογικά και ρυθμίζεται μη κανονικά σε όλα τα ΜΔΣ ανεξάρτητα από το ποσοστό βλαστών του ΜΟ, τουλάχιστον όσον αφορά στη μυελική σειρά η έκφρασή του είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα μιας γενικότερης διαταραχής των HSCs με ποικίλη συμμετοχή στην εδραίωση της νόσου και την εξέλιξή της. Η θεραπευτική του στόχευση είναι πιθανότητα περιορισμένης δυναμικής και περιορίζεται κυρίως στα ΜΔΣ με χαμηλά ποσοστά βλαστών/ Συνολικά, η εργασία προτείνει ότι ο ΜΟ των ασθενών με ΜΔΣ αποτελεί μια ολιστικά διαταραγμένη φωλιά παθολογικών CD34+ HSCs τα οποία ξεκινούν να διαφοροποιούνται ενώ περιβάλλονται από ένα δυσλειτουργικό μικροπεριβάλλον που τελικά καθορίζει τον πρόωρο θάνατό τους ή την κακοήθη εκτροπή τους. Δείχνουμε ότι η ψευδοϋπόξια οφείλεται πιθανότατα στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και είναι εμφανής σε όλους του υπότυπους των ΜΔΣ, επάγει μια δευτερογενή σταθεροποίηση του HIF-1α και ακολούθως οδηγεί σε συσσώρευση του NIM-IDC.

Κεφάλαιο 7: Το βιοενεργητικό προφίλ των διαφοροποιούμενων κυττάρων της μυελικής σειράς μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων με χαμηλά και υψηλά ποσοστά βλαστών

7.1 Εισαγωγή

Κάθε άποψη της κύκλου ζωής του κυττάρου από την ηρεμία στην τελική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο ως τη νεοπλασματική μετατροπή καθορίζεται από μια συνεχή αλληλεπίδραση μεταξύ του γονιδιώματος και του μεταβολόματος [250,423]. Οι πρωτεΐνες διαμεσολαβούν αυτού του είδους τις αλληλεπιδράσεις διευκολύνοντας της μεταβολικές αντιδράσεις, ενώ ρυθμίζονται και ταυτόχρονα ρυθμίζουν τις μεταγραφικές και τις μεταβολικές διαδικασίες. Η ακετυλίωση [424], η εξαρτώμενες από NAD αποακετυλάσες, οι σιρτουίνες [425], ο ογκομεταβολίτης 2-υδροξυγλουταρικό (2HG) [426], το οποίο είναι γνωστό για την ανασταλτική του επίδραση τις διοξυγενάσες, και ο δότης μεθυλομάδων S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM) [382], αποτελούν μόνο μερικές από τις πολλαπλές διασυνδέσεις που υπάρχουν μεταξύ του μεταβολισμού και τις έκφρασης των γονιδίων [250,427]. Τροποποιώντας τους επιγενετικούς ρυθμιστές, τα νεοπλασματικά κύτταρα προσαρμόζονται γρήγορα στο μεταβλητό μικροπεριβάλλον τους και η προσαρμογή τους μεταφράζεται σε μεταστατικό δυναμικό [423,428].

Στη de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία (OML), οι διαταραχές των σχετιζόμενων με τη μεταγραφή γονιδίων προκαλούν απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και οδηγούν σε λευχαιμική μετατροπή [429]. Ωστόσο όταν η OML αναπτύσσεται επί εδάφους μυελοδυσπλασίας, δεν ανιχνεύονται ειδικές μεταλλάξεις [430]. Επιπρόσθετα, η νόσος έχει πολύ χειρότερη πρόγνωση και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία [431]. Μελετήσαμε επομένως την αλληλουχία γεγονότων που μετατρέπουν τα υγιή αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα σε κύτταρα που παρουσιάζονται αρχικά δυσπλαστικά και τελικά βλαστικά. Η παθολογική έκφραση του HIF-1 σε όλα τα διαφοροποιούμενα κύτταρα της μυελικής σειράς, ακόμη και στα ραβδοκύτταρα και ουδετερόφιλα, όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 6, υποδηλώνει ότι ο μεταβολισμός μπορεί όντως να παίζει ένα βασικό ρόλο στα ΜΔΣ και στην παθογένεια της σχετιζόμενης με ΜΔΣ OML. Ο επαγόμενος από τον HIF-1 μεταβολικός επαναπρογραμματισμός αποτελεί ένα λεπτά ρυθμιζόμενο δίκτυο εξωμιτοχονδριακού καταβολισμού της γλυκόζης, παρά την επαρκή παροχή οξυγόνου (φαινόμενο Warburg), συζευγμένου με μια επαρκή μιτοχονδριακή λειτουργία για να επανεισάγει την οξειδοαναγωγική ισορροπία [225]. Η μιτοχονδριακή λειτουργία μπορεί να διαχωρισθεί σε δύο κύριες και στενά διασυνδεδεμένες σύνθετες βιοχημικές διεργασίες: τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) και τη συνοδό οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS). Ο TCA κύκλος περιλαμβάνει την οξείδωση του ακετυλ-συνενζύμου Α (acetyl-CoA), που οδηγεί στην παραγωγή αρκετών ενδιάμεσων (αναβολικές αντιδράσεις), μαζί με τα κύρια αναγωγικά ισοδύναμα NADH και FADH₂, Με τα δύο να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων κατά την OXPHOS [432,433]. Η OXPHOS είναι η διαδικασία κατά την οποία παράγεται το ATP ως αποτέλεσμα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ στο O₂ μέσω μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων, που είναι επίσης γνωστοί ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport chain ETC).

Καταλήξαμε στο ενδιαφέρον συμπέρασμα ότι στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ, διαπιστώνεται μεταβολική απορρύθμιση και πιθανά επηρεάζει τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων [434]. Ο επακόλουθος θάνατος περιγράφεται ως μη αποδοτική ερυθροποίηση του ΜΔΣ. Το συνεχές μεταβολικό στρες καθορίζει εν τέλει την κυτταρική ζωή, προσαρμόζοντάς τη σε ένα νέο περιβάλλον με ένα μοναδικό μοντέλο φυσικής επιλογής. Πολλά κύτταρα πεθαίνουν κατά τη διαδικασία, αλλά αυτά που επιβιώνουν μετατρέπονται σε λευχαιμικούς βλάστες και εδραιώνουν ένα προφίλ ΜΔΣ με υψηλά ποσοστά βλαστών. Οι βλάστες που προκύπτουν από μια τόσο εντατική διαδικασία διαθέτουν εντυπωσιακές ικανότητες προσαρμογής που αντανακλώνται σε μεγάλο βαθμό στην ανθεκτική στη χημειοθεραπεία φύση της σχετιζόμενης με ΜΔΣ ΟΜΛ.

Στη μελέτη αυτή παρουσιάζουμε τη θεωρία που αναλύθηκε πιο πάνω μέσω μεταβολομικής ανάλυσης διαφοροποιούμενων κυττάρων της μυελικής σειράς από δείγματα αναρρόφησης ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ. Τα διαφοροποιούμενα κύτταρα της μυελικής σειράς που απομονώθηκαν από αναρρόφηση ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με <5% βλάστες (ομάδα 1, group 1, G1) συγκρίθηκαν με αντίστοιχα δείγματα που απομονώθηκαν από ασθενής με ΜΔΣ με ≥5% βλάστες (ομάδα 2, group 2, G2). Τα G1 και G2 συγκρίθηκαν επίσης με διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα από αναρρόφηση μυελού των οστών μαρτύρων.

7.2 Υλικά και μέθοδοι

7.2.1 Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία

Απομονωμένα κύτταρα μυελικής σειράς ΜΟ (στιβάδα υψηλής πυκνότητας) από ασθενείς με ΜΔΣ με <5% βλάστες (n=10; 1 ΜΔΣ-SLD, 8 ΜΔΣ-MLD, 1ΜΔΣ-dep5q – Ομάδα 1 (G1)) και ≥5% βλάστες ΜΟ (n=4; 2 ΜΔΣ-EB1, 2 ΜΔΣ-EB2 – Ομάδα 2 (G2) και αντίστοιχης ηλικίας μάρτυρες (n=5) υπεβλήθησαν σε μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση κυτταρομετρίας μάζας.

Εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα εκχύλισης μεταβολιτών (1^η εκχύλιση: 50% MeOH, 30% ACN, 20% H₂O; 2^ο εκχύλιση: 40% MeOH, 40% EtOH, 20% H₂O) . Η διαδικασία της πρώτης εκχύλισης επιλέχθηκε για το καλύτερο εύρος μεταβολιτών. Συνολικά 50μl των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση μεταβολιτών με την προσθήκη 750μl ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης και την ανακίνηση του μίγματος στους 4°C για 15min. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 14.000g για 10min και τα υπερεκείμενα συλλέχθηκαν για LC-MS/MS ανάλυση με τη χρήση του συστήματος UPLC 1290 (Aligent Technologies, Santa Clara, CA, USA) συζευγμένου με φασματομέτρο μάζας Triple TOF5600+ (SCIEF) εξοπλισμένου με τεχνολογία ανάκτησης SWATH, τεχνολογία SelexION και πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization source -ESI). Τόσο τα δείγματα της ομάδας G1 όσο και της G2, καθώς και των μαρτύρων μελετήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο για την εξασφάλιση αντίστοιχης εκπροσώπησης των σταδίων διαφοροποίησης της μυελικής σειράς σε όλα τα δείγματα. Προκειμένου να αποκλεισθεί η πιθανότητα μιας τεχνητής διαταραχής του μεταβολόματος της μυελικής σειράς λόγω επιμόλυνσης της υψηλής πυκνότητας στιβάδας των δειγμάτων της ομάδας G2 από βλαστικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο ελέγχου απομόνωσης σε στιβάδα διπλής φικόλλης σε δείγμα αναρρόφησης μυελού από έναν ασθενή με ΜΔΣ-EB2 και εκτιμήθηκε η απομονωμένη στιβάδα, συγκεκριμένα η μυελική στιβάδα, με κυτταρομετρία ροής, μετά από χρώση για κατάλληλα αντιγόνα. Η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό FlowJo. Η καθαρότητα >95% σε ώριμα μυελικά

κύτταρα με <0,1% επιμόλυνση από CD34+ βλαστικά κύτταρα τεκμηριώθηκε με μελέτη κυτταρομετρίας ροής.

7.2.2. Χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός UPLC πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα μεταβολιτών με τη χρήση στήλης pZIC-HILIC (5µm, 2.1mm x 150mm) με λειτουργία στο 45°C εγχέοντας απευθείας 10µl των δειγμάτων. Ο ρυθμός ροής ήταν 0.2ml/min με μια κινητή φάση A (acetonitrile) και μια κινητή φάση B (ammonium carbonate 20mM + 0,1% ammonium hydroxide). Η βαθμίδωση, τόσο στο θετικό όσο και στο αρνητικό τρόπο, ήταν από 20% σε 80% σε 15min.

7.2.3 Φασματομετρία μάζας

Το σύστημα Triple TOF 5600+ χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή των δεδομένων, σε ένα εύρος μάζας 75-1000 m/z. Πραγματοποιήθηκε αυτοματοποιημένη βαθμονόμηση με τη χρήση ενός εξωτερικού συστήματος παροχής βαθμονόμησης (calibrant delivery system - CDS), το οποίο εγχύει θετικό ή αρνητικό διάλυμα βαθμονόμησης κάθε 5 δείγματα. Για την παρακολούθηση της απόδοσης του οργάνου κατά τη διάρκεια του χρόνου, δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν ως ένα μίγμα κάθε δείγματος και αναλύθηκαν κάθε 5 δείγματα. Ένα πείραμα TOF MS survey scan με IDA set για την παρακολούθηση των οκτώ πιο έντονων υποψηφίων ιόντων πραγματοποιήθηκε (χρόνος συσσώρευσης 150msec σε TOF-MS και 50msec στο πείραμα IDA), με ενέργεια πρόσκρουσης 35eV και εύρος ενέργειας πρόσκρουσης 10eV, δυναμικό declustering 80V, θερμοκρασία πηγής 500°C και IonSpray Voltage Floating 500V (θετική πολικότητα) ή 4500V (αρνητική πολικότητα) σε τρόπο υψηλής πυκνότητας.

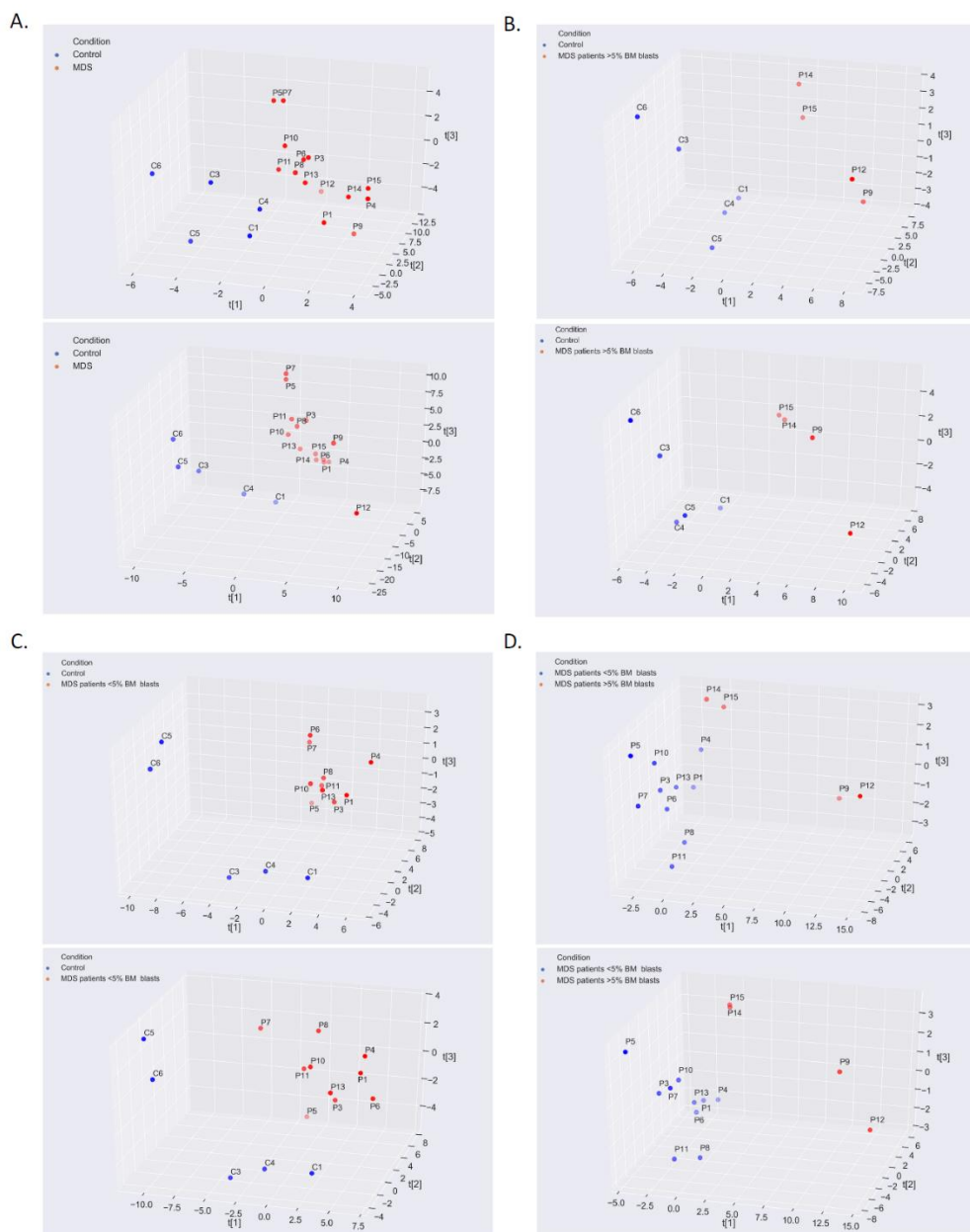
7.2.4 Επεξεργασία δεδομένων

Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του MetaboKit (20). Τα δεδομένα των ασθενών χωρίστηκαν σε δύο κοορτές, με βάση τη σοβαρότητα του ΜΔΣ (G1, n=10 και G2, n=4). Όλες οι ομάδες συγκρίθηκαν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα συνολικά 3 αναλύσεις: μάρτυρες έναντι G1, μάρτυρες έναντι G2 και G1 έναντι G2. Οι συγκρίσεις αυτές σχεδιάστηκαν αρχικά για να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μεταβόλομα των ΜΔΣ σε διαφορετικά στάδια νόσου και ακολούθως για να ανιχνεύσουν μεταβολίτες κλειδιά που διαφοροποιούν τη G1 από τη G2.

Η επεξεργασία των δεδομένων και η ανάλυση για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε μετά την εφαρμογή μεθόδου τόσο θετικών όσο και αρνητικών ιόντων κατά την φασματομετρία μάζας υγρής χρωματογραφίας. Οι μεταβολίτες που ήταν παρόντες σε πάνω από το 33% των δειγμάτων συμπεριλήφθηκαν στις αναλύσεις. Μετά την αφαίρεση μη πληροφοριακών χαρακτηριστικών, ο αριθμός των μεταβολιτών που προέκυπτε ελαττώθηκε δραστικά στο -1/4. Για τους μεταβολίτες αυτούς που επιβίωναν των κριτηρίων, κενές τιμές υποσημειώθηκαν με μια μικρή τιμή (1). Πραγματοποιήθηκε συγκέντρωση των δεδομένων και κλιμάκωση μονάδων διακύμανσης. Ο υπολογισμός Log2fold και οι αναλύσεις PCA και PLS πραγματοποιήθηκαν για κάθε συγκριτική ανάλυση (μέθοδοι τόσο αρνητικών όσο και θετικών ιόντων). Προσδιορίστηκαν οι τιμές PLS VIP (variable importance in projection). Μόνο οι μεταβολίτες με Log2fold ≥ 2 επιλέχθηκαν για ακόλουθη ανάλυση εμπλουτισμού. Η ανάλυση εμπλουτισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Metaboanalyst v4 (50), εφαρμόζοντας συνδυασμούς μεταβολιτών σχετιζόμενων με μονοπάτια (SMPDB).

7.3 Αποτελέσματα

Η βιοενεργητική κατάσταση των απομονωμένων κυττάρων της μυελικής σειράς ΜΟ από ασθενείς με ΜΔΣ με <5% [n=10; 1 ΜΔΣ-SLD, 8 ΜΔΣ-MLD, 1 ΜΔΣ-del5q (G1)] και με ≥5% βλάστες (n=4; 2 ΜΔΣ-EB1, 2 ΜΔΣ-EB2 (G2)] συγκρίθηκαν με μάρτυρες (n=5), όπως και μεταξύ τους. Οι τύποι του μεταβολισμού στα ΜΔΣ υποδηλώνουν διακριτές ομάδες για τους ασθενείς (ΜΔΣ με υψηλά και χαμηλά ποσοστά βλαστών) και τους μάρτυρες, τεκμηριώνοντας την επάρκεια και τη φυσιολογικότητα της διαδικασίας επιλογής δειγμάτων (εικόνα 7.1)



Εικόνα 7.1: Οι μεταβολότυποι των ΜΔΣ αναδεικνύουν διακριτές ομάδες για του ασθενείς με ΜΔΣ (με υψηλά και χαμηλά ποσοστά βλαστών) και τους μάρτυρες χωρίς ΜΔΣ. Πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί με log2fold και ανάλυση partial least squares (PLS) για το μεταβόλωμα των ΜΔΣ έναντι των μαρτύρων (Α), το μεταβόλωμα της ομάδας G2 έναντι των μαρτύρων (Β), το μεταβόλωμα της

ομάδας G1 έναντι των μαρτύρων (C), το μεταβόλομα της ομάδας G1 έναντι της G2 (D). Τα πάνω τμήματα αντιστοιχούν σε δεδομένα τύπου αρνητικών ιόντων, ενώ τα κατώτερα σε θετικών ιόντων. G1: διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα απομονωμένα από αναρρόφημα ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με βλαστικά κύτταρα <5% G2: διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα απομονωμένα από αναρρόφημα ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με βλαστικά κύτταρα ≥5%

7.3.1 Το φαινόμενο Warburg και τα παράπλευρα μονοπάτια του στο μεταβόλομα των ΜΔΣ

Δεδομένης της παθολογικής δράσης του HIF-1 στα ΜΔΣ, το φαινόμενο Warburg, το οποίο περιγράφει την πλήρως αναερόβια οξειδωση του σκελετού άνθρακα της γλυκόζης, παρά την επαρκή παροχή οξυγόνου [225], διαπιστώνεται και στις δύο ομάδες των ΜΔΣ (G1 και G2). Συγκρίνοντας το μεταβόλομα των μαρτύρων με τα ΜΔΣ η Glucose-6-Phosphate (άνω κομμάτι της γλυκόλυσης) βρέθηκε σημαντικά αυξημένη (εικόνα 7.2A), ενώ η Glycerol-3-Phosphate είναι επίσης αυξημένη στα ΜΔΣ με <5% βλάστες έναντι των κυττάρων των μαρτύρων. Ωστόσο, καθώς τα διαφοροποιούμενα κύτταρα των ΜΔΣ διενεργούν γλυκόλυση Warburg, δεν καταφέραμε να τεκμηριώσουμε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων G1 και G2 όσον αφορά μεταβολίτες κλειδιά του φαινομένου Warburg. Επιπλέον το μέγιστο παράπλευρο μονοπάτι της γλυκόλυσης – το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης (Pentose Phosphate Pathway -PPP) [225,435] ήταν σημαντικά αυξημένο στην ομάδα των ΜΔΣ, όπως φαίνεται από την αύξηση των μεταβολιτών του PPP (6-phosphogluconic, Gluconic acid), inosine monophosphate (IMP) και των νουκλεοτιδίων της πυριμιδίνης, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (εικόνα 7.2A). Ο κύκλος μεταφοράς ενός άνθρακα (One Carbon Transfer -1C), αποτελώντας ένα ακόμη παράπλευρο μονοπάτι του αρχικού μέρους της γλυκόλυσης [435], ήταν επίσης σημαντικά αυξημένο στο μεταβόλομα των ΜΔΣ; συγκεκριμένα ξεχωρίζουν το SAM, η S-αδενοσυλ ομοκυστεΐνη (S-adenosyl homocysteine -SAH), η μεθειονίνη, η γλυκίνη, η διφωσφορική κυτιδίνη (Cytidine DiPhosphate- CDP)-χολίνη και ο μεταβολισμός της ιστιδίνης (εικόνα 7.2D). Προερχόμενο από το αρχικό κομμάτι της γλυκόλυσης, το μονοπάτι της de novo σύνθεσης φωσφολιπιδίων (cytidine 2',3'-cyclic monophosphoric acid (CMP), CDP-χολίνη) βρέθηκαν απορρυθμισμένα στα ΜΔΣ, ειδικά στη G2 ομάδα (εικόνας 7.2B και 7.3).

Λόγοι	G1 έναντι μαρτύρων	G2 έναντι μαρτύρων	G1 έναντι G2
NAD ⁺ /NADH	3.76	0.97	0.41
ADP/ATP	6.28	26.01	0.95
Κιτρικό/αKG	12.45	3.77	0.38
GSH/GSSG	0.86	3.35	3.87
NADP ⁺ /NADPH	1.21	0.25	0.21
FAD/FADH ₂	2.19	2.94	2.22
NADH/FADH ₂	1.02	1.34	0.48
Πυροσταφυλικό/γαλακτικό	0.97	0.83	2.31

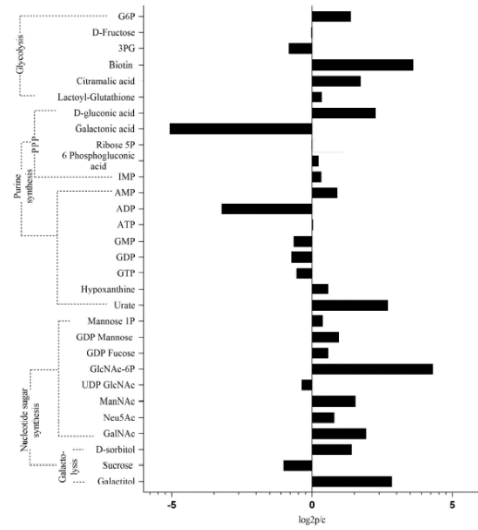
Πίνακας 7.1: Σημαντικοί μεταβολικοί λόγοι που αποκρυπτογραφούν το μεταβόλομα των ΜΔΣ.

G1: διαφοροποιούμενα κύτταρα μυελικής σειράς απομονωμένα από ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με βλάστες <5 % G2: διαφοροποιούμενα κύτταρα μυελικής σειράς απομονωμένα από ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με βλάστες ≥5 %

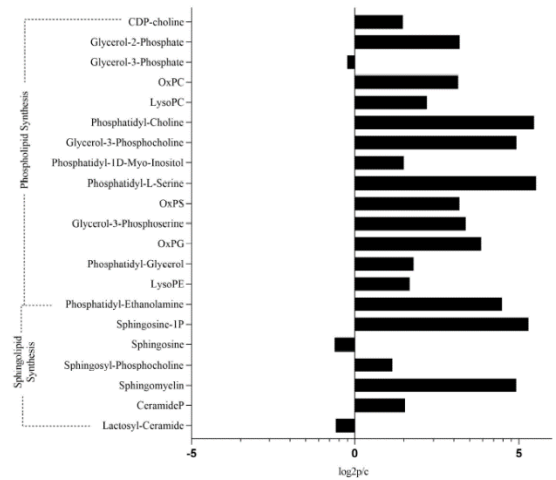
Για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ομάδων G1 και G2, προσδιορίσαμε μεταβολικούς λόγους κλειδιά (πίνακας 7.1). Είναι μια κοινή πρακτική κατά τη διερεύνηση του δυναμικού της οξειδοαναγωγής και των βιοενεργητικών για να

εξασφαλισθεί η μέγιστη αξιοπιστία των δεδομένων, αντί για υπολογισμούς μεμονωμένων μεταβολιτών. Μεταβολικές διαταραχές ενδιαφέροντος αποκαλύφθηκαν κατά τη σύγκριση των δεδομένων αντιπαραθέτοντας ξεχωριστούς λόγους ανά περίπτωση. Η δέσμευση στη γλυκόλυση Warburg τεκμηριώθηκε και υποστηρίχθηκε επιπλέον από τον αυξημένο λόγο ADP/ATP, καθώς και από τον αυξημένο λόγο πυροσταφυλικού/γαλακτικού, τόσο στην ομάδα G1 και G2 έναντι των μαρτύρων (πίνακας 7.1). Η αδυναμία να τεκμηριωθεί σημαντική διαφορά στα επίπεδα του γαλακτικού οφείλεται πιθανά στη μετατόπιση του μεταβολίτη εκτός του κυττάρου [436]. Τεκμηριώσαμε τη γλυκόλυση Warburg και στις δύο ομάδες, G1 και G2, των ΜΔΣ (εικόνες 7.2 και 7.3). Σε αντίθεση με τη γλυκόλυση και τα βασικά παράπλευρα μονοπάτια της PPP και του 1C, κάθε άλλη πλευρά του κυτταρικού μεταβολισμού διέφερε σημαντικά με τη βαρύτητα του ΜΔΣ.

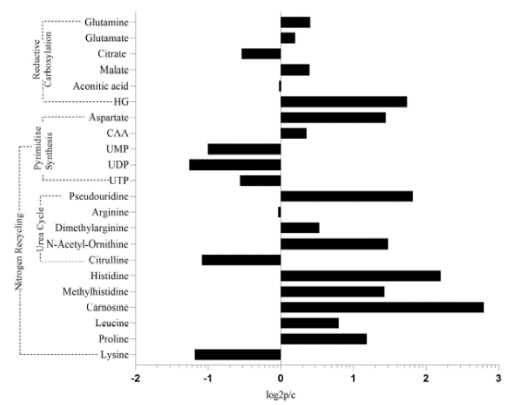
A.



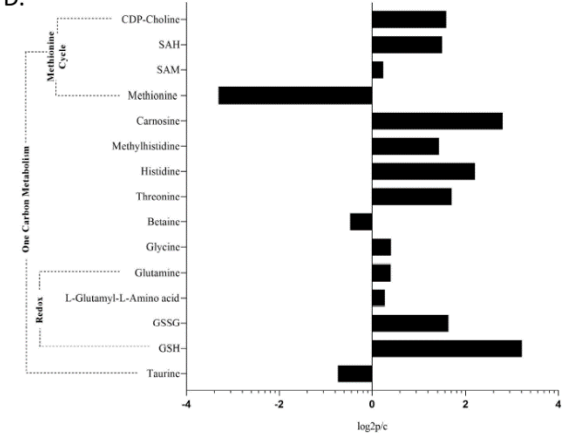
B.



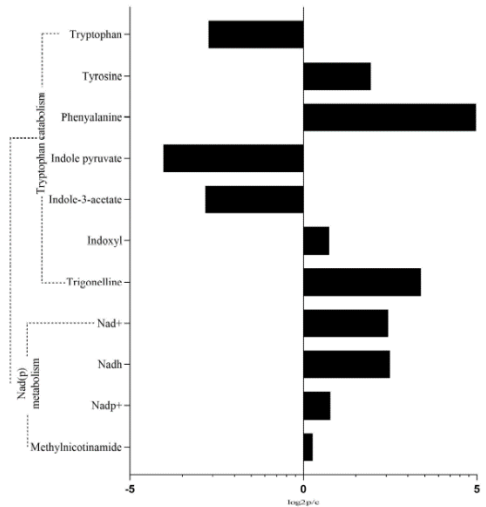
C.



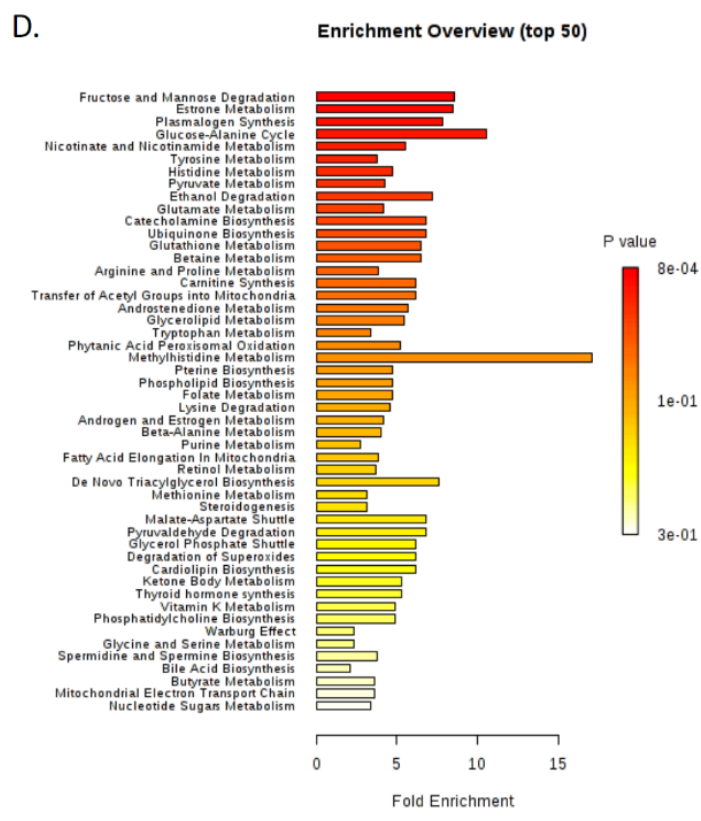
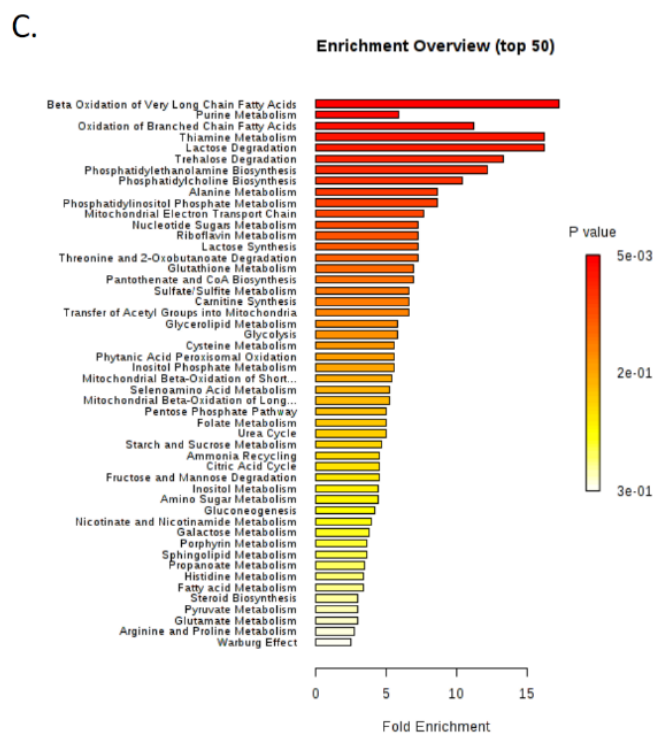
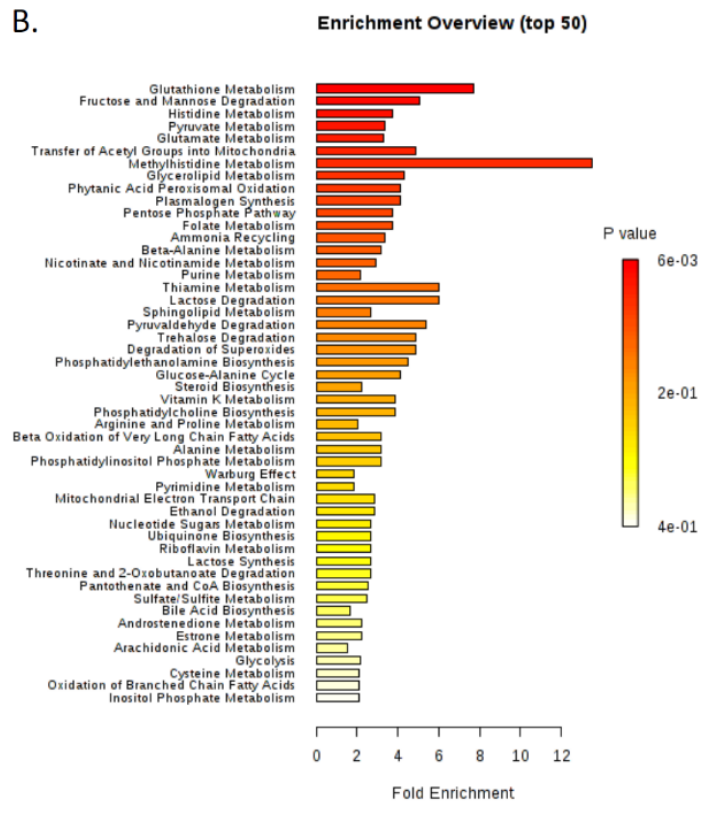
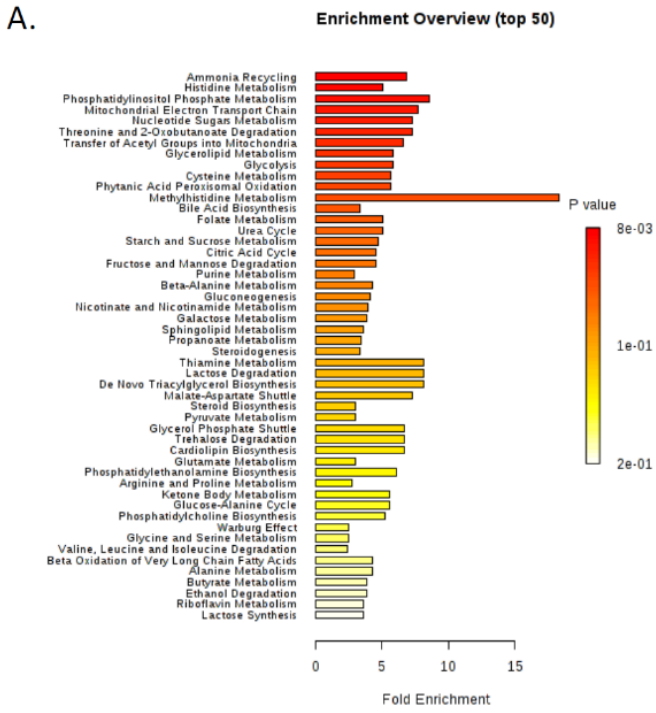
D.



E.



Εικόνα 7.2: Μεταβολές των μεταβολιτών στα μυελικά κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ σε σύγκριση με μάρτυρες ανά μεταβολικό μονοπάτι. (Α) Το φαινόμενο Warburg μέσω των άμεσων παράπλευρων μονοπατιών της γλυκόλυσης (Β) Μεταβολισμός σφιγγολιπιδίων και φωσφολιπιδίων (C) Ανακύκλωση του αζώτου και αναγωγική καρβοξυλίωση (D) Μεταβολισμός μεταφοράς ενός άνθρακα (E) Μεταβολισμός του νικοτινικού και του νικοτιναμιδίου. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Metabokit (2). Ο ουδός του ελάχιστου των τριων δειγμάτων που εκφράζουν ένα συγκεκριμένο μεταβολίτη ετέθη έναντι της σπανιότητας των δεδομένων. Τα ελλiptή δεδομένα υποσημειώθηκαν με μια μικρή τιμή (1). Η κλίμακα των πινάκων των δεδομένων ετέθη μετά από συγκεντροποίηση των δεδομένων και ορισμό της μονάδας διακύμανσης. Και οι δύο βάσεις δεδομένων συγχωνεύθηκαν σε ένα μοναδικό πίνακα δεδομένων λαμβάνοντας υπ'όψιν τις μέγιστες απόλυτες log2fold τιμές όταν ο μεταβολίτης ανευρίσκοντας και στις δύο βάσεις δεδομένων. Τα δεδομένα αναπαριστούν μεταβολές Log2fold, $P < 0.05$. G6P: Glucose-6-Phosphate; 3-PG: 3-Phosphoglycerate; 6GP acid: 6-phosphogluconic acid; IMP: inosine monophosphate; AMP: adenosine monophosphate; ATP: adenosine triphosphate; GMP: guanosine monophosphate; GDP: guanosine diphosphate; GTP: guanosine triphosphate; GlcNAc-6P: N-acetylglucosamine-6-Phosphate; ManNac: N-acetyl-D-mannosamine; Neu5Ac: 5-acetyl-neuraminic acid; GalNac: N-acetyl-galactosamine; SAH: S-adenosyl-homocysteine; SAM: S-adenosyl-methionine; GSSG: glutathione disulfide; GSH: glutathione; oxPC: oxidized phosphatidyl-choline; oxPS: oxidized phosphatidyl-serine; oxPG: oxidized phosphatidyl-glycerol; PE: phosphatidyl-ethanolamine; HG: hydroxyglutarate; CAA: carbamoyl-aspartic acid; UMP: uridine monophosphate; UDP: uridine diphosphate; and UTP: uridine triphosphate.



Εικόνα 7.3: Εκσεσημασμένη μεταβολική απορρύθμιση διαπιστώνεται στα κύτταρα της μυελικής σειράς ασθενών με ΜΔΣ. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση εμπλουτισμού ομάδων μεταβολιτών (Metabolite set enrichment analysis – MSEA) με το MetaboAnalyst (v4.0). Τα εμπλουτισμένα μονοπάτια ταξινομήθηκαν με βάση τη σημαντικότητα (διαβάθμιση χρώματος) όπως υπολογίσθηκε με τη μέθοδο MetPa εφαρμοζόμενη στο MetaboAnalyst (v4.0). (Α) Μεταβόλωμα μαρτύρων έναντι ΜΔΣ (Β) Μεταβόλωμα G2 έναντι μαρτύρων (C) Μεταβόλωμα G1 έναντι μαρτύρων (D) μεταβόλωμα G1 έναντι G2. G1: διαφοροποιούμενα κύτταρα μυελικής σειράς απομονωμένα από αναρρόφημα ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με <5% βλάστες G2: διαφοροποιούμενα κύτταρα μυελικής σειράς απομονωμένα από αναρρόφημα ΜΟ ασθενών με ΜΔΣ με ≥5% βλάστες

7.3.2 Το μεταβόλωμα των ΜΔΣ κυριαρχείται από το μεταβολισμό των λιπιδίων ενώ το ποσοστό βλαστών του ΜΟ οριοθετεί την προέλευση των λιπιδίων και το μονοπάτι της αποδόμησης.

Το κυρίαρχο χαρακτηριστικό του μεταβολόματος των ΜΔΣ είναι τα λιπίδια. Σχεδόν όλοι οι μεταβολίτες που ήταν επαρκώς διαταραγμένοι για να επιβιώσουν την αυστηρότητα της στατιστικής μας ανάλυσης σχετίζονταν με το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (και γενικά των λιπιδίων) (εικόνα 7.3). Προκειμένου να διατηρούνται διαλυτά στο κυρίως υδρικό κυτταρόπλασμα, τα λιπίδια είναι συζευγμένα με μια υδρόφιλη φωσφορική κεφαλή, σχηματίζοντας τα φωσφολιπίδια. Τα φωσφολιπίδια, μεταξύ των οποίων οι φωσφοαιθανολαμίνες (phosphoethanolamines -PE), οι φωσφατυδιλοσερίνες (phosphatidylserines -PS), οι φωσφατυδιλινοσιτόλες (phosphatidylinositols -PI), οι φωσφατυδιλχολίνες (phosphatidylcholines -PC) και η φωσφατυδιλγλυκερόλη (phosphatidylglycerol -PG), μαζί με τα μέσης, μακριάς, πολύ μακριάς και διακλαδούμενης αλυσίδας λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά αυξημένα στο μεταβόλωμα των ΜΔΣ (εικόνα 7.2B). Η προέλευση, ο αριθμός και ο τύπος των λιπιδίων διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων G1, G2 και των μαρτύρων. Η αύξηση των φωσφολιπιδίων ήταν εμφανής στο μεταβόλωμα της G2 (έναντι των μαρτύρων). Η ομάδα G1 παρουσίαζε σημαντική απορρύθμιση των λιπιδίων (PC, PE, Μονοελαδίνη, λιπαρά οξέα πολύ μακριάς αλυσίδας – Very Long Chain Fatty Acids (VLCFAs) και διακλαδούμενης αλυσίδας λιπαρά οξέα – Branched Chain Fatty Acids (BCFAs)) σε σύγκριση με την ομάδα G2 και τους μάρτυρες. Τα μέσης και μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα ήταν περισσότερο κυρίαρχα στο μεταβόλωμα της G2 ομάδας σε σχέση με τη G1.

Η οξειδωση των VLCFAs/BCFAs βρέθηκε να είναι από τα πιο απορρυθμισμένα μονοπάτια όταν το μεταβόλωμα της G1 συγκρίθηκε με αυτό των μαρτύρων (εικόνα 7.2C), ενώ μια σημαντική αύξηση στις καρνιτίνες (παλμιτούλ-, ολεοΐλ- και προπιονυλ- καρνιτίνη) διαπιστώθηκε κατά τη σύγκριση του μεταβολόματος της G2 ομάδας με τους μάρτυρες (εικόνα 7.3B) ή με την ομάδα G1 (εικόνα 7.3D). Η β-οξειδωση των μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων, καθώς και η μεταφορά ακυλομάδων, που και η δύο εμπλέκουν τα λειτουργικά μιτοχόνδρια, παρατηρήθηκαν επίσης στο μεταβόλωμα της G2 [437]. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η β-οξειδωση μπορεί να συμβεί επίσης στα κύτταρα της G1 ομάδας, αλλά πιθανότερα εκτός των μιτοχονδρίων εντός των περοξισωμάτων, καθώς τα VLCFAs και τα BCFAs υφίστανται κατά προτίμηση αποδόμηση το πρωτεάσωμα [437,438]. Να σημειωθεί ότι οι καρνιτίνες, μεταξύ των οποίων και η παλμιτοΐλ-καρνιτίνη, ήταν συνολικά ελαττωμένες στην ομάδα G1 (εικόνα 7.3C).

Η προέλευση των λιπαρών οξέων στα ΜΔΣ ποικίλει επίσης ανάλογα με το ποσοστό των βλαστών του ΜΟ. Η μεταβολομική ανάλυση της ομάδας G1 υποδηλώνει μια αυξημένη αυτοφαγική κατανάλωση των εσωτερικών οργανιδίων που μεταβολικά αποτυπώνεται από τη σημαντική αύξηση των δι- και των τρι-πεπτιδίων, καθώς και από την αύξηση των κεραμιδίων (σφιγγομυελίνη – sphingomyelin (SM), κεραμίδιο P). Οι ομάδες G1 και G2 παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα κιτρικού, υποδεικνύοντας μια συνεχή de novo σύνθεση λιπιδίων, η οποία, τουλάχιστον στην ομάδα G2, στηρίζεται περαιτέρω από το λόγο NADP/NADPH [439] (Πίνακας 7.1).

7.3.3 Ο οπτικός λόγος NADH/FADH₂ και οι λόγοι οξειδο-αναγωγής NAD/NADH, GSH/GSSG και NADP/NADPH

Ενώ σε μελέτες που έχουν δημοσιευθεί προηγουμένως μια χαμηλότερη μιτοχονδριακή μάζα έχει βρεθεί στα διαφοροποιούμενα κύτταρα των ΜΔΣ, οφειλόμενη σε μεγάλο βαθμό στην ανεξέλεγκτη μιτοφαγία, η μιτοχονδριακή λειτουργία δεν έχει ποτέ μελετηθεί. Από μεταβολική άποψη, στην ομάδα G2, η μιτοχονδριακή επάρκεια εδραιώθηκε μέσω ενός ελαττωμένου λόγου NAD/NADH (όταν συγκρίθηκε με την ομάδα των μαρτύρων) παρουσία ενός λειτουργικού κύκλου TCA (πίνακας 7.1). Η αύξηση του οπτικού λόγου οξειδοαναγωγής NADH/FADH₂ στο μεταβόλομα της G2 προτείνει έναν άτυπο μηχανισμό της μιτοχονδριακής λειτουργίας, ειδικά ελεγχόμενο από τη μερική αποδέσμευση του κύκλου του TCA από την ETC [440] (εικόνα 7.2). Η αποδέσμευση υποστηρίζεται επιπλέον από τον εξαιρετικά απορυθμισμένο λόγο ADP/ATP που εντοπίστηκε όταν η ομάδα G2 συγκρίθηκε με τους μάρτυρες [440]. Τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από την ETC υπό αυτές τις συνθήκες δημιουργούν ROS, υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και υπεροξειδίου [440,441]. Μια υπογραφική μεταβολόματος που επάγει ROS έγινε εμφανής στην ομάδα G2 έναντι των μαρτύρων, ενώ η πιο εντυπωσιακή άποψη του μεταβολόματος της G2 ήταν η βελτιωμένη κατάσταση οξειδοαναγωγής που επιδείκνυαν αυτά τα κύτταρα, με βάση των αυξημένο λόγο GSH/GSSG και τα αυξημένα επίπεδα NADP και FAD σε όλες τις συγκρίσεις. Όλα τα κυρίως διαταραγμένα μονοπάτια στην ομάδα G2 (έναντι των μαρτύρων) συνέβαλαν σε μια βελτιωμένη κατάσταση οξειδοαναγωγής μέσω της σύνθεσης γλουταθειόνης και του μεταβολισμού του νικοτιναμιδίου (NAD, NADP, μεθυλνικοτιναμίδιο, τριγκονελλίνη, L-ασπαρτικό) (Εικόνα 7.2E) και της σύνθεσης ουβικινοΐνης. Η ομάδα G1 (σε σύγκριση με τους μάρτυρες) παρουσίαζε αντίστροφους λόγους: μια παθολογική κατάσταση οξειδοαναγωγής ελάττωνε το λόγο NADH/FADH₂ και επάγει ένα παθολογικό κύκλο TCA (Πίνακας 7.1).

7.3.4 Ο μεταβολισμός της γλουταμίνης, η αποτοξίνωση του αζώτου και ο κύκλος του TCA στα ΜΔΣ

Η γλουταμίνη είναι ο βασικός δότης οργανικού άνθρακα για τη λειτουργία του κύκλου TCA απουσία επαρκούς παροχής άνθρακα από τη γλυκόλυση [442]. Η γλουταμίνη και το γλουταμικό οξύ ήταν αυξημένα στην ομάδα G1 έναντι των μαρτύρων (εικόνα 7.3C), καθώς και στην ομάδα G2 έναντι της G1 (εικόνα 7.3D).

Στην ομάδα G2, ο ελαττωμένος λόγος NAD/NADH σε σύγκριση με τους μάρτυρες και ο λόγος FAD/FADH₂ σε σύγκριση με το μεταβόλομα της ομάδας G1, επιβεβαιώνουν τη λειτουργία του κύκλου του TCA [443](Πίνακας 7.1). Επιπλέον, η ομάδα G2 παρουσίαζε αυξημένο λόγο FAD/FADH₂ σε σύγκριση με τους μάρτυρες, πιθανότητα λόγω της προαναφερόμενης αποσύνδεσης που επισυμβαίνει σ μιτοχόνδρια της G2. Αντίστροφα, στην ομάδα G1 η ροή του κύκλου του TCA φαίνεται διαταραγμένη δεδομένου του υψηλού

λόγου NAD/NADH, του σημαντικά υψηλού λόγου αKG/κιτρικού και του αυξημένου λόγου FAD/FADH₂. Παρότι η αναγωγική καρβοξυλίωση επιβεβαιώθηκε από τον ελαττωμένο λόγο αKG/κιτρικού και τον αυξημένο λόγο αKG/σουξινικού και στις δύο ομάδες των ΜΔΣ, ο οξειδωτικός μεταβολισμός της γλουταμίνης (κύκλος TCA) ήταν παρών μόνο στο μεταβόλομα της ομάδας G2, πιθανότατα για τη φυσιολογικοποίηση του λόγου NADP/NADPH μέσω της ρύθμισης του NAD/NADH. Το μεταβόλομα του G2 παρουσίαζε επίσης έναν υψηλότερο λόγο NADP/NADPH σε σύγκριση με τη G1, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει περαιτέρω την αυξημένη αναγωγή της γλουταμίνης στη G2.

Η αποτοξίνωση του αζώτου που προέρχεται από τη γλουταμίνη επιβεβαιώνεται από την αύξηση του αρραρτικού, του ουρικού, του καρβαμοϋλ-ασπαρτικού οξέος και της ασπραγινίνης, καθώς και των διφωσφορικών πουρινών και πυριμιδινών [442,444]. Συνολικά, η σύνθεση πουρινών και πυριμιδινών ήταν πιο επηρεασμένα μονοπάτια του μεταβολόματος των ΜΔΣ (εικόνες 7.2A, 7.3). Το άζωτο της γλουταμίνης εκτρεπόταν επίσης προς το μεταβολισμό της ιστιδίνης, ο οποίος είναι επίσης αυξημένος στα ΜΔΣ, ειδικά στην ομάδα G1. Συγκρίνοντας το μεταβόλομα των ΜΔΣ με τους μάρτυρες, η εργοθειονεινη, η καρνοσίνη, η μεθυλ-ιστιδίνη και η μεθυλ-ισταμίνη ήταν μεταξύ των πιο αυξημένων μεταβολιτών (εικόνα 7.2).

Επιπλέον, ο μεταβολισμός της γλουταμίνης συνδέεται στενά με τη σύνθεση της GSH. Τόσο η GSH όσο και η GSSG ήταν αυξημένες στο μεταβόλομα των ΜΔΣ, ωστόσο μόνο αυτό της G2 ήταν συμβατό με επιβίωση του λόγου GSH/GSSG, όπως αναφέρεται παραπάνω.

7.3.5 Οι επιγενετικοί τροποποιητές είναι ένα διακριτό χαρακτηριστικό των ΜΔΣ

Ο μεταβολισμός των ΜΔΣ καταλήγει στον επαναπρογραμματισμό των επιγενετικών τροποποιητών. Το SAM, το οποίο είναι ο μαζικός ενδοκυττάριος δότης μεθυλομάδων, προέρχεται από τη μεταφορά του 1C και βρέθηκε να είναι μαζικά αυξημένο στο μεταβόλομα των ΜΔΣ περισσότερο στην G1 ομάδα από ότι στη G2 (εικόνα 7.2D). Έχουμε ήδη διατυπώσει την τροποποιημένη χρήση και κινητική των ακετυλομάδων, κυρίως με τη μορφή της αλλαγμένης ροής του TCA, ιδίως κατά την εκτίμηση του μεταβολόματος της G2. Καθώς η λυσίνη αποτελεί ένα βασικό σημείο ακετυλίωσης των πρωτεϊνών, η σημαντική αύξηση της ακετυλ-λυσίνης στο μεταβόλομα των ΜΔΣ έναντι των μαρτύρων υποδηλώνει τροποποιημένη ακετυλίωση των πρωτεϊνών [424]. Επιπλέον, ο τροποποιημένος λόγος NAD/NADH επηρεάζει επίσης δραστικά τις σιρτουίνες (αποακετυλιωτές). Οι λόγοι ADP/ATP και GDP/GTP όπως φαίνεται από τις συγκρίσεις των ΜΔΣ έναντι των μαρτύρων μπορεί να καθορίζουν την ενζυμική δραστηριότητα των επιγενετικών τροποποιητών [445]. Η γλουταθειονυλίωση των πρωτεϊνών φαίνεται επίσης να επηρεάζεται από την κατάσταση του ΜΔΣ δεδομένων των τροποποιημένων επιπέδων GSH, GSSG και του λόγου GSH/GSSG [446]. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταβολόματος-γονιδιώματος φτάνει το μέγιστο της με τον ογκομεταβολίτη 2HG. Πρόκειται για ένα παραπροϊόν της αναγωγικής καρβοξυλίωσης της γλουταμίνης που βρέθηκε να είναι αρκετά αυξημένο την ομάδα των ΜΔΣ (ομάδα G2 έναντι μαρτύρων). Όσο μεγαλύτερη είναι η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve), τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό των βλαστών στο μυελό των οστών και έτσι υψηλότερου κινδύνου το ΜΔΣ.

7.4 Συζήτηση

Το γονιδίωμα και το μεταβόλομα των κυττάρων μπορούν να επεξηγήσουν την κυτταρική λειτουργία και τύχη, όντως στενά αλληλοσυνδεόμενα σε μια δυναμικά ισορροπημένη

μεταξύ τους σχέση [250]. Καθότι δεν έχει καταστεί δυνατό να τεκμηριωθεί ένα διακριτό γενωμικό προφίλ που να οδηγεί στο φαινότυπο του ΜΔΣ και η μεγάλη ποικιλότητα των γενωμικών διαταραχών που χαρακτηρίζει το γονιδίωμα των ΜΔΣ [430], η μελέτη μας εστιάζει στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων. Η υπόθεσή μας υποστηρίζεται επιπλέον από τη μελέτη των Hayashi και συνεργατών [198], στην οποία η απορρύθμιση του HIF-1 βρέθηκε σημαντική και απαραίτητη για την παθογένεση των ΜΔΣ. Ο HIF-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που λειτουργεί ως μέγιστος ρυθμιστής του μεταβολισμού της ηρεμίας και παρουσιάζεται σημαντικά απορρυθμισμένος και παθογενετικά συνδεδεμένος με το φαινότυπο του ΜΔΣ [193]. Επιπλέον, δεδομένου ότι η συμπεριφορά της νόσου ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το ποσοστό των βλαστών, υποθέτουμε επίσης ότι η σοβαρότητα της νόσου μπορεί να επηρεάζεται επίσης από το μεταβολικό προφίλ των δυσπλαστικών κλώνων, οι οποίοι, όπως φαίνεται από την ανάλυσή μας και απεικονίζεται στην εικόνα 7.1, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλότητα και παρέκκλιση σε σχέση με τους μάρτυρες.

Τα ΜΔΣ θεωρούνται νόσοι του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και επομένως αποτελούν κλωνικές διαταραχές [1]. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η μεταβολική απορρύθμιση στο ΜΟ των ασθενών με ΜΔΣ δεν περιορίζεται στους μεταμορφωμένους λευχαιμικούς/βλαστικούς κλώνους, αλλά επηρεάζει κάθε δυσπλαστικό κλώνο. Η επιμονή της μεταβολικής απορρύθμισης στα διαφοροποιούμενα μεταμυελοκύτταρα, τα ραβδοκύτταρα και ακόμη και στα ουδετερόφιλα αποδεικνύει την κλωνική φύση των διαταραχών αυτών. Πιστεύουμε ότι τα δυσπλαστικά κύτταρα, όντας υπό την πίεση του απορρυθμισμένου μεταβολισμού τους, μετατρέπονται σε λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα για να επιβιώσουν – υπόθεση που μένει να αποδειχθεί.

Τα διαφοροποιούμενα κύτταρα από την ομάδα G2 αναπαριστούν ένα βιώσιμο επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού τους προς την οξειδοαναγωγή των αυξημένων ROS που παράγονται από τη μερική αποδέσμευση του μιτοχονδριακού ETC για να διατηρήσουν τη μιτοχονδριακή βιωσιμότητα, όταν καταναλώνουν μέσω της β-οξειδωσης, τα υψηλής ενέργειας λιπαρά οξέα [438,447]. Αυτός ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός που τεκμηριώνεται από τους αυξημένους λόγους GSH/GSSG και NADH/FADH₂ απαιτεί επίσης ένα λειτουργικό TCA κύκλο, όπως επιβεβαιώνεται από τους ελαττωμένους (έναντι των υγιών) και αυξημένους (έναντι της ομάδας G1) λόγους NAD/NADH και FAD/FADH₂, προκειμένου να διατηρηθεί ο έλεγχος ενός ουσιαστικά ενεργού φαινομένου Warburg [443,447]. Να σημειωθεί ότι η γλυκόλυση Warburg παράγει NADH ελαττώνοντας το λόγο NAD/NADH και η μερικώς συζευγμένη ETC λειτουργεί για να το αντιρροπήσει αυτό [225,448,449]. Η γλυκόλυση, ο κύκλος TCA και η ETC αυτορυθμίζουν τη δραστηριότητά τους στην ομάδα G2 [449]. Η αερόβια γλυκόλυση εξασφαλίζει ότι η γλυκόζη που διοχετεύεται στο κύτταρο δε θα καταναλωθεί μέσω της οξειδωσης του ακετυλ-CoA, αλλά από την άλλη πλευρά ότι θα χρησιμοποιηθεί μέσω των παράπλευρων αναβολικών μονοπατιών της, δηλαδή των PPP, του κύκλου 1C και της σύνθεσης φωσφολιπιδίων [435,449]. Η μιτοχονδριακή αποσύζευξη σε συνδυασμό με τη εκτροπή του αρχικού τμήματος της γλυκόλυσης στα παρακαμπτήρια μονοπάτι αυξάνει σημαντικά το λόγο ADP/ATP, διατηρώντας το φαινόμενο Warburg. Το PPP διατηρεί το ελαττωμένο NADP/NADPH λόγο διαθέσιμο είτε για την αναγωγή της GSSG είτε για την αναγωγική καρβοξυλίωση της γλουταμίνης προκειμένου να επανατροφοδοτήσει τον κύκλο TCA. Η μεταφορά 1C παρέχει τα δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων και μαζί με τον κύκλο της μεθειονίνης και το PPP είναι ένα μονοπάτι αποτοξίνωσης του αζώτου της

γλουταμίνης [442,450]. Η γλουταμίνη χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή GSH [450], ενώ ο μεταβολισμός του ΜΔΣ οδηγεί σε σημαντική αύξηση επιγενετικών τροποποιητών. Τα SAM, 2HG, NAD και ακόμη και η GSH εξασφαλίζουν στενή ρύθμιση και προς τις δύο κατευθύνσεις μεταξύ του μεταβολισμού και του γονιδιώματος [428]. Εν τέλει, τα φωσφολιπίδια, που παράγονται μαζικά είτε μέσω της αυτοφαγίας είτε de novo από το αρχικό τμήμα της γλυκόλυσης, δρουν ως δευτερογενείς ενδο- και δια-κυττάρια αγγελιοφόροι, επιτρέποντας την προσαρμογή του κυττάρου στο περιβάλλον μέσω τροποποίησης του ίδιου του περιβάλλοντος [451,452]. Στην πραγματικότητα, η απορρύθμιση των φωσφολιπιδίων αποτελεί ένα κυρίαρχο χαρακτηριστικό στην πλειονότητα των κακοηθειών [452]. Το 2018 οι Stevens και συνεργάτες απέδειξαν ότι στο ΜΟ των ασθενών με ΜΔΣ με >5% βλάστες, ένας διακριτός κλωνικός πληθυσμός CD34+/CD123+ κυττάρων που προσομοιάζουν με τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με διαταραγμένα βιοενεργητικά χαρακτηριστικά επικρατούσαν μέσω ενός βελτιωμένου οξειδοαναγωγικού δυναμικού και καταλοίπων ανακύκλωσης του αζώτου. Αυτά τα κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν επίσης αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών, πιστεύεται ότι αποτελούν προγόνους των εκπτυσσόμενων λευχαιμικών κλώνων στους ασθενείς αυτούς [453]. Είναι ενδιαφέρον ότι τα κύτταρα αυτά δεν παρουσίαζαν αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, εδραιώνοντας τη θεωρία ότι τα λευχαιμικά αρχέγονα κύτταρα είναι στην πραγματικότητα ένας διακριτός πληθυσμός HSCs σε σχετική ηρεμία. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν τα ευρήματα των Stevens και συν. και προτείνουν επίσης ότι ακόμα και στα διαφοροποιούμενα μυελικά κύτταρα των ασθενών της ομάδας G2, αυτή η μεταβολική σφραγίδα είναι εμφανής. Ένα τέτοιο μεταβολικό προφίλ που προσομοιάζει εκείνο των νεοπλασματικών κυττάρων [454], αποτελεί μια ισορροπία μεταξύ αρκετών μεταβολικών μονοπατιών και είναι το αποτέλεσμα μιας επίπονης διαδικασίας δοκιμής και λάθους, με το λάθος να σημαίνει τον κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται στην ομάδα G1.

Όντως τα διαφοροποιούμενα κύτταρα (της ομάδας G1) παρουσίαζαν αυξημένο ρυθμό θανάτου όταν καλλιεργήθηκαν *in vitro*, όπως παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 6. Στα κύτταρα αυτά η μιτοφαγία αποτελεί κυρίαρχο μεταβολικό χαρακτηριστικό, πιθανά λόγω δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων. Ένας μη αποδοτικός κύκλος TCA, συγκεκριμένα αυξημένοι λόγοι NAD/NADH και FAD/FADH₂ με σημαντικά αυξημένα επίπεδα ADP/ATP, οδηγεί σε συσσώρευση λιπαρών οξέων εξαιτίας της αποτυχίας της επαρκούς β-οξειδωσης [447,449]. Ο ανεξέλεγκτος λόγος NAD/NADH ενεργοποιεί το πάνω κομμάτι της γλυκόλυσης σε μεγάλο βαθμό, γεγονός το οποίο δεσμεύει το κύτταρο σε έναν ατέρμονο μεταβολισμό θανάτου [455]. Η αφθονία των ενδιάμεσων του αρχικού τμήματος της γλυκόλυσης εξισορροπείται μέσω της σύνθεσης φωσφολιπιδίων και κεραμιδίων [449]. Τα λιπαρά οξέα, κυρίως η συσσώρευση των φωσφολιπιδίων και των κεραμιδίων, διαταράσσουν το λιπιδίωμα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα φωσφολιπίδια και τα κεραμίδια αποτελούν τα δομικά στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης. Η αποδιοργάνωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης ισοδυναμεί με δυσλειτουργία του κύκλου ETC και επομένως με διαρροή ROS [451,456]. Τελικά τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια στοχεύονται προς αυτοφαγική καταστροφή, αυξάνοντας επιπλέον την απελευθέρωση φωσφολιπιδίων και αποδυναμώνοντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία ολοκληρώνοντας αυτόν τον κύκλο θανάτου [456]. Τα αυξημένα επίπεδα ROS και επομένως το αυξημένο οξειδωτικό στρες αποτελούν χαρακτηριστικά της ανάλυσης μας ως ελαττωμένος λόγος GSH/GSSG, παρά την αυξημένη παραγωγή GSH. Να σημειωθεί ωστόσο ότι ο φαινομενικά βελτιωμένος λόγος GSH/GSSG στην ομάδα G1 έναντι της G2 είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα μια βελτιωμένης οξειδο-αναγωγικής κατάστασης, όπως αποδεικνύεται από τις συγκρίσεις G1

έναντι μαρτύρων και G2 έναντι μαρτύρων. Αντίθετα η αυξημένη γλουταθειονυλίωση και η λειτουργική βλάβη των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ήταν εμφανής στη G1 ομάδα [446,457]. Επιπλέον, η αποτυχία των μιτοχονδρίων να οξειδώσουν τα λιπαρά οξέα οδηγεί στη συσσώρευση και την υπεροξειδωσιακή αποδόμηση. Η υπεροξειδωσιακή βιογένεση επάγεται από την αυξημένη ανάγκη για υπεροξειδωσιακά και το ενδοπλασματικό δίκτυο εν συνεχεία καταναλώνεται στη διαδικασία σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων και τη γένεση υπεροξειδωσιαμάτων, οδηγώντας τελικά στο θάνατο του κυττάρου [458-460].

Λόγω της σπανιότητας τέτοιων δειγμάτων στη δεξαμενή των ασθενών μας, η κοορτή μας δε συμπεριέλαβε κλινικές περιπτώσεις ΜΔΣ με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες. Πραγματοποιήσαμε μια προσπάθεια να συγκρίνουμε το βιοενεργητικό προφίλ του ΜΔΣ-RS με εκείνο των ασθενών της ομάδας G1, καθότι και αυτός ο τύπος ανήκει στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ, ανασκοπώντας τη βιβλιογραφία. Η πλειονότητα των ΜΔΣ-RS φέρουν μεταλλάξεις του SF3B1 [461]. Ενώ οι μεταλλάξεις του SF3B1 οδηγούν στο σχηματισμό δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών στην ερυθρά σειρά του δυσπλαστικού κλώνου, δεν είναι αποσαφηνισμένες οι επιπτώσεις του στο μυελικό υποκλώνο [462]. Από μεταβολομική άποψη οι μεταλλάξεις του SF3B1 προκαλούν σημαντικές διαταραχές στην ETC και κατ'έπекταση στη μιτοχονδριακή αναπνοή λόγω βλάβης στη συναρμολόγηση του συμπλέγματος III [463] στη διαφοροποιούμενη μυελική σειρά των ΜΔΣ-RS [462].

7.5 Συμπεράσματα

Στην ομάδα G1 κυριαρχεί το φαινόμενο Warburg. Η ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας με τον αυξημένο λόγω NAD⁺/NADH και το σημαντικά αυξημένο λόγο ADP/ATP αυξάνει την κυτταρική οξειδωτική πίεση. Σε σύγκριση με τους υγιείς ο λόγος GSH/GSSG ήταν ελαττωμένος, ενώ ο λόγος NADP⁺/NADPH ήταν αυξημένος, υποδεικνύοντας το αυξημένο οξειδωτικό στρες στο οποίο διαβιούν τα πρόδρομα κύτταρα των χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ. Αντίθετα, το μεταβόλομα της ομάδας G2 παρουσίαζε αντίστροφους λόγους. Η ελάττωση του αυξημένου λόγου NAD⁺/NADH, όπως προτείνουμε μέσω του μιτοχονδριακού κύκλου TCA, επιτρέπει στα πρόδρομα μυελικά κύτταρα των ΜΔΣ με αυξημένο ποσοστό βλαστών να χρησιμοποιούν την αερόβια γλυκόλυση για αναβολικές διεργασίες. Να σημειωθεί ότι στην ομάδα αυτή των ΜΔΣ η μιτοχονδριακή λειτουργία υποστηρίζεται από την ανάλυσή μας. Στην πραγματικότητα ένας ελαττωμένος λόγος ADP/ATP επιτρέπει τη βιώσιμη χρήση του φαινομένου Warburg. Όταν τα πρόδρομα αυτά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να εξισορροπούν την αερόβια γλυκόλυση και το μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες, προκύπτει η εκτροπή σε OML. Υποθέτουμε ότι εξαιτίας ενός εναρκτήριου γεγονότος, το οποίο μένει να ταυτοποιηθεί, τα HSCs αποτυγχάνουν να απενεργοποιήσουν τον εξαρτώμενο τον HIF-1 μεταβολισμό και εισέρχονται στο βιοενεργητικό προφίλ της G1. Μέσω του επακόλουθου συνεχούς μεταβολικού στρες και της αφθονίας επιγενετικών τροποποιητών, το ΜΔΣ με χαμηλό ποσοστό βλαστών μετατρέπεται σε υψηλού κινδύνου και τελικά σε OML. Η ταυτοποίηση αυτού του γεγονότος και η λεπτομερής μελέτη του μεταβολόματος του ΜΔΣ μπορεί να προσφέρει βελτιωμένες θεραπευτικές στρατηγικές για την αινιγματική αυτή οντότητα.

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.M.; Bloomfield, C.D.; Cazzola, M.; Vardiman, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2391-2405, doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
2. Hofmann, W.K.; Koeffler, H.P. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med* **2005**, *56*, 1-16, doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104704.
3. Bowen, D.; Culligan, D.; Jowitt, S.; Kelsey, S.; Mufti, G.; Oscier, D.; Parker, J. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* **2003**, *120*, 187-200, doi:10.1046/j.1365-2141.2003.03907.x.
4. Greenberg, P.; Cox, C.; LeBeau, M.M.; Fenau, P.; Morel, P.; Sanz, G.; Sanz, M.; Vallespi, T.; Hamblin, T.; Oscier, D., et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **1997**, *89*, 2079-2088.
5. Greenberg, P.L.; Tuechler, H.; Schanz, J.; Sanz, G.; Garcia-Manero, G.; Solé, F.; Bennett, J.M.; Bowen, D.; Fenau, P.; Dreyfus, F., et al. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood* **2016**, *128*, 2096-2097, doi:10.1182/blood-2016-07-728766.
6. Malcovati, L.; Porta, M.G.; Pascutto, C.; Invernizzi, R.; Boni, M.; Travaglini, E.; Passamonti, F.; Arcaini, L.; Maffioli, M.; Bernasconi, P., et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 7594-7603, doi:10.1200/jco.2005.01.7038.
7. Malcovati, L.; Germing, U.; Kuendgen, A.; Della Porta, M.G.; Pascutto, C.; Invernizzi, R.; Giagounidis, A.; Hildebrandt, B.; Bernasconi, P.; Knipp, S., et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* **2007**, *25*, 3503-3510, doi:10.1200/jco.2006.08.5696.
8. Cogle, C.R.; Craig, B.M.; Rollison, D.E.; List, A.F. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. *Blood* **2011**, *117*, 7121-7125, doi:10.1182/blood-2011-02-337964.
9. Germing, U.; Strupp, C.; Kündgen, A.; Bowen, D.; Aul, C.; Haas, R.; Gattermann, N. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **2004**, *89*, 905-910.
10. Goldberg, S.L.; Chen, E.; Corral, M.; Guo, A.; Mody-Patel, N.; Pecora, A.L.; Laouri, M. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States Medicare beneficiaries. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 2847-2852, doi:10.1200/jco.2009.25.2395.
11. Ma, X.; Does, M.; Raza, A.; Mayne, S.T. Myelodysplastic syndromes. *Cancer* **2007**, *109*, 1536-1542, doi:<https://doi.org/10.1002/cncr.22570>.
12. Rollison, D.E.; Howlader, N.; Smith, M.T.; Strom, S.S.; Merritt, W.D.; Ries, L.A.; Edwards, B.K.; List, A.F. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* **2008**, *112*, 45-52, doi:10.1182/blood-2008-01-134858.
13. Valent, P.; Bain, B.J.; Bennett, J.M.; Wimazal, F.; Sperr, W.R.; Mufti, G.; Horny, H.P. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res* **2012**, *36*, 1-5, doi:10.1016/j.leukres.2011.08.016.
14. Steensma, D.P.; Bejar, R.; Jaiswal, S.; Lindsley, R.C.; Sekeres, M.A.; Hasserjian, R.P.; Ebert, B.L. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **2015**, *126*, 9-16, doi:10.1182/blood-2015-03-631747.

15. Strom, S.S.; Gu, Y.; Gruschkus, S.K.; Pierce, S.A.; Estey, E.H. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia* **2005**, *19*, 1912-1918, doi:10.1038/sj.leu.2403945.
16. Alter, B.P.; Giri, N.; Savage, S.A.; Peters, J.A.; Loud, J.T.; Leathwood, L.; Carr, A.G.; Greene, M.H.; Rosenberg, P.S. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol* **2010**, *150*, 179-188, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08212.x.
17. Greenberg, P.L.; Tuechler, H.; Schanz, J.; Sanz, G.; Garcia-Manero, G.; Solé, F.; Bennett, J.M.; Bowen, D.; Fenaux, P.; Dreyfus, F., et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* **2012**, *120*, 2454-2465, doi:10.1182/blood-2012-03-420489.
18. Marinier, D.E.; Mesa, H.; Rawal, A.; Gupta, P. Refractory cytopenias with unilineage dysplasia: a retrospective analysis of refractory neutropenia and refractory thrombocytopenia. *Leuk Lymphoma* **2010**, *51*, 1923-1926, doi:10.3109/10428194.2010.506568.
19. Germing, U.; Strupp, C.; Giagounidis, A.; Haas, R.; Gattermann, N.; Starke, C.; Aul, C. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* **2012**, *36*, 727-734, doi:10.1016/j.leukres.2012.02.014.
20. Maassen, A.; Strupp, C.; Giagounidis, A.; Kuendgen, A.; Nachtkamp, K.; Hildebrandt, B.; Gattermann, N.; Aul, C.; Haas, R.; Germing, U. Validation and proposals for a refinement of the WHO 2008 classification of myelodysplastic syndromes without excess of blasts. *Leuk Res* **2013**, *37*, 64-70, doi:10.1016/j.leukres.2012.09.021.
21. Rosati, S.; Mick, R.; Xu, F.; Stonys, E.; Le Beau, M.M.; Larson, R.; Vardiman, J.W. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia: further characterization of an 'unclassifiable' myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **1996**, *10*, 20-26.
22. Della Porta, M.G.; Travaglino, E.; Boveri, E.; Ponzoni, M.; Malcovati, L.; Papaemmanuil, E.; Rigolin, G.M.; Pascutto, C.; Croci, G.; Gianelli, U., et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2015**, *29*, 66-75, doi:10.1038/leu.2014.161.
23. Matsuda, A.; Germing, U.; Jinnai, I.; Iwanaga, M.; Misumi, M.; Kuendgen, A.; Strupp, C.; Miyazaki, Y.; Tsushima, H.; Sakai, M., et al. Improvement of criteria for refractory cytopenia with multilineage dysplasia according to the WHO classification based on prognostic significance of morphological features in patients with refractory anemia according to the FAB classification. *Leukemia* **2007**, *21*, 678-686, doi:10.1038/sj.leu.2404571.
24. Goasguen, J.E.; Bennett, J.M.; Bain, B.J.; Brunning, R.; Vallespi, M.T.; Tomonaga, M.; Zini, G.; Renault, A. Proposal for refining the definition of dysgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* **2014**, *38*, 447-453, doi:10.1016/j.leukres.2013.12.020.
25. Goasguen, J.E.; Bennett, J.M.; Bain, B.J.; Brunning, R.D.; Vallespi, M.T.; Tomonaga, M.; Zini, G.; Renault, A. Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of dysplasia. *Leuk Res* **2016**, *45*, 75-81, doi:10.1016/j.leukres.2016.04.009.
26. Lai, J.L.; Preudhomme, C.; Zandecki, M.; Flactif, M.; Vanrumbeke, M.; Lepelley, P.; Wattel, E.; Fenaux, P. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia* **1995**, *9*, 370-381.
27. Braun, T.; de Botton, S.; Taksin, A.L.; Park, S.; Beyne-Rauzy, O.; Coiteux, V.; Sapena, R.; Lazareth, A.; Leroux, G.; Guenda, K., et al. Characteristics and outcome of myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated 20q deletion: a report on 62 cases. *Leuk Res* **2011**, *35*, 863-867, doi:10.1016/j.leukres.2011.02.008.

28. Rogers, H.J.; Vardiman, J.W.; Anastasi, J.; Raca, G.; Savage, N.M.; Cherry, A.M.; Arber, D.; Moore, E.; Morrissette, J.J.; Bagg, A., et al. Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2): a Bone Marrow Pathology Group study. *Haematologica* **2014**, *99*, 821-829, doi:10.3324/haematol.2013.096420.
29. Haferlach, T.; Nagata, Y.; Grossmann, V.; Okuno, Y.; Bacher, U.; Nagae, G.; Schnittger, S.; Sanada, M.; Kon, A.; Alpermann, T., et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2014**, *28*, 241-247, doi:10.1038/leu.2013.336.
30. Papaemmanuil, E.; Gerstung, M.; Malcovati, L.; Tauro, S.; Gundem, G.; Van Loo, P.; Yoon, C.J.; Ellis, P.; Wedge, D.C.; Pellagatti, A., et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2013**, *122*, 3616-3627; quiz 3699, doi:10.1182/blood-2013-08-518886.
31. Walter, M.J.; Shen, D.; Ding, L.; Shao, J.; Koboldt, D.C.; Chen, K.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Dooling, D.; Abbott, R., et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **2012**, *366*, 1090-1098, doi:10.1056/NEJMoa1106968.
32. Genovese, G.; Jaiswal, S.; Ebert, B.L.; McCarroll, S.A. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk. *N Engl J Med* **2015**, *372*, 1071-1072, doi:10.1056/NEJMc1500684.
33. Bejar, R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **2014**, *99*, 956-964, doi:10.3324/haematol.2013.085217.
34. Traina, F.; Visconte, V.; Elson, P.; Tabarroki, A.; Jankowska, A.M.; Hasrouni, E.; Sugimoto, Y.; Szpurka, H.; Makishima, H.; O'Keefe, C.L., et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia* **2014**, *28*, 78-87, doi:10.1038/leu.2013.269.
35. Mallo, M.; Del Rey, M.; Ibáñez, M.; Calasanz, M.J.; Arenillas, L.; Larráyo, M.J.; Pedro, C.; Jerez, A.; Maciejewski, J.; Costa, D., et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol* **2013**, *162*, 74-86, doi:10.1111/bjh.12354.
36. Cleven, A.H.; Nardi, V.; Ok, C.Y.; Goswami, M.; Dal Cin, P.; Zheng, Z.; Iafrate, A.J.; Abdul Hamid, M.A.; Wang, S.A.; Hasserjian, R.P. High p53 protein expression in therapy-related myeloid neoplasms is associated with adverse karyotype and poor outcome. *Mod Pathol* **2015**, *28*, 552-563, doi:10.1038/modpathol.2014.153.
37. Bejar, R.; Stevenson, K.E.; Caughey, B.; Lindsley, R.C.; Mar, B.G.; Stojanov, P.; Getz, G.; Steensma, D.P.; Ritz, J.; Soiffer, R., et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* **2014**, *32*, 2691-2698, doi:10.1200/jco.2013.52.3381.
38. Hsu, J.; Reilly, A.; Hayes, B.J.; Clough, C.A.; Konnick, E.Q.; Torok-Storb, B.; Gulsuner, S.; Wu, D.; Becker, P.S.; Keel, S.B., et al. Reprogramming identifies functionally distinct stages of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2019**, *134*, 186-198, doi:10.1182/blood.2018884338.
39. Mossner, M.; Jann, J.-C.; Wittig, J.; Nolte, F.; Fey, S.; Nowak, V.; Obländer, J.; Pressler, J.; Palme, I.; Xanthopoulos, C., et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* **2016**, *128*, 1246-1259, doi:10.1182/blood-2015-11-679167.
40. Raza, A.; Galili, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 849-859, doi:10.1038/nrc3321.
41. Fernandez-Mercado, M.; Yip, B.H.; Pellagatti, A.; Davies, C.; Larrayoz, M.J.; Kondo, T.; Pérez, C.; Killick, S.; McDonald, E.J.; Odero, M.D., et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoS One* **2012**, *7*, e42334, doi:10.1371/journal.pone.0042334.
42. Gañán-Gómez, I.; Wei, Y.; Starczynowski, D.T.; Colla, S.; Yang, H.; Cabrero-Calvo, M.; Bohannon, Z.S.; Verma, A.; Steidl, U.; Garcia-Manero, G. Deregulation of innate immune and

inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2015**, *29*, 1458-1469, doi:10.1038/leu.2015.69.

43. Visconte, V.; Tiu, R.V.; Rogers, H.J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res* **2014**, *49*, 216-227, doi:10.5045/br.2014.49.4.216.

44. Steensma, D.P. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal* **2018**, *8*, 47, doi:10.1038/s41408-018-0085-4.

45. Swoboda, D.M.; Gesiotto, Q.; Sallman, D.A. Novel therapies in myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Hematol* **2020**, *27*, 58-65, doi:10.1097/moh.0000000000000562.

46. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 5510-5514, doi:10.1073/pnas.92.12.5510.

47. Huang, L.E.; Gu, J.; Schau, M.; Bunn, H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 7987-7992, doi:10.1073/pnas.95.14.7987.

48. Lando, D.; Peet, D.J.; Whelan, D.A.; Gorman, J.J.; Whitelaw, M.L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **2002**, *295*, 858-861, doi:10.1126/science.1068592.

49. Déry, M.A.; Michaud, M.D.; Richard, D.E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, *37*, 535-540, doi:10.1016/j.biocel.2004.08.012.

50. Mole, D.R.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life* **2001**, *52*, 43-47, doi:10.1080/15216540252774757.

51. Pagé, E.L.; Robitaille, G.A.; Pouyssegur, J.; Richard, D.E. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 48403-48409, doi:10.1074/jbc.M209114200.

52. Morris, M.R.; Maina, E.; Morgan, N.V.; Gentle, D.; Astuti, D.; Moch, H.; Kishida, T.; Yao, M.; Schraml, P.; Richards, F.M., et al. Molecular genetic analysis of FIH-1, FH, and SDHB candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *J Clin Pathol* **2004**, *57*, 706-711, doi:10.1136/jcp.2003.011767.

53. Selak, M.A.; Armour, S.M.; MacKenzie, E.D.; Boulahbel, H.; Watson, D.G.; Mansfield, K.D.; Pan, Y.; Simon, M.C.; Thompson, C.B.; Gottlieb, E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer cell* **2005**, *7*, 77-85, doi:10.1016/j.ccr.2004.11.022.

54. Frezza, C.; Pollard, P.J.; Gottlieb, E. Inborn and acquired metabolic defects in cancer. *J Mol Med (Berl)* **2011**, *89*, 213-220, doi:10.1007/s00109-011-0728-4.

55. Adam, J.; Yang, M.; Soga, T.; Pollard, P.J. Rare insights into cancer biology. *Oncogene* **2014**, *33*, 2547-2556, doi:10.1038/onc.2013.222.

56. Sonveaux, P.; Copetti, T.; De Saedeleer, C.J.; Végran, F.; Verrax, J.; Kennedy, K.M.; Moon, E.J.; Dhup, S.; Danhier, P.; Frérart, F., et al. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* **2012**, *7*, e33418, doi:10.1371/journal.pone.0033418.

57. Lu, H.; Forbes, R.A.; Verma, A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 23111-23115, doi:10.1074/jbc.M202487200.

58. Jung, S.-Y.; Song, H.S.; Park, S.-Y.; Chung, S.-H.; Kim, Y.-J. Pyruvate promotes tumor angiogenesis through HIF-1-dependent PAI-1 expression. *Int J Oncol* **2011**, *38*, 571-576, doi:10.3892/ijo.2010.859.

59. Pan, Y.; Mansfield, K.D.; Bertozzi, C.C.; Rudenko, V.; Chan, D.A.; Giaccia, A.J.; Simon, M.C. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-

inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 912-925, doi:10.1128/mcb.01223-06.

60. MacKenzie, E.D.; Selak, M.A.; Tennant, D.A.; Payne, L.J.; Crosby, S.; Frederiksen, C.M.; Watson, D.G.; Gottlieb, E. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 3282-3289, doi:10.1128/mcb.01927-06.

61. Ho, H.Y.; Lin, Y.T.; Lin, G.; Wu, P.R.; Cheng, M.L. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) deficiency dysregulates mitochondrial retrograde signaling and impedes proliferation. *Redox Biol* **2017**, *12*, 916-928, doi:10.1016/j.redox.2017.04.035.

62. Iommarini, L.; Kurelac, I.; Capristo, M.; Calvaruso, M.A.; Giorgio, V.; Bergamini, C.; Ghelli, A.; Nanni, P.; De Giovanni, C.; Carelli, V., et al. Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum Mol Genet* **2014**, *23*, 1453-1466, doi:10.1093/hmg/ddt533.

63. Calabrese, C.; Iommarini, L.; Kurelac, I.; Calvaruso, M.A.; Capristo, M.; Lollini, P.L.; Nanni, P.; Bergamini, C.; Nicoletti, G.; Giovanni, C.D., et al. Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. *Cancer Metab* **2013**, *1*, 11, doi:10.1186/2049-3002-1-11.

64. Zeng, L.; Morinibu, A.; Kobayashi, M.; Zhu, Y.; Wang, X.; Goto, Y.; Yeom, C.J.; Zhao, T.; Hirota, K.; Shinomiya, K., et al. Aberrant IDH3 α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene* **2015**, *34*, 4758-4766, doi:10.1038/onc.2014.411.

65. Puisségur, M.P.; Mazure, N.M.; Bertero, T.; Pradelli, L.; Grosso, S.; Robbe-Sermesant, K.; Maurin, T.; Lebrigand, K.; Cardinaud, B.; Hofman, V., et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* **2011**, *18*, 465-478, doi:10.1038/cdd.2010.119.

66. Koivunen, P.; Lee, S.; Duncan, C.G.; Lopez, G.; Lu, G.; Ramkissoon, S.; Losman, J.A.; Joensuu, P.; Bergmann, U.; Gross, S., et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* **2012**, *483*, 484-488, doi:10.1038/nature10898.

67. Zhang, H.; Bosch-Marce, M.; Shimoda, L.A.; Tan, Y.S.; Baek, J.H.; Wesley, J.B.; Gonzalez, F.J.; Semenza, G.L. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 10892-10903, doi:10.1074/jbc.M800102200.

68. Papandreou, I.; Cairns, R.A.; Fontana, L.; Lim, A.L.; Denko, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **2006**, *3*, 187-197, doi:10.1016/j.cmet.2006.01.012.

69. Zhou, X.; Chen, J.; Yi, G.; Deng, M.; Liu, H.; Liang, M.; Shi, B.; Fu, X.; Chen, Y.; Chen, L., et al. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 α through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 873-884, doi:10.18632/oncotarget.6418.

70. Porcelli, A.M.; Ghelli, A.; Ceccarelli, C.; Lang, M.; Cenacchi, G.; Capristo, M.; Pennisi, L.F.; Morra, I.; Ciccarelli, E.; Melcarne, A., et al. The genetic and metabolic signature of oncogenic transformation implicates HIF1 α destabilization. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, 1019-1032, doi:10.1093/hmg/ddp566.

71. Gasparre, G.; Romeo, G.; Rugolo, M.; Porcelli, A.M. Learning from oncogenic tumors: Why choose inefficient mitochondria? *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1807*, 633-642, doi:10.1016/j.bbabi.2010.08.006.

72. Ellinghaus, P.; Heisler, I.; Unterschemmann, K.; Haerter, M.; Beck, H.; Greschat, S.; Ehrmann, A.; Summer, H.; Flamme, I.; Oehme, F., et al. BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I. *Cancer Med* **2013**, *2*, 611-624, doi:10.1002/cam4.112.

73. Hagen, T.; Taylor, C.T.; Lam, F.; Moncada, S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* **2003**, *302*, 1975-1978, doi:10.1126/science.1088805.
74. Hagen, T.; D'Amico, G.; Quintero, M.; Palacios-Callender, M.; Hollis, V.; Lam, F.; Moncada, S. Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *322*, 923-929, doi:DOI:101016/j.bbrc.2004.07.204.
75. Chandel, N.S.; Maltepe, E.; Goldwasser, E.; Mathieu, C.E.; Simon, M.C.; Schumacker, P.T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 11715-11720, doi:10.1073/pnas.95.20.11715.
76. Doege, K.; Heine, S.; Jensen, I.; Jelkmann, W.; Metzen, E. Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact. *Blood* **2005**, *106*, 2311-2317, doi:10.1182/blood-2005-03-1138.
77. Agani, F.H.; Pichiule, P.; Chavez, J.C.; LaManna, J.C. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 35863-35867, doi:10.1074/jbc.M005643200.
78. Prior, S.; Kim, A.; Yoshihara, T.; Tobita, S.; Takeuchi, T.; Higuchi, M. Mitochondrial respiratory function induces endogenous hypoxia. *PLoS One* **2014**, *9*, e88911-e88911, doi:10.1371/journal.pone.0088911.
79. Vaux, E.C.; Metzen, E.; Yeates, K.M.; Ratcliffe, P.J. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* **2001**, *98*, 296-302, doi:10.1182/blood.v98.2.296.
80. Srinivas, V.; Leshchinsky, I.; Sang, N.; King, M.P.; Minchenko, A.; Caro, J. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 21995-21998, doi:10.1074/jbc.C100177200.
81. Gong, Y.; Agani, F.H. Oligomycin inhibits HIF-1alpha expression in hypoxic tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2005**, *288*, C1023-1029, doi:10.1152/ajpcell.00443.2004.
82. Chandel, N.S.; McClintock, D.S.; Feliciano, C.E.; Wood, T.M.; Melendez, J.A.; Rodriguez, A.M.; Schumacker, P.T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 25130-25138, doi:10.1074/jbc.M001914200.
83. Movafagh, S.; Crook, S.; Vo, K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* **2015**, *116*, 696-703, doi:10.1002/jcb.25074.
84. Brunelle, J.K.; Bell, E.L.; Quesada, N.M.; Vercauteren, K.; Tiranti, V.; Zeviani, M.; Scarpulla, R.C.; Chandel, N.S. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* **2005**, *1*, 409-414, doi:10.1016/j.cmet.2005.05.002.
85. Chua, Y.L.; Dufour, E.; Dassa, E.P.; Rustin, P.; Jacobs, H.T.; Taylor, C.T.; Hagen, T. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 31277-31284, doi:10.1074/jbc.M110.158485.
86. Hamanaka, R.B.; Weinberg, S.E.; Reczek, C.R.; Chandel, N.S. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Required for Organismal Adaptation to Hypoxia. *Cell Rep* **2016**, *15*, 451-459, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.044.
87. Birsoy, K.; Wang, T.; Chen, W.W.; Freinkman, E.; Abu-Remaileh, M.; Sabatini, D.M. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* **2015**, *162*, 540-551, doi:10.1016/j.cell.2015.07.016.
88. Ryan, H.E.; Poloni, M.; McNulty, W.; Elson, D.; Gassmann, M.; Arbeit, J.M.; Johnson, R.S. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* **2000**, *60*, 4010-4015.

89. Liao, D.; Corle, C.; Seagroves, T.N.; Johnson, R.S. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* **2007**, *67*, 563-572, doi:10.1158/0008-5472.Can-06-2701.
90. Kim, J.J.; Lee, S.B.; Jang, J.; Yi, S.Y.; Kim, S.H.; Han, S.A.; Lee, J.M.; Tong, S.Y.; Vincelette, N.D.; Gao, B., et al. WSB1 promotes tumor metastasis by inducing pVHL degradation. *Genes Dev* **2015**, *29*, 2244-2257, doi:10.1101/gad.268128.115.
91. Goto, Y.; Zeng, L.; Yeom, C.J.; Zhu, Y.; Morinibu, A.; Shinomiya, K.; Kobayashi, M.; Hirota, K.; Itasaka, S.; Yoshimura, M., et al. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun* **2015**, *6*, 6153, doi:10.1038/ncomms7153.
92. Doe, M.R.; Ascano, J.M.; Kaur, M.; Cole, M.D. Myc posttranscriptionally induces HIF1 protein and target gene expression in normal and cancer cells. *Cancer Res* **2012**, *72*, 949-957, doi:10.1158/0008-5472.Can-11-2371.
93. Amelio, I.; Inoue, S.; Markert, E.K.; Levine, A.J.; Knight, R.A.; Mak, T.W.; Melino, G. TAp73 opposes tumor angiogenesis by promoting hypoxia-inducible factor 1 α degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 226-231, doi:10.1073/pnas.1410609111.
94. Ravi, R.; Mookerjee, B.; Bhujwala, Z.M.; Sutter, C.H.; Artemov, D.; Zeng, Q.; Dillehay, L.E.; Madan, A.; Semenza, G.L.; Bedi, A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* **2000**, *14*, 34-44.
95. Joshi, S.; Singh, A.R.; Durden, D.L. MDM2 regulates hypoxic hypoxia-inducible factor 1 α stability in an E3 ligase, proteasome, and PTEN-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-dependent manner. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 22785-22797, doi:10.1074/jbc.M114.587493.
96. Nieminen, A.L.; Qanungo, S.; Schneider, E.A.; Jiang, B.H.; Agani, F.H. Mdm2 and HIF-1alpha interaction in tumor cells during hypoxia. *J Cell Physiol* **2005**, *204*, 364-369, doi:10.1002/jcp.20406.
97. Liu, Y.V.; Baek, J.H.; Zhang, H.; Diez, R.; Cole, R.N.; Semenza, G.L. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* **2007**, *25*, 207-217, doi:10.1016/j.molcel.2007.01.001.
98. Cheng, J.; Kang, X.; Zhang, S.; Yeh, E.T.H. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* **2007**, *131*, 584-595, doi:10.1016/j.cell.2007.08.045.
99. Baek, J.H.; Liu, Y.V.; McDonald, K.R.; Wesley, J.B.; Zhang, H.; Semenza, G.L. Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 33358-33366, doi:10.1074/jbc.M705627200.
100. Isaacs, J.S.; Jung, Y.J.; Mimnaugh, E.G.; Martinez, A.; Cuttitta, F.; Neckers, L.M. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 29936-29944, doi:10.1074/jbc.M204733200.
101. Liu, Y.V.; Semenza, G.L. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 656-659, doi:10.4161/cc.6.6.3981.
102. Liu, Y.V.; Hubbi, M.E.; Pan, F.; McDonald, K.R.; Mansharamani, M.; Cole, R.N.; Liu, J.O.; Semenza, G.L. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 37064-37073, doi:10.1074/jbc.M705015200.
103. Kim, K.H.; Kim, D.; Park, J.Y.; Jung, H.J.; Cho, Y.H.; Kim, H.K.; Han, J.; Choi, K.Y.; Kwon, H.J. NNC 55-0396, a T-type Ca²⁺ channel inhibitor, inhibits angiogenesis via suppression of hypoxia-inducible factor-1 α signal transduction. *J Mol Med (Berl)* **2015**, *93*, 499-509, doi:10.1007/s00109-014-1235-1.
104. Chen, S.-j.; Hoffman, N.E.; Shanmughapriya, S.; Bao, L.; Keefer, K.; Conrad, K.; Merali, S.; Takahashi, Y.; Abraham, T.; Hirschler-Laszkiewicz, I., et al. A splice variant of the human ion channel TRPM2 modulates neuroblastoma tumor growth through hypoxia-inducible factor

(HIF)-1/2 α . *The Journal of biological chemistry* **2014**, *289*, 36284-36302, doi:10.1074/jbc.M114.620922.

105. Yee Koh, M.; Spivak-Kroizman, T.R.; Powis, G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* **2008**, *33*, 526-534, doi:10.1016/j.tibs.2008.08.002.

106. Lendahl, U.; Lee, K.L.; Yang, H.; Poellinger, L. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet* **2009**, *10*, 821-832, doi:10.1038/nrg2665.

107. Kim, Y.; Nam, H.J.; Lee, J.; Park, D.Y.; Kim, C.; Yu, Y.S.; Kim, D.; Park, S.W.; Bhin, J.; Hwang, D., et al. Methylation-dependent regulation of HIF-1 α stability restricts retinal and tumour angiogenesis. *Nat Commun* **2016**, *7*, 10347, doi:10.1038/ncomms10347.

108. Seo, K.S.; Park, J.H.; Heo, J.Y.; Jing, K.; Han, J.; Min, K.N.; Kim, C.; Koh, G.Y.; Lim, K.; Kang, G.Y., et al. SIRT2 regulates tumour hypoxia response by promoting HIF-1 α hydroxylation. *Oncogene* **2015**, *34*, 1354-1362, doi:10.1038/onc.2014.76.

109. Olmos, G.; Arenas, M.I.; Bienes, R.; Calzada, M.J.; Aragonés, J.; Garcia-Bermejo, M.L.; Landazuri, M.O.; Lucio-Cazaña, J. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin-J(2) reveals a new pVHL-independent, lysosomal-dependent mechanism of HIF-1 α degradation. *Cell Mol Life Sci* **2009**, *66*, 2167-2180, doi:10.1007/s00018-009-0039-x.

110. Hubbi, M.E.; Hu, H.; Kshitiz; Ahmed, I.; Levchenko, A.; Semenza, G.L. Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) for lysosomal degradation. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 10703-10714, doi:10.1074/jbc.M112.414771.

111. Kietzmann, T.; Mennerich, D.; Dimova, E.Y. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4*, 11, doi:10.3389/fcell.2016.00011.

112. Niu, G.; Briggs, J.; Deng, J.; Ma, Y.; Lee, H.; Kortylewski, M.; Kujawski, M.; Kay, H.; Cress, W.D.; Jove, R., et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol Cancer Res* **2008**, *6*, 1099-1105, doi:10.1158/1541-7786.Mcr-07-2177.

113. Semenza, G.L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 3664-3671, doi:10.1172/jci67230.

114. Zhong, H.; Chiles, K.; Feldser, D.; Laughner, E.; Hanrahan, C.; Georgescu, M.M.; Simons, J.W.; Semenza, G.L. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* **2000**, *60*, 1541-1545.

115. Laughner, E.; Taghavi, P.; Chiles, K.; Mahon, P.C.; Semenza, G.L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* **2001**, *21*, 3995-4004, doi:10.1128/mcb.21.12.3995-4004.2001.

116. Koshikawa, N.; Hayashi, J.; Nakagawara, A.; Takenaga, K. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 33185-33194, doi:10.1074/jbc.M109.054221.

117. Gao, N.; Ding, M.; Zheng, J.Z.; Zhang, Z.; Leonard, S.S.; Liu, K.J.; Shi, X.; Jiang, B.H. Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 31963-31971, doi:10.1074/jbc.M200082200.

118. Yuan, G.; Nanduri, J.; Khan, S.; Semenza, G.L.; Prabhakar, N.R. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol* **2008**, *217*, 674-685, doi:10.1002/jcp.21537.

119. Haddad, J.J.; Saadé, N.E.; Safieh-Garabedian, B. Redox regulation of TNF- α biosynthesis: augmentation by irreversible inhibition of gamma-glutamylcysteine synthetase

and the involvement of an IkappaB-alpha/NF-kappaB-independent pathway in alveolar epithelial cells. *Cell Signal* **2002**, *14*, 211-218, doi:10.1016/s0898-6568(01)00233-9.

120. Hudson, C.C.; Liu, M.; Chiang, G.G.; Otterness, D.M.; Loomis, D.C.; Kaper, F.; Giaccia, A.J.; Abraham, R.T. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 7004-7014, doi:10.1128/mcb.22.20.7004-7014.2002.

121. Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochem Soc Trans* **2011**, *39*, 1-13, doi:10.1042/bst0390001.

122. Yu, L.; Lu, M.; Jia, D.; Ma, J.; Ben-Jacob, E.; Levine, H.; Kaiparettu, B.A.; Onuchic, J.N. Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Res* **2017**, *77*, 1564-1574, doi:10.1158/0008-5472.Can-16-2074.

123. Osada-Oka, M.; Hashiba, Y.; Akiba, S.; Imaoka, S.; Sato, T. Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha under hypoxia: contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization. *FEBS Lett* **2010**, *584*, 3073-3079, doi:10.1016/j.febslet.2010.05.046.

124. Shackelford, D.B.; Vasquez, D.S.; Corbeil, J.; Wu, S.; Leblanc, M.; Wu, C.L.; Vera, D.R.; Shaw, R.J. mTOR and HIF-1alpha-mediated tumor metabolism in an LKB1 mouse model of Peutz-Jeghers syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 11137-11142, doi:10.1073/pnas.0900465106.

125. Faubert, B.; Boily, G.; Izreig, S.; Griss, T.; Samborska, B.; Dong, Z.; Dupuy, F.; Chambers, C.; Fuerth, B.J.; Viollet, B., et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* **2013**, *17*, 113-124, doi:10.1016/j.cmet.2012.12.001.

126. Rabinovitch, R.C.; Samborska, B.; Faubert, B.; Ma, E.H.; Gravel, S.P.; Andrzejewski, S.; Raissi, T.C.; Pause, A.; St-Pierre, J.; Jones, R.G. AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell Rep* **2017**, *21*, 1-9, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.026.

127. Jung, S.N.; Yang, W.K.; Kim, J.; Kim, H.S.; Kim, E.J.; Yun, H.; Park, H.; Kim, S.S.; Choe, W.; Kang, I., et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 713-721, doi:10.1093/carcin/bgn032.

128. Yan, M.; Gingras, M.-C.; Dunlop, E.A.; Nouët, Y.; Dupuy, F.; Jalali, Z.; Possik, E.; Coull, B.J.; Kharitidi, D.; Dydensborg, A.B., et al. The tumor suppressor folliculin regulates AMPK-dependent metabolic transformation. *The Journal of Clinical Investigation* **2014**, *124*, 2640-2650, doi:10.1172/JCI71749.

129. Iommarini, L.; Ghelli, A.; Gasparre, G.; Porcelli, A.M. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2017**, *1858*, 582-590, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.006>.

130. Yoon, D.; Pastore, Y.D.; Divoky, V.; Liu, E.; Mlodnicka, A.E.; Rainey, K.; Ponka, P.; Semenza, G.L.; Schumacher, A.; Prchal, J.T. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 25703-25711, doi:10.1074/jbc.M602329200.

131. Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J.M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M.; Neeman, M.; Bono, F.; Abramovitch, R.; Maxwell, P., et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **1998**, *394*, 485-490, doi:10.1038/28867.

132. Chen, E.Y.; Fujinaga, M.; Giaccia, A.J. Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. *Teratology* **1999**, *60*, 215-225, doi:10.1002/(sici)1096-9926(199910)60:4<215::Aid-tera6>3.0.Co;2-2.

133. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* **2004**, *9 Suppl 5*, 10-17, doi:10.1634/theoncologist.9-90005-10.

134. Richard, D.E.; Berra, E.; Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 26765-26771, doi:10.1074/jbc.M003325200.
135. Shi, Y.H.; Fang, W.G. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol* **2004**, *10*, 1082-1087, doi:10.3748/wjg.v10.i8.1082.
136. Zagzag, D.; Zhong, H.; Scalzitti, J.M.; Laughner, E.; Simons, J.W.; Semenza, G.L. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* **2000**, *88*, 2606-2618.
137. Zhang, H.; Gao, P.; Fukuda, R.; Kumar, G.; Krishnamachary, B.; Zeller, K.I.; Dang, C.V.; Semenza, G.L. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 407-420, doi:10.1016/j.ccr.2007.04.001.
138. Krick, S.; Eul, B.G.; Hänze, J.; Savai, R.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Rose, F. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2005**, *32*, 395-403, doi:10.1165/rcmb.2004-0314OC.
139. Cramer, T.; Yamanishi, Y.; Clausen, B.E.; Förster, I.; Pawlinski, R.; Mackman, N.; Haase, V.H.; Jaenisch, R.; Corr, M.; Nizet, V., et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* **2003**, *112*, 645-657, doi:10.1016/s0092-8674(03)00154-5.
140. Oda, T.; Hirota, K.; Nishi, K.; Takabuchi, S.; Oda, S.; Yamada, H.; Arai, T.; Fukuda, K.; Kita, T.; Adachi, T., et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* **2006**, *291*, C104-113, doi:10.1152/ajpcell.00614.2005.
141. Ho, T.K.; Rajkumar, V.; Ponticos, M.; Leoni, P.; Black, D.C.; Abraham, D.J.; Baker, D.M. Increased endogenous angiogenic response and hypoxia-inducible factor-1alpha in human critical limb ischemia. *J Vasc Surg* **2006**, *43*, 125-133, doi:10.1016/j.jvs.2005.08.042.
142. Rebar, E.J. Development of pro-angiogenic engineered transcription factors for the treatment of cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs* **2004**, *13*, 829-839, doi:10.1517/13543784.13.7.829.
143. Osawa, M.; Hanada, K.; Hamada, H.; Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **1996**, *273*, 242-245, doi:10.1126/science.273.5272.242.
144. Kiel, M.J.; Yilmaz, O.H.; Iwashita, T.; Yilmaz, O.H.; Terhorst, C.; Morrison, S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **2005**, *121*, 1109-1121, doi:10.1016/j.cell.2005.05.026.
145. Goodell, M.A.; Brose, K.; Paradis, G.; Conner, A.S.; Mulligan, R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **1996**, *183*, 1797-1806, doi:10.1084/jem.183.4.1797.
146. Wilson, A.; Laurenti, E.; Oser, G.; van der Wath, R.C.; Blanco-Bose, W.; Jaworski, M.; Offner, S.; Dunant, C.F.; Eshkind, L.; Bockamp, E., et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **2008**, *135*, 1118-1129, doi:10.1016/j.cell.2008.10.048.
147. Blanpain, C.; Mohrin, M.; Sotiropoulou, P.A.; Passegué, E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 16-29, doi:10.1016/j.stem.2010.12.012.
148. Branzei, D.; Foiani, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 297-308, doi:10.1038/nrm2351.
149. Rossi, D.J.; Bryder, D.; Seita, J.; Nussenzweig, A.; Hoeijmakers, J.; Weissman, I.L. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **2007**, *447*, 725-729, doi:10.1038/nature05862.
150. Rossi, D.J.; Jamieson, C.H.; Weissman, I.L. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* **2008**, *132*, 681-696, doi:10.1016/j.cell.2008.01.036.
151. Dello Sbarba, P.; Cipolleschi, M.G.; Olivotto, M. Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Exp Hematol* **1987**, *15*, 137-142.

152. Calvi, L.M.; Adams, G.B.; Weibrecht, K.W.; Weber, J.M.; Olson, D.P.; Knight, M.C.; Martin, R.P.; Schipani, E.; Divieti, P.; Bringhurst, F.R., et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **2003**, *425*, 841-846, doi:10.1038/nature02040.
153. Zhang, J.; Niu, C.; Ye, L.; Huang, H.; He, X.; Tong, W.G.; Ross, J.; Haug, J.; Johnson, T.; Feng, J.Q., et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **2003**, *425*, 836-841, doi:10.1038/nature02041.
154. Arai, F.; Hirao, A.; Ohmura, M.; Sato, H.; Matsuoka, S.; Takubo, K.; Ito, K.; Koh, G.Y.; Suda, T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **2004**, *118*, 149-161, doi:10.1016/j.cell.2004.07.004.
155. Chow, D.C.; Wenning, L.A.; Miller, W.M.; Papoutsakis, E.T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* **2001**, *81*, 685-696, doi:10.1016/s0006-3495(01)75733-5.
156. Harrison, J.S.; Rameshwar, P.; Chang, V.; Bandari, P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* **2002**, *99*, 394, doi:10.1182/blood.v99.1.394.
157. Lévesque, J.P.; Winkler, I.G.; Hendy, J.; Williams, B.; Helwani, F.; Barbier, V.; Nowlan, B.; Nilsson, S.K. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1954-1965, doi:10.1634/stemcells.2006-0688.
158. Kubota, Y.; Takubo, K.; Suda, T. Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *366*, 335-339, doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.086.
159. Parmar, K.; Mauch, P.; Vergilio, J.A.; Sackstein, R.; Down, J.D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 5431-5436, doi:10.1073/pnas.0701152104.
160. Winkler, I.G.; Barbier, V.; Wadley, R.; Zannettino, A.C.; Williams, S.; Lévesque, J.P. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood* **2010**, *116*, 375-385, doi:10.1182/blood-2009-07-233437.
161. Jang, Y.-Y.; Sharkis, S.J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **2007**, *110*, 3056-3063, doi:10.1182/blood-2007-05-087759.
162. Simsek, T.; Kocabas, F.; Zheng, J.; Deberardinis, R.J.; Mahmoud, A.I.; Olson, E.N.; Schneider, J.W.; Zhang, C.C.; Sadek, H.A. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 380-390, doi:10.1016/j.stem.2010.07.011.
163. Takubo, K.; Goda, N.; Yamada, W.; Iriuchishima, H.; Ikeda, E.; Kubota, Y.; Shima, H.; Johnson, R.S.; Hirao, A.; Suematsu, M., et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 391-402, doi:10.1016/j.stem.2010.06.020.
164. Shima, H.; Takubo, K.; Tago, N.; Iwasaki, H.; Arai, F.; Takahashi, T.; Suda, T. Acquisition of G₀ state by CD34-positive cord blood cells after bone marrow transplantation. *Experimental hematology* **2010**, *38*, 1231-1240, doi:10.1016/j.exphem.2010.08.004.
165. Sugiyama, T.; Kohara, H.; Noda, M.; Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **2006**, *25*, 977-988, doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016.
166. Lo Celso, C.; Fleming, H.E.; Wu, J.W.; Zhao, C.X.; Miake-Lye, S.; Fujisaki, J.; Côté, D.; Rowe, D.W.; Lin, C.P.; Scadden, D.T. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* **2009**, *457*, 92-96, doi:10.1038/nature07434.
167. Xie, Y.; Yin, T.; Wiegraebe, W.; He, X.C.; Miller, D.; Stark, D.; Perko, K.; Alexander, R.; Schwartz, J.; Grindley, J.C., et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **2009**, *457*, 97-101, doi:10.1038/nature07639.

168. Cipolleschi, M.G.; Dello Sbarba, P.; Olivotto, M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* **1993**, *82*, 2031-2037.
169. Danet, G.H.; Pan, Y.; Luongo, J.L.; Bonnet, D.A.; Simon, M.C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* **2003**, *112*, 126-135, doi:10.1172/jci17669.
170. Ivanovic, Z.; Hermitte, F.; Brunet de la Grange, P.; Dazey, B.; Belloc, F.; Lacombe, F.; Vezon, G.; Praloran, V. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells* **2004**, *22*, 716-724, doi:10.1634/stemcells.22-5-716.
171. Hermitte, F.; Brunet de la Grange, P.; Belloc, F.; Praloran, V.; Ivanovic, Z. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G₀ return of dividing CD34⁺ cells. *Stem Cells* **2006**, *24*, 65-73, doi:10.1634/stemcells.2004-0351.
172. Krishnamurthy, P.; Ross, D.D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K.E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B.P.; Schuetz, J.D. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 24218-24225, doi:10.1074/jbc.M313599200.
173. Eliasson, P.; Rehn, M.; Hammar, P.; Larsson, P.; Sirenko, O.; Flippin, L.A.; Cammenga, J.; Jönsson, J.I. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol* **2010**, *38*, 301-310.e302, doi:10.1016/j.exphem.2010.01.005.
174. Miharada, K.; Karlsson, G.; Rehn, M.; Rörby, E.; Siva, K.; Cammenga, J.; Karlsson, S. Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 330-344, doi:10.1016/j.stem.2011.07.016.
175. Adelman, D.M.; Maltepe, E.; Simon, M.C. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev* **1999**, *13*, 2478-2483, doi:10.1101/gad.13.19.2478.
176. Kojima, H.; Gu, H.; Nomura, S.; Caldwell, C.C.; Kobata, T.; Carmeliet, P.; Semenza, G.L.; Sitkovsky, M.V. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 2170, doi:10.1073/pnas.052706699.
177. Trumpp, A.; Essers, M.; Wilson, A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10*, 201-209, doi:10.1038/nri2726.
178. Foudi, A.; Hochedlinger, K.; Van Buren, D.; Schindler, J.W.; Jaenisch, R.; Carey, V.; Hock, H. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* **2009**, *27*, 84-90, doi:10.1038/nbt.1517.
179. Ito, K.; Hirao, A.; Arai, F.; Matsuoka, S.; Takubo, K.; Hamaguchi, I.; Nomiyama, K.; Hosokawa, K.; Sakurada, K.; Nakagata, N., et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **2004**, *431*, 997-1002, doi:10.1038/nature02989.
180. Tothova, Z.; Kollipara, R.; Huntly, B.J.; Lee, B.H.; Castrillon, D.H.; Cullen, D.E.; McDowell, E.P.; Lazo-Kallanian, S.; Williams, I.R.; Sears, C., et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **2007**, *128*, 325-339, doi:10.1016/j.cell.2007.01.003.
181. Hamanaka, R.B.; Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* **2009**, *21*, 894-899, doi:10.1016/j.ceb.2009.08.005.
182. Martin, C.M.; Ferdous, A.; Gallardo, T.; Humphries, C.; Sadek, H.; Caprioli, A.; Garcia, J.A.; Szweda, L.I.; Garry, M.G.; Garry, D.J. Hypoxia-inducible factor-2 α transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ Res* **2008**, *102*, 1075-1081, doi:10.1161/circresaha.107.161729.
183. Ceradini, D.J.; Kulkarni, A.R.; Callaghan, M.J.; Tepper, O.M.; Bastidas, N.; Kleinman, M.E.; Capla, J.M.; Galiano, R.D.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C. Progenitor cell trafficking is

regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* **2004**, *10*, 858-864, doi:10.1038/nm1075.

184. Staller, P.; Sulitkova, J.; Lisztwan, J.; Moch, H.; Oakeley, E.J.; Krek, W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **2003**, *425*, 307-311, doi:10.1038/nature01874.

185. Cipolleschi, M.G.; D'Ippolito, G.; Bernabei, P.A.; Caporale, R.; Nannini, R.; Mariani, M.; Fabbiani, M.; Rossi-Ferrini, P.; Olivotto, M.; Dello Sbarba, P. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol* **1997**, *25*, 1187-1194.

186. Cipolleschi, M.G.; Rovida, E.; Ivanovic, Z.; Praloran, V.; Olivotto, M.; Dello Sbarba, P. The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia* **2000**, *14*, 735-739, doi:10.1038/sj.leu.2401744.

187. Eliasson, P.; Karlsson, R.; Jönsson, J.-I. Hypoxia Expands Primitive Hematopoietic Progenitor Cells from Mouse Bone Marrow During In Vitro Culture and Preserves the Colony-Forming Ability. *Journal of Stem Cells* **2006**, *1*, 247-257.

188. Ivanović, Z.; Bartolozzi, B.; Bernabei, P.A.; Cipolleschi, M.G.; Rovida, E.; Milenković, P.; Praloran, V.; Dello Sbarba, P. Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *Br J Haematol* **2000**, *108*, 424-429, doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01842.x.

189. Ivanović, Z.; Dello Sbarba, P.; Trimoreau, F.; Faucher, J.L.; Praloran, V. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* **2000**, *40*, 1482-1488, doi:10.1046/j.1537-2995.2000.40121482.x.

190. Shima, H.; Takubo, K.; Iwasaki, H.; Yoshihara, H.; Gomei, Y.; Hosokawa, K.; Arai, F.; Takahashi, T.; Suda, T. Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, *378*, 467-472, doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.056.

191. Thompson, J.E.; Conlon, J.P.; Yang, X.; Sanchez, P.V.; Carroll, M. Enhanced growth of myelodysplastic colonies in hypoxic conditions. *Experimental hematology* **2007**, *35*, 21-31, doi:10.1016/j.exphem.2006.08.017.

192. Masala, E.; Valencia-Martinez, A.; Pillozzi, S.; Rondelli, T.; Brogi, A.; Sanna, A.; Gozzini, A.; Arcangeli, A.; Sbarba, P.D.; Santini, V. Severe hypoxia selects hematopoietic progenitors with stem cell potential from primary Myelodysplastic syndrome bone marrow cell cultures. *Oncotarget* **2018**, *9*, 10561-10571, doi:10.18632/oncotarget.24302.

193. Tong, H.; Hu, C.; Zhuang, Z.; Wang, L.; Jin, J. Hypoxia-inducible factor-1 α expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* **2012**, *53*, 2412-2418, doi:10.3109/10428194.2012.696637.

194. Liang, H.-W.; Luo, B.; Du, L.-H.; He, R.-Q.; Chen, G.; Peng, Z.-G.; Ma, J. Expression significance and potential mechanism of hypoxia-inducible factor 1 alpha in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Med* **2019**, *8*, 6021-6035, doi:10.1002/cam4.2447.

195. Du L, H.R., Jiang Y et al. mRNA expression level and clinical value of hypoxia

inducible factor 1 alpha in patients with myelodysplastic syndromes : a

fluorescence quantitative real-time RT-PCR study. *Int J Clin Exp Pathol* **2017**.

196. Mpakou, V.; Spathis, A.; Bouchla, A.; Tsakiraki, Z.; Kontsioti, F.; Papageorgiou, S.; Bazani, E.; Gkontopoulos, K.; Thomopoulos, T.; Glezou, I., et al. Upregulated hypoxia inducible factor 1 α signaling pathway in high risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients is associated with better response to 5-azacytidine-data from the Hellenic myelodysplastic syndrome study group. *Hematol Oncol* **2021**, *39*, 231-242, doi:10.1002/hon.2834.

197. Eltzschig, H.K.; Abdulla, P.; Hoffman, E.; Hamilton, K.E.; Daniels, D.; Schönfeld, C.; Löffler, M.; Reyes, G.; Duszenko, M.; Karhausen, J., et al. HIF-1-dependent repression of

equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med* **2005**, *202*, 1493-1505, doi:10.1084/jem.20050177.

198. Hayashi, Y.; Zhang, Y.; Yokota, A.; Yan, X.; Liu, J.; Choi, K.; Li, B.; Sashida, G.; Peng, Y.; Xu, Z., et al. Pathobiological Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Discov* **2018**, *8*, 1438-1457, doi:10.1158/2159-8290.Cd-17-1203.

199. Orford, K.W.; Scadden, D.T. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* **2008**, *9*, 115-128, doi:10.1038/nrg2269.

200. Takubo, K.; Nagamatsu, G.; Kobayashi, C.I.; Nakamura-Ishizu, A.; Kobayashi, H.; Ikeda, E.; Goda, N.; Rahimi, Y.; Johnson, R.S.; Soga, T., et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 49-61, doi:10.1016/j.stem.2012.10.011.

201. Folmes, C.D.; Dzeja, P.P.; Nelson, T.J.; Terzic, A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 596-606, doi:10.1016/j.stem.2012.10.002.

202. Eliasson, P.; Jönsson, J.I. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* **2010**, *222*, 17-22, doi:10.1002/jcp.21908.

203. Suda, T.; Takubo, K.; Semenza, G.L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 298-310, doi:10.1016/j.stem.2011.09.010.

204. 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. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature cell biology* **2013**, *15*, 533-543, doi:10.1038/ncb2730.

205. Sandau, K.B.; Zhou, J.; Kietzmann, T.; Brüne, B. Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferrioxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 39805-39811, doi:10.1074/jbc.M107689200.

206. Haerberle, H.A.; Dürrstein, C.; Rosenberger, P.; Hosakote, Y.M.; Kuhlicke, J.; Kempf, V.A.J.; Garofalo, R.P.; Eltzschig, H.K. Oxygen-independent stabilization of hypoxia inducible factor (HIF)-1 during RSV infection. *PLoS One* **2008**, *3*, e3352-e3352, doi:10.1371/journal.pone.0003352.

207. Norddahl, G.L.; Pronk, C.J.; Wahlestedt, M.; Sten, G.; Nygren, J.M.; Ugale, A.; Sigvardsson, M.; Bryder, D. Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 499-510, doi:10.1016/j.stem.2011.03.009.

208. Kocabas, F.; Zheng, J.; Thet, S.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; DeBerardinis, R.J.; Zhang, C.; Sadek, H.A. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood* **2012**, *120*, 4963-4972, doi:10.1182/blood-2012-05-432260.

209. Iyer, N.V.; Kotch, L.E.; Agani, F.; Leung, S.W.; Laughner, E.; Wenger, R.H.; Gassmann, M.; Gearhart, J.D.; Lawler, A.M.; Yu, A.Y., et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **1998**, *12*, 149-162, doi:10.1101/gad.12.2.149.

210. Semenza, G.L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* **2009**, *19*, 12-16, doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.009.

211. Noguchi, T.; Inoue, H.; Tanaka, T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 13807-13812.

212. Christofk, H.R.; Vander Heiden, M.G.; Harris, M.H.; Ramanathan, A.; Gerszten, R.E.; Wei, R.; Fleming, M.D.; Schreiber, S.L.; Cantley, L.C. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **2008**, *452*, 230-233, doi:10.1038/nature06734.

213. Luo, W.; Hu, H.; Chang, R.; Zhong, J.; Knabel, M.; O'Meally, R.; Cole, R.N.; Pandey, A.; Semenza, G.L. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **2011**, *145*, 732-744, doi:10.1016/j.cell.2011.03.054.
214. Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J.W.; Shimoda, L.; Dang, C.V.; Semenza, G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **2007**, *129*, 111-122, doi:10.1016/j.cell.2007.01.047.
215. Wu, M.; Kwon, H.Y.; Rattis, F.; Blum, J.; Zhao, C.; Ashkenazi, R.; Jackson, T.L.; Gaiano, N.; Oliver, T.; Reya, T. Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 541-554, doi:10.1016/j.stem.2007.08.009.
216. Carracedo, A.; Cantley, L.C.; Pandolfi, P.P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 227-232, doi:10.1038/nrc3483.
217. Takahashi, S.; Tanaka, T.; Sakai, J. New therapeutic target for metabolic syndrome: PPARdelta. *Endocr J* **2007**, *54*, 347-357, doi:10.1507/endocrj.kr-99.
218. Ito, K.; Carracedo, A.; Weiss, D.; Arai, F.; Ala, U.; Avigan, D.E.; Schafer, Z.T.; Evans, R.M.; Suda, T.; Lee, C.H., et al. A PML-PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* **2012**, *18*, 1350-1358, doi:10.1038/nm.2882.
219. Ito, K.; Bernardi, R.; Morotti, A.; Matsuoka, S.; Saglio, G.; Ikeda, Y.; Rosenblatt, J.; Avigan, D.E.; Teruya-Feldstein, J.; Pandolfi, P.P. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* **2008**, *453*, 1072-1078, doi:10.1038/nature07016.
220. Vernier, M.; Bourdeau, V.; Gaumont-Leclerc, M.-F.; Moiseeva, O.; Bégin, V.; Saad, F.; Mes-Masson, A.-M.; Ferbeyre, G. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* **2011**, *25*, 41-50, doi:10.1101/gad.1975111.
221. Sharpless, N.E.; DePinho, R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 703-713, doi:10.1038/nrm2241.
222. Attema, J.L.; Pronk, C.J.H.; Norddahl, G.L.; Nygren, J.M.; Bryder, D. Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16INK4A-mediated senescence. *Oncogene* **2009**, *28*, 2238-2243, doi:10.1038/onc.2009.94.
223. Bondar, T.; Medzhitov, R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 309-322, doi:10.1016/j.stem.2010.03.002.
224. Morrison, S.J.; Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **2006**, *441*, 1068-1074, doi:10.1038/nature04956.
225. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809.
226. Xu, X.; Duan, S.; Yi, F.; Ocampo, A.; Liu, G.H.; Izpisua Belmonte, J.C. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab* **2013**, *18*, 325-332, doi:10.1016/j.cmet.2013.06.005.
227. Facucho-Oliveira, J.M.; Alderson, J.; Spikings, E.C.; Egginton, S.; St. John, J.C. Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* **2007**, *120*, 4025, doi:10.1242/jcs.016972.
228. Suhr, S.T.; Chang, E.A.; Tjong, J.; Alcasid, N.; Perkins, G.A.; Goissis, M.D.; Ellisman, M.H.; Perez, G.I.; Cibelli, J.B. Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS One* **2010**, *5*, e14095, doi:10.1371/journal.pone.0014095.
229. Yu, W.M.; Liu, X.; Shen, J.; Jovanovic, O.; Pohl, E.E.; Gerson, S.L.; Finkel, T.; Broxmeyer, H.E.; Qu, C.K. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 62-74, doi:10.1016/j.stem.2012.11.022.
230. Owusu-Ansah, E.; Banerjee, U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* **2009**, *461*, 537-541, doi:10.1038/nature08313.

231. Ito, K.; Hirao, A.; Arai, F.; Takubo, K.; Matsuoka, S.; Miyamoto, K.; Ohmura, M.; Naka, K.; Hosokawa, K.; Ikeda, Y., et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **2006**, *12*, 446-451, doi:10.1038/nm1388.
232. Le Belle, J.E.; Orozco, N.M.; Paucar, A.A.; Saxe, J.P.; Mottahedeh, J.; Pyle, A.D.; Wu, H.; Kornblum, H.I. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 59-71, doi:10.1016/j.stem.2010.11.028.
233. Asai, T.; Liu, Y.; Bae, N.; Nimer, S.D. The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 2215-2221, doi:10.1002/jcp.22561.
234. Hoesel, B.; Schmid, J.A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* **2013**, *12*, 86, doi:10.1186/1476-4598-12-86.
235. Doyle, K.; Fitzpatrick, F.A. Redox signaling, alkylation (carbonylation) of conserved cysteines inactivates class I histone deacetylases 1, 2, and 3 and antagonizes their transcriptional repressor function. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 17417-17424, doi:10.1074/jbc.M109.089250.
236. Joshi, A.; Kundu, M. Mitophagy in hematopoietic stem cells: the case for exploration. *Autophagy* **2013**, *9*, 1737-1749, doi:10.4161/auto.26681.
237. Taniguchi, Ishikawa, E.; Gonzalez-Nieto, D.; Ghiaur, G.; Dunn, S.K.; Ficker, A.M.; Murali, B.; Madhu, M.; Gutstein, D.E.; Fishman, G.I.; Barrio, L.C., et al. Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 9071-9076, doi:10.1073/pnas.1120358109.
238. Maryanovich, M.; Oberkovitz, G.; Niv, H.; Vorobiyov, L.; Zaltsman, Y.; Brenner, O.; Lapidot, T.; Jung, S.; Gross, A. The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **2012**, *14*, 535-541, doi:10.1038/ncb2468.
239. Maryanovich, M.; Gross, A. A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol* **2013**, *23*, 129-134, doi:10.1016/j.tcb.2012.09.007.
240. Opferman, J.T.; Iwasaki, H.; Ong, C.C.; Suh, H.; Mizuno, S.; Akashi, K.; Korsmeyer, S.J. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* **2005**, *307*, 1101-1104, doi:10.1126/science.1106114.
241. Chen, Y.B.; Aon, M.A.; Hsu, Y.T.; Soane, L.; Teng, X.; McCaffery, J.M.; Cheng, W.C.; Qi, B.; Li, H.; Alavian, K.N., et al. Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *J Cell Biol* **2011**, *195*, 263-276, doi:10.1083/jcb.201108059.
242. Alavian, K.N.; Li, H.; Collis, L.; Bonanni, L.; Zeng, L.; Sacchetti, S.; Lazrove, E.; Nabili, P.; Flaherty, B.; Graham, M., et al. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nature cell biology* **2011**, *13*, 1224-1233, doi:10.1038/ncb2330.
243. Perciavalle, R.M.; Stewart, D.P.; Koss, B.; Lynch, J.; Milasta, S.; Bathina, M.; Temirov, J.; Cleland, M.M.; Pelletier, S.; Schuetz, J.D., et al. Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol* **2012**, *14*, 575-583, doi:10.1038/ncb2488.
244. Laurenti, E.; Wilson, A.; Trumpp, A. Myc's other life: stem cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* **2009**, *21*, 844-854, doi:10.1016/j.ceb.2009.09.006.
245. Matsuoka, S.; Oike, Y.; Onoyama, I.; Iwama, A.; Arai, F.; Takubo, K.; Mashimo, Y.; Oguro, H.; Nitta, E.; Ito, K., et al. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev* **2008**, *22*, 986-991, doi:10.1101/gad.1621808.
246. Reavie, L.; Della Gatta, G.; Crusio, K.; Aranda-Orgilles, B.; Buckley, S.M.; Thompson, B.; Lee, E.; Gao, J.; Bredemeyer, A.L.; Helmink, B.A., et al. Regulation of hematopoietic stem cell differentiation by a single ubiquitin ligase-substrate complex. *Nat Immunol* **2010**, *11*, 207-215, doi:10.1038/ni.1839.

247. Gan, B.; Hu, J.; Jiang, S.; Liu, Y.; Sahin, E.; Zhuang, L.; Fletcher-Sananikone, E.; Colla, S.; Wang, Y.A.; Chin, L., et al. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* **2010**, *468*, 701-704, doi:10.1038/nature09595.
248. Sahin, E.; Colla, S.; Liesa, M.; Moslehi, J.; Müller, F.L.; Guo, M.; Cooper, M.; Kotton, D.; Fabian, A.J.; Walkey, C., et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* **2011**, *470*, 359-365, doi:10.1038/nature09787.
249. Chandel, N.S.; Jasper, H.; Ho, T.T.; Passequé, E. Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing. *Nat Cell Biol* **2016**, *18*, 823-832, doi:10.1038/ncb3385.
250. Ito, K.; Suda, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 243-256, doi:10.1038/nrm3772.
251. Shyh-Chang, N.; Daley, G.Q.; Cantley, L.C. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* **2013**, *140*, 2535-2547, doi:10.1242/dev.091777.
252. Mohrin, M.; Shin, J.; Liu, Y.; Brown, K.; Luo, H.; Xi, Y.; Haynes, C.M.; Chen, D. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science* **2015**, *347*, 1374, doi:10.1126/science.aaa2361.
253. Mohrin, M.; Widjaja, A.; Liu, Y.; Luo, H.; Chen, D. The mitochondrial unfolded protein response is activated upon hematopoietic stem cell exit from quiescence. *Aging Cell* **2018**, *17*, e12756, doi:10.1111/ace1.12756.
254. Cimmino, L.; Dolgalev, I.; Wang, Y.; Yoshimi, A.; Martin, G.H.; Wang, J.; Ng, V.; Xia, B.; Witkowski, M.T.; Mitchell-Flack, M., et al. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell* **2017**, *170*, 1079-1095.e1020, doi:10.1016/j.cell.2017.07.032.
255. Figueroa, M.E.; Abdel-Wahab, O.; Lu, C.; Ward, P.S.; Patel, J.; Shih, A.; Li, Y.; Bhagwat, N.; Vasanthakumar, A.; Fernandez, H.F., et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **2010**, *18*, 553-567, doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015.
256. Raffel, S.; Falcone, M.; Kneisel, N.; Hansson, J.; Wang, W.; Lutz, C.; Bullinger, L.; Poschet, G.; Nonnenmacher, Y.; Barnert, A., et al. BCAT1 restricts α KG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. *Nature* **2017**, *551*, 384-388, doi:10.1038/nature24294.
257. Tefferi, A.; Lasho, T.L.; Abdel-Wahab, O.; Guglielmelli, P.; Patel, J.; Caramazza, D.; Pieri, L.; Finke, C.M.; Kilpivaara, O.; Wadleigh, M., et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* **2010**, *24*, 1302-1309, doi:10.1038/leu.2010.113.
258. Aguilo, F.; Avagyan, S.; Labar, A.; Sevilla, A.; Lee, D.F.; Kumar, P.; Lemischka, I.R.; Zhou, B.Y.; Snoeck, H.W. Prdm16 is a physiologic regulator of hematopoietic stem cells. *Blood* **2011**, *117*, 5057-5066, doi:10.1182/blood-2010-08-300145.
259. Luchsinger, L.L.; de Almeida, M.J.; Corrigan, D.J.; Mumau, M.; Snoeck, H.W. Mitofusin 2 maintains haematopoietic stem cells with extensive lymphoid potential. *Nature* **2016**, *529*, 528-531, doi:10.1038/nature16500.
260. Umemoto, T.; Hashimoto, M.; Matsumura, T.; Nakamura-Ishizu, A.; Suda, T. Ca(2+)-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **2018**, *215*, 2097-2113, doi:10.1084/jem.20180421.
261. Laplante, M.; Sabatini, D.M. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* **2009**, *122*, 3589, doi:10.1242/jcs.051011.
262. Song, M.S.; Salmena, L.; Pandolfi, P.P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 283-296, doi:10.1038/nrm3330.
263. Yilmaz, O.H.; Valdez, R.; Theisen, B.K.; Guo, W.; Ferguson, D.O.; Wu, H.; Morrison, S.J. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* **2006**, *441*, 475-482, doi:10.1038/nature04703.

264. Zhang, J.; Grindley, J.C.; Yin, T.; Jayasinghe, S.; He, X.C.; Ross, J.T.; Haug, J.S.; Rupp, D.; Porter-Westpfahl, K.S.; Wiedemann, L.M., et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* **2006**, *441*, 518-522, doi:10.1038/nature04747.
265. Chen, C.; Liu, Y.; Liu, R.; Ikenoue, T.; Guan, K.L.; Liu, Y.; Zheng, P. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med* **2008**, *205*, 2397-2408, doi:10.1084/jem.20081297.
266. Li, W.; Li, K.; Wei, W.; Ding, S. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell stem cell* **2013**, *13*, 270-283, doi:10.1016/j.stem.2013.08.002.
267. Kharas, M.G.; Okabe, R.; Ganis, J.J.; Gozo, M.; Khandan, T.; Paktinat, M.; Gilliland, D.G.; Gritsman, K. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* **2010**, *115*, 1406-1415, doi:10.1182/blood-2009-06-229443.
268. Juntilla, M.M.; Patil, V.D.; Calamito, M.; Joshi, R.P.; Birnbaum, M.J.; Koretzky, G.A. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood* **2010**, *115*, 4030-4038, doi:10.1182/blood-2009-09-241000.
269. Magee, J.A.; Ikenoue, T.; Nakada, D.; Lee, J.Y.; Guan, K.-L.; Morrison, S.J. Temporal changes in PTEN and mTORC2 regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia suppression. *Cell stem cell* **2012**, *11*, 415-428, doi:10.1016/j.stem.2012.05.026.
270. Brown, N.F.; Stefanovic-Racic, M.; Sipula, I.J.; Perdomo, G. The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism* **2007**, *56*, 1500-1507, doi:10.1016/j.metabol.2007.06.016.
271. Sengupta, S.; Peterson, T.R.; Laplante, M.; Oh, S.; Sabatini, D.M. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* **2010**, *468*, 1100-1104, doi:10.1038/nature09584.
272. Luo, Z.; Zang, M.; Guo, W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol* **2010**, *6*, 457-470, doi:10.2217/fon.09.174.
273. Gurumurthy, S.; Xie, S.Z.; Alagesan, B.; Kim, J.; Yusuf, R.Z.; Saez, B.; Tzatsos, A.; Ozsolak, F.; Milos, P.; Ferrari, F., et al. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* **2010**, *468*, 659-663, doi:10.1038/nature09572.
274. Nakada, D.; Saunders, T.L.; Morrison, S.J. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* **2010**, *468*, 653-658, doi:10.1038/nature09571.
275. Egan, D.; Kim, J.; Shaw, R.J.; Guan, K.L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **2011**, *7*, 643-644, doi:10.4161/auto.7.6.15123.
276. Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **2011**, *13*, 132-141, doi:10.1038/ncb2152.
277. Passegué, E.; Jamieson, C.H.; Ailles, L.E.; Weissman, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100 Suppl 1*, 11842-11849, doi:10.1073/pnas.2034201100.
278. Jordan, C.T.; Guzman, M.L.; Noble, M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* **2006**, *355*, 1253-1261, doi:10.1056/NEJMra061808.
279. Lagadinou, E.D.; Sach, A.; Callahan, K.; Rossi, R.M.; Neering, S.J.; Minhajuddin, M.; Ashton, J.M.; Pei, S.; Grose, V.; O'Dwyer, K.M., et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell stem cell* **2013**, *12*, 329-341, doi:10.1016/j.stem.2012.12.013.
280. Samudio, I.; Harmancey, R.; Fiegl, M.; Kantarjian, H.; Konopleva, M.; Korchin, B.; Kaluarachchi, K.; Bornmann, W.; Duvvuri, S.; Taegtmeier, H., et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* **2010**, *120*, 142-156, doi:10.1172/jci38942.

281. Mohrin, M.; Bourke, E.; Alexander, D.; Warr, M.R.; Barry-Holson, K.; Le Beau, M.M.; Morrison, C.G.; Passegué, E. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 174-185, doi:10.1016/j.stem.2010.06.014.
282. Callens, C.; Coulon, S.; Naudin, J.; Radford-Weiss, I.; Boissel, N.; Raffoux, E.; Wang, P.H.; Agarwal, S.; Tamouza, H.; Paubelle, E., et al. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* **2010**, *207*, 731-750, doi:10.1084/jem.20091488.
283. Parsons, D.W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J.C.; Leary, R.J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.M.; Gallia, G.L., et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **2008**, *321*, 1807-1812, doi:10.1126/science.1164382.
284. Mardis, E.R.; Ding, L.; Dooling, D.J.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Chen, K.; Koboldt, D.C.; Fulton, R.S.; Delehaunty, K.D.; McGrath, S.D., et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* **2009**, *361*, 1058-1066, doi:10.1056/NEJMoa0903840.
285. Ward, P.S.; Patel, J.; Wise, D.R.; Abdel-Wahab, O.; Bennett, B.D.; Collier, H.A.; Cross, J.R.; Fantin, V.R.; Hedvat, C.V.; Perl, A.E., et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 225-234, doi:10.1016/j.ccr.2010.01.020.
286. Wise, D.R.; Thompson, C.B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35*, 427-433, doi:10.1016/j.tibs.2010.05.003.
287. Eagle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* **1955**, *122*, 501-514, doi:10.1126/science.122.3168.501.
288. Cimmino, L.; Abdel-Wahab, O.; Levine, R.L.; Aifantis, I. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 193-204, doi:10.1016/j.stem.2011.08.007.
289. Ko, M.; Huang, Y.; Jankowska, A.M.; Pape, U.J.; Tahiliani, M.; Bandukwala, H.S.; An, J.; Lamperti, E.D.; Koh, K.P.; Ganetzky, R., et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **2010**, *468*, 839-843, doi:10.1038/nature09586.
290. Yorimitsu, T.; Klionsky, D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation* **2005**, *12*, 1542-1552, doi:10.1038/sj.cdd.4401765.
291. Hara, T.; Takamura, A.; Kishi, C.; Iemura, S.; Natsume, T.; Guan, J.L.; Mizushima, N. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* **2008**, *181*, 497-510, doi:10.1083/jcb.200712064.
292. Jung, C.H.; Jun, C.B.; Ro, S.H.; Kim, Y.M.; Otto, N.M.; Cao, J.; Kundu, M.; Kim, D.H. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 1992-2003, doi:10.1091/mbc.e08-12-1249.
293. Bjørkøy, G.; Lamark, T.; Brech, A.; Outzen, H.; Perander, M.; Overvatn, A.; Stenmark, H.; Johansen, T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **2005**, *171*, 603-614, doi:10.1083/jcb.200507002.
294. Kim, P.K.; Hailey, D.W.; Mullen, R.T.; Lippincott-Schwartz, J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 20567-20574, doi:10.1073/pnas.0810611105.
295. Pankiv, S.; Clausen, T.H.; Lamark, T.; Brech, A.; Bruun, J.A.; Outzen, H.; Øvervatn, A.; Bjørkøy, G.; Johansen, T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 24131-24145, doi:10.1074/jbc.M702824200.
296. Itakura, E.; Kishi, C.; Inoue, K.; Mizushima, N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 5360-5372, doi:10.1091/mbc.e08-01-0080.

297. Liang, X.H.; Jackson, S.; Seaman, M.; Brown, K.; Kempkes, B.; Hibshoosh, H.; Levine, B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **1999**, *402*, 672-676, doi:10.1038/45257.
298. Sun, Q.; Fan, W.; Chen, K.; Ding, X.; Chen, S.; Zhong, Q. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 19211-19216, doi:10.1073/pnas.0810452105.
299. Nice, D.C.; Sato, T.K.; Stromhaug, P.E.; Emr, S.D.; Klionsky, D.J. Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 30198-30207, doi:10.1074/jbc.M204736200.
300. Obara, K.; Sekito, T.; Niimi, K.; Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 23972-23980, doi:10.1074/jbc.M803180200.
301. Strømhaug, P.E.; Reggiori, F.; Guan, J.; Wang, C.W.; Klionsky, D.J. Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Mol Biol Cell* **2004**, *15*, 3553-3566, doi:10.1091/mbc.e04-02-0147.
302. Mizushima, N.; Kuma, A.; Kobayashi, Y.; Yamamoto, A.; Matsubae, M.; Takao, T.; Natsume, T.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **2003**, *116*, 1679-1688, doi:10.1242/jcs.00381.
303. Mizushima, N.; Noda, T.; Ohsumi, Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* **1999**, *18*, 3888-3896, doi:10.1093/emboj/18.14.3888.
304. Kundu, M.; Lindsten, T.; Yang, C.Y.; Wu, J.; Zhao, F.; Zhang, J.; Selak, M.A.; Ney, P.A.; Thompson, C.B. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **2008**, *112*, 1493-1502, doi:10.1182/blood-2008-02-137398.
305. Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **2000**, *19*, 5720-5728, doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
306. Xie, Z.; Nair, U.; Klionsky, D.J. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 3290-3298, doi:10.1091/mbc.e07-12-1292.
307. Juhasz, G.; Neufeld, T.P. Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol* **2006**, *4*, e36-e36, doi:10.1371/journal.pbio.0040036.
308. He, C.; Baba, M.; Cao, Y.; Klionsky, D.J. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Molecular biology of the cell* **2008**, *19*, 5506-5516, doi:10.1091/mbc.e08-05-0544.
309. Chan, E.Y.; Longatti, A.; McKnight, N.C.; Tooze, S.A. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* **2009**, *29*, 157-171, doi:10.1128/mcb.01082-08.
310. Young, A.R.; Chan, E.Y.; Hu, X.W.; Köchl, R.; Crawshaw, S.G.; High, S.; Hailey, D.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Tooze, S.A. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **2006**, *119*, 3888-3900, doi:10.1242/jcs.03172.
311. Kirisako, T.; Ichimura, Y.; Okada, H.; Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Ohsumi, M.; Takao, T.; Noda, T.; Ohsumi, Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology* **2000**, *151*, 263-276, doi:10.1083/jcb.151.2.263.

312. Jäger, S.; Bucci, C.; Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E.; Saftig, P.; Eskelinen, E.L. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **2004**, *117*, 4837-4848, doi:10.1242/jcs.01370.
313. Tanaka, Y.; Guhde, G.; Suter, A.; Eskelinen, E.L.; Hartmann, D.; Lüllmann-Rauch, R.; Janssen, P.M.; Blanz, J.; von Figura, K.; Saftig, P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **2000**, *406*, 902-906, doi:10.1038/35022595.
314. Tanida, I.; Minematsu-Ikeguchi, N.; Ueno, T.; Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **2005**, *1*, 84-91, doi:10.4161/auto.1.2.1697.
315. Noda, T.; Ohsumi, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 3963-3966, doi:10.1074/jbc.273.7.3963.
316. Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C., et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521-534, doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.
317. Long, X.; Ortiz-Vega, S.; Lin, Y.; Avruch, J. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 23433-23436, doi:10.1074/jbc.C500169200.
318. Sancak, Y.; Peterson, T.R.; Shaul, Y.D.; Lindquist, R.A.; Thoreen, C.C.; Bar-Peled, L.; Sabatini, D.M. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **2008**, *320*, 1496-1501, doi:10.1126/science.1157535.
319. Byfield, M.P.; Murray, J.T.; Backer, J.M. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 33076-33082, doi:10.1074/jbc.M507201200.
320. Nobukuni, T.; Joaquin, M.; Rocco, M.; Dann, S.G.; Kim, S.Y.; Gulati, P.; Byfield, M.P.; Backer, J.M.; Natt, F.; Bos, J.L., et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 14238-14243, doi:10.1073/pnas.0506925102.
321. Juhász, G.; Hill, J.H.; Yan, Y.; Sass, M.; Baehrecke, E.H.; Backer, J.M.; Neufeld, T.P. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Biol* **2008**, *181*, 655-666, doi:10.1083/jcb.200712051.
322. Schmelzle, T.; Beck, T.; Martin, D.E.; Hall, M.N. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* **2004**, *24*, 338-351, doi:10.1128/mcb.24.1.338-351.2004.
323. Budovskaya, Y.V.; Stephan, J.S.; Reggiori, F.; Klionsky, D.J.; Herman, P.K. The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 20663-20671, doi:10.1074/jbc.M400272200.
324. Budovskaya, Y.V.; Stephan, J.S.; Deminoff, S.J.; Herman, P.K. An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 13933-13938, doi:10.1073/pnas.0501046102.
325. Lum, J.J.; Bauer, D.E.; Kong, M.; Harris, M.H.; Li, C.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **2005**, *120*, 237-248, doi:10.1016/j.cell.2004.11.046.
326. Alessi, D.R.; James, S.R.; Downes, C.P.; Holmes, A.B.; Gaffney, P.R.; Reese, C.B.; Cohen, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **1997**, *7*, 261-269, doi:10.1016/s0960-9822(06)00122-9.
327. Stokoe, D.; Stephens, L.R.; Copeland, T.; Gaffney, P.R.; Reese, C.B.; Painter, G.F.; Holmes, A.B.; McCormick, F.; Hawkins, P.T. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* **1997**, *277*, 567-570, doi:10.1126/science.277.5325.567.

328. Arico, S.; Petiot, A.; Bauvy, C.; Dubbelhuis, P.F.; Meijer, A.J.; Codogno, P.; Ogier-Denis, E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 35243-35246, doi:10.1074/jbc.C100319200.
329. Manning, B.D.; Tee, A.R.; Logsdon, M.N.; Blenis, J.; Cantley, L.C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* **2002**, *10*, 151-162, doi:10.1016/s1097-2765(02)00568-3.
330. Inoki, K.; Li, Y.; Xu, T.; Guan, K.L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* **2003**, *17*, 1829-1834, doi:10.1101/gad.1110003.
331. Zhang, Y.; Gao, X.; Saucedo, L.J.; Ru, B.; Edgar, B.A.; Pan, D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* **2003**, *5*, 578-581, doi:10.1038/ncb999.
332. Long, X.; Lin, Y.; Ortiz-Vega, S.; Yonezawa, K.; Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* **2005**, *15*, 702-713, doi:10.1016/j.cub.2005.02.053.
333. Furuta, S.; Hidaka, E.; Ogata, A.; Yokota, S.; Kamata, T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* **2004**, *23*, 3898-3904, doi:10.1038/sj.onc.1207539.
334. Pattingre, S.; Bauvy, C.; Codogno, P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 16667-16674, doi:10.1074/jbc.M210998200.
335. Inoki, K.; Zhu, T.; Guan, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **2003**, *115*, 577-590, doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2.
336. Liang, J.; Shao, S.H.; Xu, Z.X.; Hennessy, B.; Ding, Z.; Larrea, M.; Kondo, S.; Dumont, D.J.; Gutterman, J.U.; Walker, C.L., et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* **2007**, *9*, 218-224, doi:10.1038/ncb1537.
337. Li, J.; Ni, M.; Lee, B.; Barron, E.; Hinton, D.R.; Lee, A.S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 1460-1471, doi:10.1038/cdd.2008.81.
338. Ding, W.X.; Ni, H.M.; Gao, W.; Yoshimori, T.; Stolz, D.B.; Ron, D.; Yin, X.M. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **2007**, *171*, 513-524, doi:10.2353/ajpath.2007.070188.
339. Ogata, M.; Hino, S.; Saito, A.; Morikawa, K.; Kondo, S.; Kanemoto, S.; Murakami, T.; Taniguchi, M.; Tanii, I.; Yoshinaga, K., et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 9220-9231, doi:10.1128/mcb.01453-06.
340. Fujita, E.; Kouroku, Y.; Isoai, A.; Kumagai, H.; Misutani, A.; Matsuda, C.; Hayashi, Y.K.; Momoi, T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet* **2007**, *16*, 618-629, doi:10.1093/hmg/ddm002.
341. Kouroku, Y.; Fujita, E.; Tanida, I.; Ueno, T.; Isoai, A.; Kumagai, H.; Ogawa, S.; Kaufman, R.J.; Kominami, E.; Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death & Differentiation* **2007**, *14*, 230-239, doi:10.1038/sj.cdd.4401984.
342. Høyer-Hansen, M.; Bastholm, L.; Szyniarowski, P.; Campanella, M.; Szabadkai, G.; Farkas, T.; Bianchi, K.; Fehrenbacher, N.; Elling, F.; Rizzuto, R., et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* **2007**, *25*, 193-205, doi:10.1016/j.molcel.2006.12.009.

343. Sakaki, K.; Wu, J.; Kaufman, R.J. Protein kinase C θ is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 15370-15380, doi:10.1074/jbc.M710209200.
344. Gozuacik, D.; Bialik, S.; Raveh, T.; Mitou, G.; Shohat, G.; Sabanay, H.; Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Kimchi, A. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 1875-1886, doi:10.1038/cdd.2008.121.
345. Azad, M.B.; Chen, Y.; Henson, E.S.; Cizeau, J.; McMillan-Ward, E.; Israels, S.J.; Gibson, S.B. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* **2008**, *4*, 195-204, doi:10.4161/auto.5278.
346. Sandoval, H.; Thiagarajan, P.; Dasgupta, S.K.; Schumacher, A.; Prchal, J.T.; Chen, M.; Wang, J. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **2008**, *454*, 232-235, doi:10.1038/nature07006.
347. Schweers, R.L.; Zhang, J.; Randall, M.S.; Loyd, M.R.; Li, W.; Dorsey, F.C.; Kundu, M.; Opferman, J.T.; Cleveland, J.L.; Miller, J.L., et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 19500-19505, doi:10.1073/pnas.0708818104.
348. Tracy, K.; Dibling, B.C.; Spike, B.T.; Knabb, J.R.; Schumacker, P.; Macleod, K.F. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 6229-6242, doi:10.1128/mcb.02246-06.
349. DeYoung, M.P.; Horak, P.; Sofer, A.; Sgroi, D.; Ellisen, L.W. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* **2008**, *22*, 239-251, doi:10.1101/gad.1617608.
350. Brugarolas, J.; Lei, K.; Hurley, R.L.; Manning, B.D.; Reiling, J.H.; Hafen, E.; Witters, L.A.; Ellisen, L.W.; Kaelin, W.G., Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* **2004**, *18*, 2893-2904, doi:10.1101/gad.1256804.
351. Papandreou, I.; Lim, A.L.; Laderoute, K.; Denko, N.C. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 1572-1581, doi:10.1038/cdd.2008.84.
352. Vasseur, S.; Afzal, S.; Tardivel-Lacombe, J.; Park, D.S.; Iovanna, J.L.; Mak, T.W. DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 1111-1116, doi:10.1073/pnas.0812745106.
353. Chen, J.L.; Lin, H.H.; Kim, K.J.; Lin, A.; Forman, H.J.; Ann, D.K. Novel roles for protein kinase C δ -dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 34432-34444, doi:10.1074/jbc.M804239200.
354. Reiling, J.H.; Hafen, E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev* **2004**, *18*, 2879-2892, doi:10.1101/gad.322704.
355. Chen, Y.; McMillan-Ward, E.; Kong, J.; Israels, S.J.; Gibson, S.B. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* **2007**, *120*, 4155-4166, doi:10.1242/jcs.011163.
356. Chen, Y.; McMillan-Ward, E.; Kong, J.; Israels, S.J.; Gibson, S.B. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 171-182, doi:10.1038/sj.cdd.4402233.
357. Narendra, D.; Tanaka, A.; Suen, D.F.; Youle, R.J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **2008**, *183*, 795-803, doi:10.1083/jcb.200809125.
358. Rodríguez-Hernández, A.; Cordero, M.D.; Salviati, L.; Artuch, R.; Pineda, M.; Briones, P.; Gómez Izquierdo, L.; Cotán, D.; Navas, P.; Sánchez-Alcázar, J.A. Coenzyme Q deficiency

triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* **2009**, *5*, 19-32, doi:10.4161/auto.5.1.7174.

359. Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A.J.A.; Mohamed, H.; Wikstrom, J.D.; Walzer, G.; Stiles, L.; Haigh, S.E.; Katz, S.; Las, G., et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **2008**, *27*, 433-446, doi:10.1038/sj.emboj.7601963.

360. Scherz-Shouval, R.; Shvets, E.; Fass, E.; Shorer, H.; Gil, L.; Elazar, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **2007**, *26*, 1749-1760, doi:10.1038/sj.emboj.7601623.

361. Huang, Q.; Wu, Y.T.; Tan, H.L.; Ong, C.N.; Shen, H.M. A novel function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress. *Cell Death Differ* **2009**, *16*, 264-277, doi:10.1038/cdd.2008.151.

362. Muñoz-Gámez, J.A.; Rodríguez-Vargas, J.M.; Quiles-Pérez, R.; Aguilar-Quesada, R.; Martín-Oliva, D.; de Murcia, G.; Menissier de Murcia, J.; Almendros, A.; Ruiz de Almodóvar, M.; Oliver, F.J. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* **2009**, *5*, 61-74, doi:10.4161/auto.5.1.7272.

363. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J.M.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; El-Deiry, W.S.; Fulda, S., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation* **2012**, *19*, 107-120, doi:10.1038/cdd.2011.96.

364. Das, G.; Shrivage, B.V.; Baehrecke, E.H. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4*, a008813, doi:10.1101/cshperspect.a008813.

365. Elgendy, M.; Sheridan, C.; Brumatti, G.; Martin, S.J. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* **2011**, *42*, 23-35, doi:10.1016/j.molcel.2011.02.009.

366. Reef, S.; Zalckvar, E.; Shifman, O.; Bialik, S.; Sabanay, H.; Oren, M.; Kimchi, A. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell* **2006**, *22*, 463-475, doi:10.1016/j.molcel.2006.04.014.

367. Koike, M.; Shibata, M.; Tadakoshi, M.; Gotoh, K.; Komatsu, M.; Waguri, S.; Kawahara, N.; Kuida, K.; Nagata, S.; Kominami, E., et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* **2008**, *172*, 454-469, doi:10.2353/ajpath.2008.070876.

368. Xing, S.; Zhang, Y.; Li, J.; Zhang, J.; Li, Y.; Dang, C.; Li, C.; Fan, Y.; Yu, J.; Pei, Z., et al. Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction. *Autophagy* **2012**, *8*, 63-76, doi:10.4161/auto.8.1.18217.

369. Liu, Y.; Shoji-Kawata, S.; Sumpter, R.M., Jr.; Wei, Y.; Ginet, V.; Zhang, L.; Posner, B.; Tran, K.A.; Green, D.R.; Xavier, R.J., et al. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 20364-20371, doi:10.1073/pnas.1319661110.

370. He, C.; Klionsky, D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **2009**, *43*, 67-93, doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910.

371. Galluzzi, L.; Pietrocola, F.; Levine, B.; Kroemer, G. Metabolic control of autophagy. *Cell* **2014**, *159*, 1263-1276, doi:10.1016/j.cell.2014.11.006.

372. Warr, M.R.; Binnewies, M.; Flach, J.; Reynaud, D.; Garg, T.; Malhotra, R.; Debnath, J.; Passegué, E. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* **2013**, *494*, 323-327, doi:10.1038/nature11895.

373. Doulatov, S.; Vo, L.T.; Macari, E.R.; Wahlster, L.; Kinney, M.A.; Taylor, A.M.; Barragan, J.; Gupta, M.; McGrath, K.; Lee, H.Y., et al. Drug discovery for Diamond-Blackfan anemia using

- reprogrammed hematopoietic progenitors. *Sci Transl Med* **2017**, *9*, doi:10.1126/scitranslmed.aah5645.
374. Liu, F.; Lee, J.Y.; Wei, H.; Tanabe, O.; Engel, J.D.; Morrison, S.J.; Guan, J.L. FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* **2010**, *116*, 4806-4814, doi:10.1182/blood-2010-06-288589.
375. Pietras, E.M.; Warr, M.R.; Passegué, E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* **2011**, *195*, 709-720, doi:10.1083/jcb.201102131.
376. Walter, D.; Lier, A.; Geiselhart, A.; Thalheimer, F.B.; Huntscha, S.; Sobotta, M.C.; Moehrle, B.; Brocks, D.; Bayindir, I.; Kaschutnig, P., et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature* **2015**, *520*, 549-552, doi:10.1038/nature14131.
377. Katajisto, P.; Döhla, J.; Chaffer, C.L.; Pentinmikko, N.; Marjanovic, N.; Iqbal, S.; Zoncu, R.; Chen, W.; Weinberg, R.A.; Sabatini, D.M. Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science (New York, N.Y.)* **2015**, *348*, 340-343, doi:10.1126/science.1260384.
378. Ito, K.; Turcotte, R.; Cui, J.; Zimmerman, S.E.; Pinho, S.; Mizoguchi, T.; Arai, F.; Runnels, J.M.; Alt, C.; Teruya-Feldstein, J., et al. Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science* **2016**, *354*, 1156-1160, doi:10.1126/science.aaf5530.
379. Ito, K.; Ito, K. Metabolism and the Control of Cell Fate Decisions and Stem Cell Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2016**, *32*, 399-409, doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125134.
380. Mortensen, M.; Soilleux, E.J.; Djordjevic, G.; Tripp, R.; Lutteropp, M.; Sadighi-Akha, E.; Stranks, A.J.; Glanville, J.; Knight, S.; Jacobsen, S.E., et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* **2011**, *208*, 455-467, doi:10.1084/jem.20101145.
381. Cheung, T.H.; Rando, T.A. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, *14*, 329-340, doi:10.1038/nrm3591.
382. Newman, A.C.; Maddocks, O.D.K. One-carbon metabolism in cancer. *Br J Cancer* **2017**, *116*, 1499-1504, doi:10.1038/bjc.2017.118.
383. Watson, A.S.; Riffelmacher, T.; Stranks, A.; Williams, O.; De Boer, J.; Cain, K.; MacFarlane, M.; McGouran, J.; Kessler, B.; Khandwala, S., et al. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discovery* **2015**, *1*, 15008, doi:10.1038/cddiscovery.2015.8.
384. Jensen, K.S.; Binderup, T.; Jensen, K.T.; Therkelsen, I.; Borup, R.; Nilsson, E.; Mulhaupt, H.; Bouchard, C.; Quistorff, B.; Kjaer, A., et al. FoxO3A promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function. *EMBO J* **2011**, *30*, 4554-4570, doi:10.1038/emboj.2011.323.
385. Cao, Y.; Zhang, A.; Cai, J.; Yuan, N.; Lin, W.; Liu, S.; Xu, F.; Song, L.; Li, X.; Fang, Y., et al. Autophagy regulates the cell cycle of murine HSPCs in a nutrient-dependent manner. *Exp Hematol* **2015**, *43*, 229-242, doi:10.1016/j.exphem.2014.11.002.
386. Betin, V.M.; Singleton, B.K.; Parsons, S.F.; Anstee, D.J.; Lane, J.D. Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts: evidence for a role for ATG4 paralogs during autophagosome maturation. *Autophagy* **2013**, *9*, 881-893, doi:10.4161/auto.24172.
387. Mortensen, M.; Simon, A.K. Nonredundant role of Atg7 in mitochondrial clearance during erythroid development. *Autophagy* **2010**, *6*, 423-425, doi:10.4161/auto.6.3.11528.
388. Matsui, M.; Yamamoto, A.; Kuma, A.; Ohsumi, Y.; Mizushima, N. Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *339*, 485-489, doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.044.

389. Zhang, J.; Randall, M.S.; Loyd, M.R.; Dorsey, F.C.; Kundu, M.; Cleveland, J.L.; Ney, P.A. Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation. *Blood* **2009**, *114*, 157-164, doi:10.1182/blood-2008-04-151639.
390. Nishida, Y.; Arakawa, S.; Fujitani, K.; Yamaguchi, H.; Mizuta, T.; Kanaseki, T.; Komatsu, M.; Otsu, K.; Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **2009**, *461*, 654-658, doi:10.1038/nature08455.
391. Mortensen, M.; Ferguson, D.J.; Edelman, M.; Kessler, B.; Morten, K.J.; Komatsu, M.; Simon, A.K. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 832-837, doi:10.1073/pnas.0913170107.
392. Ho, T.T.; Warr, M.R.; Adelman, E.R.; Lansinger, O.M.; Flach, J.; Verovskaya, E.V.; Figueroa, M.E.; Passegué, E. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* **2017**, *543*, 205-210, doi:10.1038/nature21388.
393. Alers, S.; Löffler, A.S.; Wesselborg, S.; Stork, B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* **2012**, *32*, 2-11, doi:10.1128/mcb.06159-11.
394. Jin, G.; Xu, C.; Zhang, X.; Long, J.; Rezaeian, A.H.; Liu, C.; Furth, M.E.; Kridel, S.; Pasche, B.; Bian, X.W., et al. Atad3a suppresses Pink1-dependent mitophagy to maintain homeostasis of hematopoietic progenitor cells. *Nat Immunol* **2018**, *19*, 29-40, doi:10.1038/s41590-017-0002-1.
395. Youle, R.J.; Narendra, D.P. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12*, 9-14, doi:10.1038/nrm3028.
396. Riffelmacher, T.; Clarke, A.; Richter, F.C.; Stranks, A.; Pandey, S.; Danielli, S.; Hublitz, P.; Yu, Z.; Johnson, E.; Schwerd, T., et al. Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity* **2017**, *47*, 466-480.e465, doi:10.1016/j.immuni.2017.08.005.
397. Houwerzijl, E.J.; Pol, H.W.; Blom, N.R.; van der Want, J.J.L.; Wolf, J.d.; Vellenga, E. Erythroid precursors from patients with low-risk myelodysplasia demonstrate ultrastructural features of enhanced autophagy of mitochondria. *Leukemia* **2009**, *23*, 886-891, doi:10.1038/leu.2008.389.
398. van de Loosdrecht, A.A.; Brada, S.J.; Blom, N.R.; Hendriks, D.W.; Smit, J.W.; van den Berg, E.; de Wolf, J.T.; Vellenga, E. Mitochondrial disruption and limited apoptosis of erythroblasts are associated with high risk myelodysplasia. An ultrastructural analysis. *Leuk Res* **2001**, *25*, 385-393, doi:10.1016/s0145-2126(00)00151-x.
399. Chen, M.L.; Logan, T.D.; Hochberg, M.L.; Shelat, S.G.; Yu, X.; Wilding, G.E.; Tan, W.; Kujoth, G.C.; Prolla, T.A.; Selak, M.A., et al. Erythroid dysplasia, megaloblastic anemia, and impaired lymphopoiesis arising from mitochondrial dysfunction. *Blood* **2009**, *114*, 4045-4053, doi:10.1182/blood-2008-08-169474.
400. Acuna-Hidalgo, R.; Sengul, H.; Steehouwer, M.; van de Vorst, M.; Vermeulen, S.H.; Kiemeny, L.; Veltman, J.A.; Gilissen, C.; Hoischen, A. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet* **2017**, *101*, 50-64, doi:10.1016/j.ajhg.2017.05.013.
401. Ito, K.; Bonora, M.; Ito, K. Metabolism as master of hematopoietic stem cell fate. *Int J Hematol* **2019**, *109*, 18-27, doi:10.1007/s12185-018-2534-z.
402. Kohli, L.; Passegué, E. Surviving change: the metabolic journey of hematopoietic stem cells. *Trends Cell Biol* **2014**, *24*, 479-487, doi:10.1016/j.tcb.2014.04.001.
403. Zhang, C.C.; Sadek, H.A. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal* **2014**, *20*, 1891-1901, doi:10.1089/ars.2012.5019.
404. Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **2006**, *3*, 177-185, doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002.

405. Liu, W.; Shen, S.M.; Zhao, X.Y.; Chen, G.Q. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol* **2012**, *3*, 165-178.
406. Semenza, G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* **2007**, *405*, 1-9, doi:10.1042/bj20070389.
407. Yang, C.; Suda, T. Hyperactivated mitophagy in hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* **2018**, *19*, 2-3, doi:10.1038/s41590-017-0008-8.
408. Shoshani, T.; Faerman, A.; Mett, I.; Zelin, E.; Tenne, T.; Gorodin, S.; Moshel, Y.; Elbaz, S.; Budanov, A.; Chajut, A., et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 2283-2293, doi:10.1128/mcb.22.7.2283-2293.2002.
409. Hayashi, Y.; Yokota, A.; Harada, H.; Huang, G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Sci* **2019**, *110*, 1510-1517, doi:10.1111/cas.13990.
410. Pavlik, C.; Biswal, N.C.; Gaenzler, F.C.; Morton, M.D.; Kuhn, L.T.; Claffey, K.P.; Zhu, Q.; Smith, M.B. Synthesis and fluorescent characteristics of imidazole-indocyanine green conjugates. *Dyes and Pigments* **2011**, *89*, 9-15, doi:<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.08.008>.
411. Jie, Z.; Zhang, Y.; Wang, C.; Shen, B.; Guan, X.; Ren, Z.; Ding, X.; Dai, W.; Jiang, Y. Large-scale ex vivo generation of human neutrophils from cord blood CD34+ cells. *PLoS One* **2017**, *12*, e0180832-e0180832, doi:10.1371/journal.pone.0180832.
412. Nunn, A.; Linder, K.; Strauss, H.W. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med* **1995**, *22*, 265-280, doi:10.1007/bf01081524.
413. Takanuki, K.; Igarashi, T.; Hata, K.; Hori, H.; Shibata, T.; Kitagawa, H.; Satoh, T.; Inayama, S. Glutathione depletion by 2-nitroimidazole-1-acetohydroxamic acid as a radiosensitizer in hypoxic rat hepatocytes. *Biochem Int* **1988**, *17*, 155-162.
414. Liu, K.; Zhu, H.L. Nitroimidazoles as anti-tumor agents. *Anticancer Agents Med Chem* **2011**, *11*, 687-691, doi:10.2174/187152011796817664.
415. Michaela, F.; Emmanuel, G. Apoptotic pathways to death in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **2008**, *93*, 1288-1292, doi:10.3324/haematol.13563.
416. Poulaki, A.; Katsila, T.; Stergiou, I.E.; Giannouli, S.; Gómez-Tamayo, J.C.; Piperaki, E.T.; Kambas, K.; Dimitrakopoulou, A.; Patrinos, G.P.; Tzioufas, A.G., et al. Bioenergetic Profiling of the Differentiating Human MDS Myeloid Lineage with Low and High Bone Marrow Blast Counts. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12123520.
417. Krohn, K.A.; Link, J.M.; Mason, R.P. Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med* **2008**, *49 Suppl 2*, 129s-148s, doi:10.2967/jnumed.107.045914.
418. Westrate, L.M.; Drocco, J.A.; Martin, K.R.; Hlavacek, W.S.; MacKeigan, J.P. Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. *PLoS One* **2014**, *9*, e95265-e95265, doi:10.1371/journal.pone.0095265.
419. Twig, G.; Hyde, B.; Shirihai, O.S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1777*, 1092-1097, doi:10.1016/j.bbabi.2008.05.001.
420. Liesa, M.; Shirihai, O.S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* **2013**, *17*, 491-506, doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002.
421. Bellot, G.; Garcia-Medina, R.; Gounon, P.; Chiche, J.; Roux, D.; Pouyssegur, J.; Mazure, N.M. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **2009**, *29*, 2570-2581, doi:10.1128/mcb.00166-09.
422. Riffelmacher, T.; Simon, A.-K. Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation. *The FEBS Journal* **2017**, *284*, 1008-1020, doi:<https://doi.org/10.1111/febs.13962>.
423. Turgeon, M.-O.; Perry, N.J.S.; Poulogiannis, G. DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Frontiers in Oncology* **2018**, *8*, doi:10.3389/onc.2018.00015.

424. Wang, Q.; Zhang, Y.; Yang, C.; Xiong, H.; Lin, Y.; Yao, J.; Li, H.; Xie, L.; Zhao, W.; Yao, Y., et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* **2010**, *327*, 1004-1007, doi:10.1126/science.1179687.
425. Anderson, K.A.; Madsen, A.S.; Olsen, C.A.; Hirschey, M.D. Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD(+), NADH, or their ratio. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2017**, *1858*, 991-998, doi:10.1016/j.bbabi.2017.09.005.
426. Shim, E.H.; Livi, C.B.; Rakheja, D.; Tan, J.; Benson, D.; Parekh, V.; Kho, E.Y.; Ghosh, A.P.; Kirkman, R.; Velu, S., et al. L-2-Hydroxyglutarate: an epigenetic modifier and putative oncometabolite in renal cancer. *Cancer Discov* **2014**, *4*, 1290-1298, doi:10.1158/2159-8290.Cd-13-0696.
427. Cantó, C.; Menzies, K.J.; Auwerx, J. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell metabolism* **2015**, *22*, 31-53, doi:10.1016/j.cmet.2015.05.023.
428. Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27-36, doi:10.1093/carcin/bgp220.
429. Mrózek, K.; Bloomfield, C.D. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2006**, 10.1182/asheducation-2006.1.169, 169-177, doi:10.1182/asheducation-2006.1.169.
430. Zahid, M.F.; Malik, U.A.; Sohail, M.; Hassan, I.N.; Ali, S.; Shaukat, M.H.S. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* **2017**, *11*, 231-239.
431. Jabbour, E.; Ghanem, H.; Huang, X.; Ravandi, F.; Garcia-Manero, G.; O'Brien, S.; Faderl, S.; Pierce, S.; Choi, S.; Verstovsek, S., et al. Acute myeloid leukemia after myelodysplastic syndrome and failure of therapy with hypomethylating agents: an emerging entity with a poor prognosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **2014**, *14*, 93-97, doi:10.1016/j.clml.2013.10.013.
432. Mailloux, R.J.; Bériault, R.; Lemire, J.; Singh, R.; Chénier, D.R.; Hamel, R.D.; Appanna, V.D. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One* **2007**, *2*, e690, doi:10.1371/journal.pone.0000690.
433. Berg JM, T.J., Stryer L. . Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman. **2002**.
434. Kumar, B.; Garcia, M.; Weng, L.; Jung, X.; Murakami, J.L.; Hu, X.; McDonald, T.; Lin, A.; Kumar, A.R.; DiGiusto, D.L., et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia* **2018**, *32*, 575-587, doi:10.1038/leu.2017.259.
435. Rosenzweig, A.; Blenis, J.; Gomes, A.P. Beyond the Warburg Effect: How Do Cancer Cells Regulate One-Carbon Metabolism? *Front Cell Dev Biol* **2018**, *6*, 90, doi:10.3389/fcell.2018.00090.
436. Ma, L.; Zong, X. Metabolic Symbiosis in Chemoresistance: Refocusing the Role of Aerobic Glycolysis. *Frontiers in oncology* **2020**, *10*, 5-5, doi:10.3389/fonc.2020.00005.
437. Houten, S.M.; Violante, S.; Ventura, F.V.; Wanders, R.J. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu Rev Physiol* **2016**, *78*, 23-44, doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105045.
438. Wanders, R.J.A.; Waterham, H.R.; Ferdinandusse, S. Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2016**, *3*, doi:10.3389/fcell.2015.00083.
439. Hosios, A.M.; Vander Heiden, M.G. The redox requirements of proliferating mammalian cells. *J Biol Chem* **2018**, *293*, 7490-7498, doi:10.1074/jbc.TM117.000239.
440. Samudio, I.; Fiegl, M.; Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* **2009**, *69*, 2163-2166, doi:10.1158/0008-5472.Can-08-3722.
441. Zhao, R.Z.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z.B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med* **2019**, *44*, 3-15, doi:10.3892/ijmm.2019.4188.

442. Wang, Y.; Bai, C.; Ruan, Y.; Liu, M.; Chu, Q.; Qiu, L.; Yang, C.; Li, B. Coordinative metabolism of glutamine carbon and nitrogen in proliferating cancer cells under hypoxia. *Nature Communications* **2019**, *10*, 201, doi:10.1038/s41467-018-08033-9.
443. Stein, L.R.; Imai, S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* **2012**, *23*, 420-428, doi:10.1016/j.tem.2012.06.005.
444. Gaude, E.; Schmidt, C.; Gammage, P.A.; Dugourd, A.; Blacker, T.; Chew, S.P.; Saez-Rodriguez, J.; O'Neill, J.S.; Szabadkai, G.; Minczuk, M., et al. NADH Shuttling Couples Cytosolic Reductive Carboxylation of Glutamine with Glycolysis in Cells with Mitochondrial Dysfunction. *Mol Cell* **2018**, *69*, 581-593.e587, doi:10.1016/j.molcel.2018.01.034.
445. Zala, D.; Schlattner, U.; Desvignes, T.; Bobe, J.; Roux, A.; Chavrier, P.; Boissan, M. The advantage of channeling nucleotides for very processive functions. *F1000Res* **2017**, *6*, 724, doi:10.12688/f1000research.11561.2.
446. Cooper, A.J.; Pinto, J.T.; Callery, P.S. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2011**, *7*, 891-910, doi:10.1517/17425255.2011.577738.
447. Speijer, D. Can All Major ROS Forming Sites of the Respiratory Chain Be Activated By High FADH(2) /NADH Ratios?: Ancient evolutionary constraints determine mitochondrial ROS formation. *Bioessays* **2019**, *41*, e1800180, doi:10.1002/bies.201800180.
448. Santidrian, A.F.; Matsuno-Yagi, A.; Ritland, M.; Seo, B.B.; LeBoeuf, S.E.; Gay, L.J.; Yagi, T.; Felding-Habermann, B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 1068-1081, doi:10.1172/jci64264.
449. Vélez, J.; Hail, N., Jr.; Konopleva, M.; Zeng, Z.; Kojima, K.; Samudio, I.; Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the reprogramming of intermediary metabolism in leukemia cells. *Frontiers in oncology* **2013**, *3*, 67-67, doi:10.3389/fonc.2013.00067.
450. Yang, C.; Ko, B.; Hensley, C.T.; Jiang, L.; Wasti, A.T.; Kim, J.; Sudderth, J.; Calvaruso, M.A.; Lumata, L.; Mitsche, M., et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol Cell* **2014**, *56*, 414-424, doi:10.1016/j.molcel.2014.09.025.
451. Morad, S.A.; Cabot, M.C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 51-65, doi:10.1038/nrc3398.
452. Santos, C.R.; Schulze, A. Lipid metabolism in cancer. *Febs j* **2012**, *279*, 2610-2623, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x.
453. Stevens, B.M.; Khan, N.; D'Alessandro, A.; Nemkov, T.; Winters, A.; Jones, C.L.; Zhang, W.; Pollyea, D.A.; Jordan, C.T. Characterization and targeting of malignant stem cells in patients with advanced myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* **2018**, *9*, 3694, doi:10.1038/s41467-018-05984-x.
454. Loew, A.; Köhnke, T.; Rehbeil, E.; Pietzner, A.; Weylandt, K.-H. A Role for Lipid Mediators in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2425, doi:10.3390/ijms20102425.
455. Haanstra, J.R.; van Tuijl, A.; Kessler, P.; Reijnders, W.; Michels, P.A.; Westerhoff, H.V.; Parsons, M.; Bakker, B.M. Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 17718-17723, doi:10.1073/pnas.0806664105.
456. Pattingre, S.; Bauvy, C.; Levade, T.; Levine, B.; Codogno, P. Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy* **2009**, *5*, 558-560, doi:10.4161/auto.5.4.8390.
457. Ribas, V.; García-Ruiz, C.; Fernández-Checa, J.C. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* **2014**, *5*, 151, doi:10.3389/fphar.2014.00151.
458. Bosc, C.; Broin, N.; Fanjul, M.; Saland, E.; Farge, T.; Courdy, C.; Batut, A.; Masoud, R.; Larrue, C.; Skuli, S., et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun* **2020**, *11*, 4056, doi:10.1038/s41467-020-17882-2.
459. Fujiki, Y.; Okumoto, K.; Mukai, S.; Honsho, M.; Tamura, S. Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Frontiers in Physiology* **2014**, *5*, doi:10.3389/fphys.2014.00307.

460. Liu, Y.; Levine, B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* **2015**, *22*, 367-376, doi:10.1038/cdd.2014.143.
461. Palomo, L.; Solé, F. SF3B1: the lord of the rings in MDS. *Blood* **2020**, *136*, 149-151, doi:10.1182/blood.2020005719.
462. Dalton, W.B. The metabolic reprogramming and vulnerability of SF3B1 mutations. *Mol Cell Oncol* **2020**, *7*, 1697619-1697619, doi:10.1080/23723556.2019.1697619.
463. Dalton, W.B.; Helmenstine, E.; Walsh, N.; Gondek, L.P.; Kelkar, D.S.; Read, A.; Natrajan, R.; Christenson, E.S.; Roman, B.; Das, S., et al. Hotspot SF3B1 mutations induce metabolic reprogramming and vulnerability to serine deprivation. *J Clin Invest* **2019**, *129*, 4708-4723, doi:10.1172/jci125022.

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Exploiting the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 and Pseudohypoxia in the Myelodysplastic Syndrome Pathophysiology.

Stergiou IE, Kambas K, Poulaki A, Giannouli S, Katsila T, Dimitrakopoulou A, Vidali V, Mouchtouris V, Kloukina I, Xingi E, Pagakis SN, Probert L, Patrinos GP, Ritis K, Tzioufas AG, Voulgarelis M. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 15;22(8):4099. doi: 10.3390/ijms22084099. Impact Factor 4.55

2. Bioenergetic Profiling of the Differentiating Human MDS Myeloid Lineage with Low and High Bone Marrow Blast Counts.

Poulaki A, Katsila T, Stergiou IE, Giannouli S, Gómez-Tamayo JC, Piperaki ET, Kambas K, Dimitrakopoulou A, Patrinos GP, Tzioufas AG, Voulgarelis M. *Cancers (Basel).* 2020 Nov 26;12(12):3520. doi: 10.3390/cancers12123520. Impact Factor 6.1



Article

Exploiting the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 and Pseudohypoxia in the Myelodysplastic Syndrome Pathophysiology

Ioanna E. Stergiou ^{1,†}, Konstantinos Kambas ^{2,†}, Aikaterini Poulaki ^{1,3}, Stavroula Giannouli ^{3,*}, Theodora Katsila ⁴, Aglaia Dimitrakopoulou ⁵, Veroniki Vidali ⁶, Vasileios Mouchtouris ⁶, Ismini Kloukina ⁷, Evangelia Xingi ⁸, Stamatis N. Pagakis ⁹, Lesley Probert ², George P. Patrinos ¹⁰, Konstantinos Ritis ¹¹, Athanasios G. Tzioufas ¹ and Michael Voulgaris ^{1,*}

- ¹ Department of Pathophysiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece; stergiouiioanna@hotmail.com (I.E.S.); aikaterini.poulaki@gmail.com (A.P.); agtzi@med.uoa.gr (A.G.T.)
 - ² Laboratory of Molecular Genetics, Department of Immunology, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece; kkampas@hotmail.com (K.K.); lesley.probert@gmail.com (L.P.)
 - ³ Hematology Unit, Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece
 - ⁴ Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, 11635 Athens, Greece; thkatsila@eie.gr
 - ⁵ Laboratory of Flow Cytometry, Immunology Department, Laiko Hospital of Athens, 11526 Athens, Greece; liladim1@hotmail.com
 - ⁶ Laboratory of Synthesis of Natural Products and Bioorganic Chemistry, Institute of Nanoscience and Nanotechnology, National Center for Scientific Research “Demokritos”, 15341 Athens, Greece; v.vidali@inn.demokritos.gr (V.V.); vmouchtouris@gmail.com (V.M.)
 - ⁷ Center of Basic Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece; isminikloukina@gmail.com
 - ⁸ Light Microscopy Unit, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece; evangeliaxingi@gmail.com
 - ⁹ Biological Imaging Unit, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece; spagakis@bioacademy.gr
 - ¹⁰ Department of Pharmacy, University of Patras, 26504 Patras, Greece; gpatrinos@upatras.gr
 - ¹¹ First Department of Internal Medicine, University General Hospital of Alexandroupolis, Democritus University of Thrace, 68100 Alexandroupolis, Greece; rits2@otenet.gr
- * Correspondence: stgiannouli@gmail.com (S.G.); mvoulgar@med.uoa.gr (M.V.); Tel.: +30-69-8407-0242 (S.G.); +30-21-0746-2647 (M.V.)
- † I.E.S. and K.K. contributed equally to this work as first authors.



Citation: Stergiou, I.E.; Kambas, K.; Poulaki, A.; Giannouli, S.; Katsila, T.; Dimitrakopoulou, A.; Vidali, V.; Mouchtouris, V.; Kloukina, I.; Xingi, E.; et al. Exploiting the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 and Pseudohypoxia in the Myelodysplastic Syndrome Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4099. <https://doi.org/10.3390/ijms22084099>

Academic Editor: Ernestina Marianna De Francesco

Received: 18 March 2021

Accepted: 12 April 2021

Published: 15 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Myelodysplastic syndromes (MDS) comprise a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem (HSCs) and/or progenitor cells disorders. The established dependence of MDS progenitors on the hypoxic bone marrow (BM) microenvironment turned scientific interests to the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 facilitates quiescence maintenance and regulates differentiation by manipulating HSCs metabolism, being thus an appealing research target. Therefore, we examine the aberrant HIF-1 stabilization in BMs from MDS patients and controls (CTRLs). Using a nitroimidazole–indocyanine conjugate, we show that HIF-1 aberrant expression and transcription activity is oxygen independent, establishing the phenomenon of pseudohypoxia in MDS BM. Next, we examine mitochondrial quality and quantity along with levels of autophagy in the differentiating myeloid lineage isolated from fresh BM MDS and CTRL aspirates given that both phenomena are HIF-1 dependent. We show that the mitophagy of abnormal mitochondria and autophagic death are prominently featured in the MDS myeloid lineage, their severity increasing with intra-BM blast counts. Finally, we use in vitro cultured CD34+ HSCs isolated from fresh human BM aspirates to manipulate HIF-1 expression and examine its potential as a therapeutic target. We find that despite being cultured under 21% FiO₂, HIF-1 remained aberrantly stable in all MDS cultures. Inhibition of the HIF-1 α subunit had a variable beneficial effect in all <5%-intra-BM blasts-MDS, while it had no effect in CTRLs or in \geq 5%-intra-BM blasts-MDS that uniformly died within 3 days of culture. We conclude that HIF-1 and pseudohypoxia are prominently featured in MDS pathobiology, and their manipulation has some potential in the therapeutics of benign MDS.

Keywords: myelodysplastic syndromes; hypoxia-inducible factor 1; pseudohypoxia; autophagy; mitophagy

1. Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) encompass a group of hematologic malignancies, which are characterized by clonal hematopoietic stem (HSCs) and/or hematopoietic progenitor cells (HPCs) expansion with defective differentiating potentials [1]. These clonal alterations dictate a heterogeneous clinical phenotype in which morphologic dysplasia, ineffective hematopoiesis with peripheral blood cytopenias, and increased risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML) predominate [2]. The origins of the premalignant clones trace back to hematopoietic precursors that re-acquire self-renewal capacity with differentiation blockage [3], persist during treatment, and expand at times of relapse establishing not only the disease's malignant potential, but also the grave prognosis MDS-related AML bears [4].

The identification and description of the biologic pathways leading to this transformation would divulge therapeutic targets and have thus concentrated global scientific interest. Although recurrent genetic aberrations including point mutations in epigenetic regulators, RNA splicing genes, transcription factors, and DNA response genes can be found in MDS HSCs/HPCs, a casual relation between them seems rather unlikely [5]. Up to 10–20% of normal individuals aged between 65 and 90 years present recurrent MDS-associated mutations, otherwise termed Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP), while the vast majority of the MDS clones show an impressive range of unique to each clone, genetic aberrations [6,7]. The universal economic impact of the supportive care offered to MDS patients, the grave prognosis of MDS-related AML, and the impressive genomic and phenotypic heterogeneity of the syndrome necessitate a rather holistic approach.

Based on their immature phenotype and the, at least initial, reliance of the dysplastic progenitors on the hypoxic bone marrow (BM) microenvironment, several unrelated research groups have underlined their similarities with healthy HSCs and have thus focused upon physiologic correspondence between them [8,9]. Healthy HSCs rely heavily on BM oxygen tension to retain their stemness, and they do so by altering their gene expression to fit a more glycolytic rather than mitochondrial metabolic profile [10,11]. One transcription factor lies centrally in this whole adaptation, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) [12–14], which is a heterodimer of a constantly expressed beta (β) subunit and an oxygen-sensitive alpha (α) subunit [15]. Upon hypoxia, the α subunit is rescued from proteasomal degradation and the stable HIF-1 dimer upregulates the expression of genes coding for glucose transporters and enzymes involved in its extramitochondrial degradation, which is also known as the Warburg effect [16–18]. By positively regulating mitophagy, that is the autophagy of functional mitochondria, and by also optimizing the electron transport chain (ETC) of remaining organelles HIF-1 reduces the release of reactive oxygen species (ROS), ensuring quiescence [19–21]. Differentiation commitment is reflected on a metabolic switch from Warburg glycolysis to mitochondrial Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) and OXidative PHOsphorylation (OXPHOS) marked by HIF-1 α destabilization and rapid degradation [10,11,14]. The failure of such a transition could be accounted for the differentiation blockage, ineffective hematopoiesis, and malignant potential of the MDS clones putting HIF-1 centrally in the elusive MDS pathobiology.

In this study, we examine the aberrant stabilization of HIF-1 α in human MDS BM-derived CD34+ and differentiating myeloid lineage using a major transcriptional HIF-1 target, DNA-damage-inducible transcript 4 (*DDIT4*) or regulated in development and DNA damage response 1 (*REDD1*) [22]. We show that HIF-1 stabilization is featured in all MDS subgroups, the phenomenon being oxygen independent and thus thereafter referred to as pseudohypoxia [23]. We further suggest an indocyanine (IDC) labeled nitroimidazole derivative (NIM) as a marker of the established pseudohypoxia both in isolated myeloid

lineage and BM biopsies and suggest that the degree of NIM-IDC accumulation is directly associated with MDS severity, that is, with intra-BM blast percentage. Finally, we assess the permissive role of HIF-1 in MDS ineffective myelopoiesis and thus its potential as a therapeutic target. Using a functional HIF-1 α inhibitor and *in vitro* cultures of human BM-derived CD34+ HSCs under myeloid priming, we show that HIF-1 α inhibition has a moderate beneficial effect, both qualitative and quantitative, on the low-risk MDS cultures, while it does not suffice to rescue the culture from demise in MDS with excess blasts 1/2 experiments. We conclude that HIF-1 inhibition may be an appealing target to relieve neutropenia in some benign MDS patients, yet it still remains an epiphenomenon of a global BM microenvironmental interruption that necessitates extensive research.

2. Results

2.1. Human MDS CD34+ and Myeloid-Lineage Cells Display an Activated HIF-1 Profile with Increased REDD1 Protein Levels

To investigate HIF-1 signaling in human myelodysplasia, we assessed mRNA and protein levels of HIF-1 α and HIF-1 direct transcriptional target, *REDD1*, in BM samples of 16 previously untreated MDS (or seven for protein levels) patients and seven matched controls (or six for protein levels). *HIF1A* mRNA levels, by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), did not differ between MDS patients and controls, while *REDD1* mRNA was significantly increased in MDS CD34+ cells and myeloid precursors (Supplementary Figure S1A). Moreover, protein expression levels assessed by flow cytometry in seven MDS patients (n = 4 MDS-multilineage dysplasia (MLD), n = 2 MDS-excess blasts 1 (EB1), n = 1 MDS-excess blasts 2 (EB2)) and six controls showed up-regulation of both HIF-1 α and REDD1 peptides in MDS CD34+ and differentiating myeloid cells, yet with significance established only in the latter group (Figure 1A,B,D,E). This may lie upon the inherent HIF-1 positivity of CD34+ HSCs [14], which sequentially leads to REDD1 protein expression in health. When assessing the double positivity for HIF-1 α and REDD1, significant differences are observed both in the CD34+ and the myeloid group (Figure 1C,F). The phenomenon implies alternative regulatory pathways leading to additional REDD1 transcriptional activation that are present even from the CD34+ HSCs stage in the control group that were further confirmed when assessing *REDD1* mRNA levels in control CD34+ cultures upon HIF-1 α inhibition (Supplementary Figure S1B). Our results do show that HIF-1 is aberrantly active in MDS even from the CD34+ HSCs stage and that this is due to posttranscriptional HIF-1 α peptide regulation. We also show that a HIF-1 transcriptional target, REDD1, is also aberrantly expressed and that this is partially and most likely predominantly due to HIF-1 dependent regulation establishing the functional HIF-1 transcriptional program. Of note, the great variability observed in protein expression levels of both CD34+ and myeloid groups is attributed to the polymorphic nature of the MDS pathophysiology and subsequent syndromic clinical phenotype (Figure 1A–F). Examining the MDS subgroups based on their severity (MDS-MLD, low severity with <5% blasts versus MDS-EB1 and MDS-EB2, high severity with \geq 5%), no correlation was established between HIF-1 α and REDD1 protein expression levels and the MDS subgroup analyzed. We should state though that peak HIF-1 α and REDD1 protein expression in the differentiating myeloid cells were found in patients with MDS-MLD (Figure 1B,D), while this phenomenon was not observed in CD34+ positive cells. Peak HIF-1 α /REDD1 protein coexpression levels corresponded to same patients with MDS-MLD (Figure 1E,F).

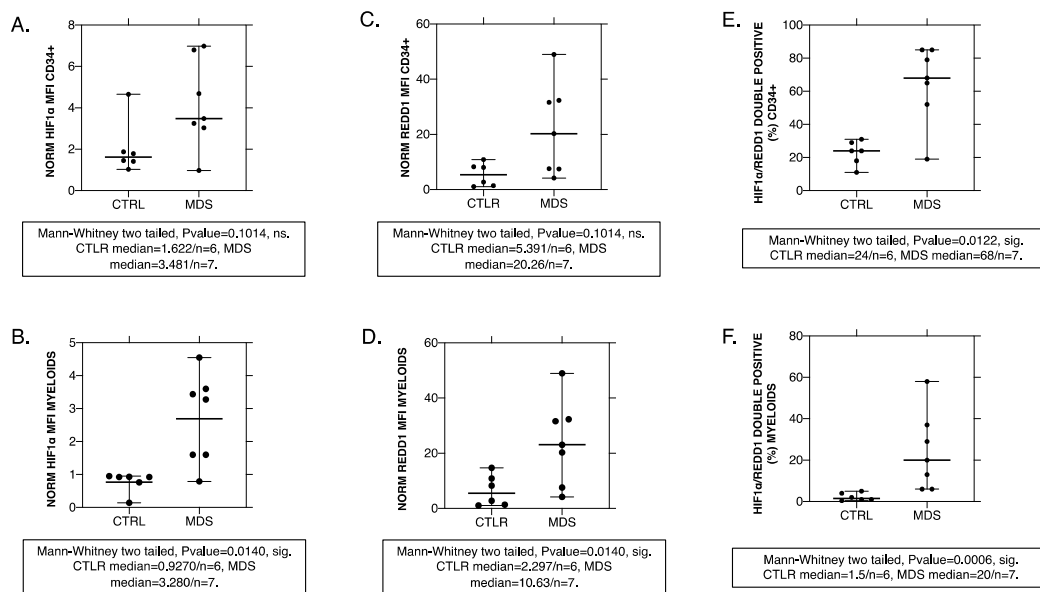


Figure 1. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α) and regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1) protein kinetics in CD34 $^{+}$ and differentiating myeloid lineage from controls (CTRL, n = 6) and myelodysplastic syndromes (MDS, n = 7) patients. HIF-1 α (A,B), REDD1 (C,D) expression as well as HIF-1 α /REDD1 co-expression (E,F) were assessed through flow cytometry with subsequent statistical analysis to yield significance. Although great variability exists in the MDS group owing to and reflecting upon the syndromic nature of this clinical entity, a difference does exist between CTRLs and MDS even if significance fails to be established (A,B). No correlation was established with MDS severity; thus, all samples, namely both from <5% and \geq 5% intra BM blast counts were assessed together. However, we do underline that peak HIF-1 α and REDD1 median fluorescence intensity (MFI) values in myeloids, the differentiation stage at which HIF-1 α levels and thus MFI ought to be physiologically declining, correspond to low-risk patients (B,D). In the CD34 $^{+}$ group, such a correlation was not observed (A,C). The phenomenon is also reflected upon the pattern of HIF-1 α /REDD1 coexpression (E,F) where peak coexpression also corresponds to the same low-risk patients. The great variability in coexpression in the MDS group suggests a more complex nature of REDD1 upstream regulation aside from HIF-1 stability that is observed not only in the myeloid group (F) but also in the CD34 $^{+}$ HSCs (E). ns: non-significant, sig.: significant. Mann–Whitney p -value > 0.05 or <0.05 accordingly.

2.2. MDS BM Shows Increased Intracellular NIM-IDC Accumulation That Positively Correlates with MDS Severity

To solidify our hypothesis that HIF-1 α stabilization is the net effect of a problematic MDS BM micro- and intracellular environment, we examined BM respiration using a conventional hypoxic marker nitroimidazole derivative, 2-NIM, conjugated with the fluorescent dye indocyanine (IDC) (Supplementary Table S3). Whole BM samples were immersed into the liquid immediately after acquisition (see Materials and Methods). Confocal microscopy of BM biopsy from both controls (CTRLS/n = 7) and MDS (n = 3 MDS-EB1/2, n = 4 MDS-MLD) yielded statistically significant differences in NIM-IDC immunofluorescence between the two groups (Figure 2 lower right panel). To increase the validity of our results, we corrected NIM-IDC immunofluorescence for cellularity and area by dividing with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) immunofluorescence. Thus, we also corrected for areas of DAPI/NIM colocalization (see Materials and Methods). We established statistically significant increased intracellular NIM-IDC accumulation in the MDS group (Figure 2 lower right panel). Moreover, corrected total NIM-IDC immunofluorescence directly correlated with MDS severity, that is, with intra-BM blast counts. The observed DAPI/NIM colocalization was also markedly increased with increasing MDS severity (Figure 2). According to morphologic features of cells where colocalization was evident, we suggest that these might correspond to apoptotic nuclei, yet given our lack of experimental data to support such an assumption, we further analyze our theory in the Discussion section.

Increased NIM-IDC accumulation in the dysplastic BM is not attributed to increased intra BM CD34+ blasts. The sample with MLD (multilineage dysplasia) and 0% intra BM blasts showed markedly increased NIM-IDC accumulation compared to controls. Confocal close ups ($\times 63/1.4$ NA objective) and subsequent z stacks identify differentiating erythroid and myeloid lineage with cytoplasmic NIM-IDC concentrates (Figure 2 lower middle panels). We avoided using double-stain immunofluorescence in the NIM-IDC embedded BM specimens to reduce biased signals given the auto-fluorescent IDC properties. We conclude that at the cellular level in the MDS BM, pseudohypoxic conditions cause the accumulation of NIM-IDC, and we suggest that NIM-IDC dye can be used as a marker of pseudohypoxia observed in MDS yet with certain caveats.

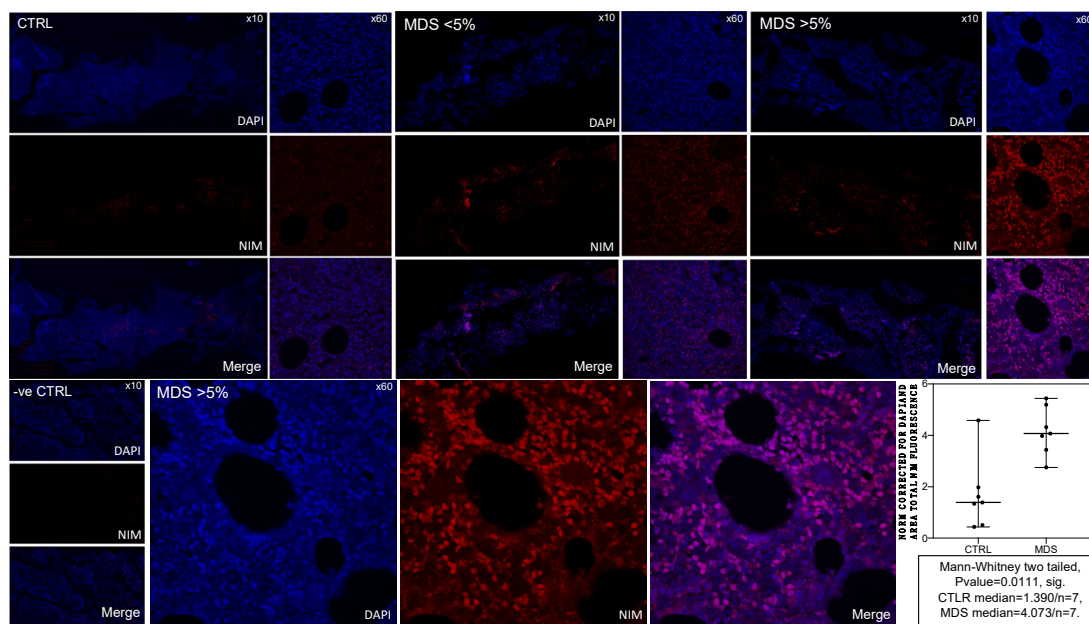


Figure 2. Bone marrow biopsy nitroimidazole derivative (NIM)-indocyanine (IDC) (Red) immunofluorescence from control (CTRL/ $n = 7$) and MDS ($n = 7$) subjects. One representative CTRL, and two MDS along with the negative control (-ve CTRL) samples are presented. 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Blue) was used as a contrast stain given its very different excitation and emission spectrums with NIM-IDC. Both whole section tile scans ($\times 10$ and $\times 20$) along with corresponding close-ups ($\times 60$) are shown. Close ups from the MDS $\geq 5\%$ intra BM blast counts are also shown enlarged to visualize the intracellular NIM-IDC staining. Colocalization of NIM-IDC with DAPI is attributed to up-regulated apoptosis and was corrected when calculating the NIM-IDC fluorescence along with differences in area section. For two out of seven CTRL and MDS samples, two sections from different depths within the biopsy specimen were microscopically observed to ensure method accuracy. We show statistically significant intracellular NIM-IDC immunofluorescence in MDS samples with its accumulation increasing directly with the severity of MDS. Of note, MDS severity is also visually directly associated with apoptotic burden, which is further analyzed in the main text. ns: non significant, sig.: significant. Mann-Whitney p -value > 0.05 or < 0.05 accordingly.

2.3. Mitophagy and Autophagic Cell Death Are Prominently Featured in the MDS Myeloid Lineage; Their Severity Increasing with the Intra BM Blast Counts

Hypoxia-induced autophagy is part of a general mechanism of cell adaptation that is controlled by HIF-1 [14,24,25] and would therefore be also activated even upon non-canonical HIF-1 stabilization [24]. Therefore, we studied the autophagic status of BM CD34+ and MPO+ cells from five MDS patients and three controls [25]. Immunofluorescence for LC3B (Microtubule-Associated Protein Light Chain 3B) showed enhanced autophagosome formation, namely increased punctuated signals in MDS MPO+ cells, that is in the differentiating myeloid lineage (Figure 3A,B), while the phenomenon was virtually absent from CD34+ HSCs (Supplementary Figure S2). LC3B/TOMM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) colocalization in the differentiating myeloid lineage of

MDS samples placed mitochondria inside the LC3B+ autophagosomal membrane while LC3B/LAMP1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1) colocalization established autophagy completion with autophagosome–lysosome fusion (Figure 3C–E accordingly, Supplementary Figure S5).

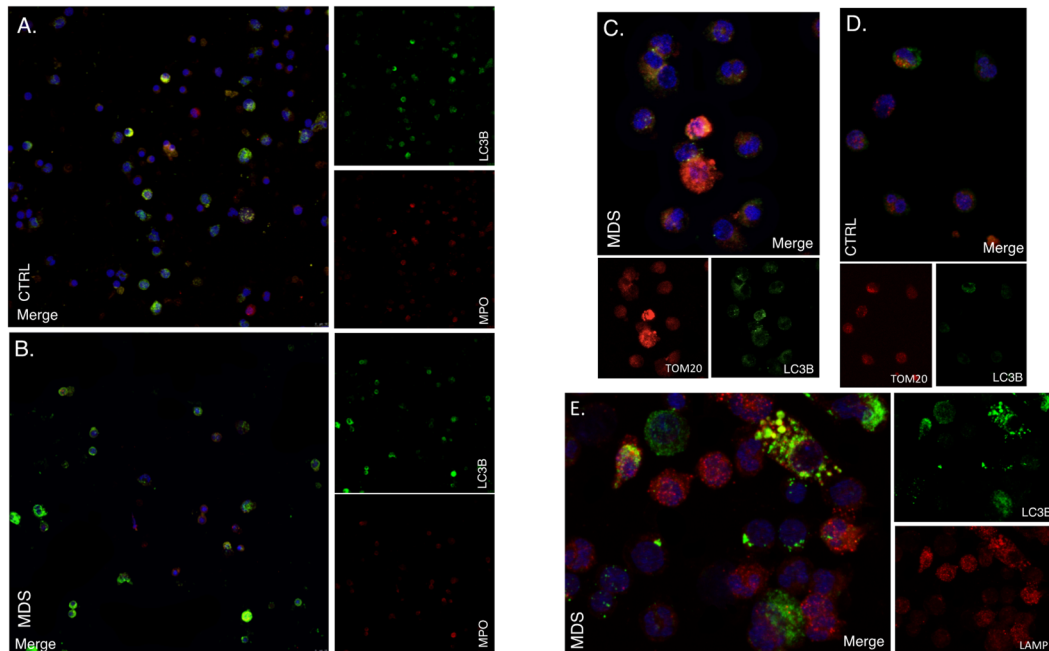


Figure 3. Autophagy is up-regulated in differentiating myeloid cells from MDS patients. (A,B) Autophagy levels in myeloid cells (high density layer) after density gradient separation, as assessed by LC3B immunofluorescence. Red: MPO, Green: LC3B, Blue: DAPI. Objective 63×/1.4NA. One representative out of four independent experiments is shown. (C,D) Active mitophagy in myeloid cells from MDS patients and CTRL as assessed by LC3B/TOMM20 immunofluorescence. Red: TOMM20, Green: LC3B, Blue: DAPI. Objective 63×/1.4NA-representative close-up. One out of two independent experiments is shown. (E) Immunofluorescence of LC3B and LAMP-1 in myeloid cells of MDS patients. Objective 63×/1.4NA representative close-up. Red: LAMP1, Green: LC3B, Blue: DAPI. One out of three independent experiments is shown. LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, MPO: Myeloperoxidase, TOMM20: Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20, LAMP 1: Lysosomal-associated membrane protein 1.

Next, the myeloid lineage of four MDS patients ($n = 2$ MDS-MLD, $n = 1$ MDS-EB1, $n = 1$ MDS-EB2) and two controls was examined under electron microscopy (Figure 4). Abundance of autophagic vacuoles, including double-membrane autophagosomes with engulfed mitochondria, confirmed the increased autophagic flux with active mitophagy in the MDS myeloid lineage (Figure 4B,C) [26]. Such features were absent in controls (Figure 4A). Importantly, when observing the MDS myeloid lineage, we came across interesting changes in their mitochondrial content. While samples from the benign, <5% intra BM blast group showed complete absence of mitochondria along with active mitophagy (Figure 4B), its malignant counterpart with $\geq 5\%$ blasts presented with markedly disturbed mitochondrial morphology (Figure 4C and Supplementary Figures S3 and S4). Apart from an overwhelming amount of autophagic flux, high-risk myeloids possess elongated, abnormal, and even enormous for their differentiation stage mitochondria (Figure 4C and Supplementary Figure S4). The mitochondrial morphology of these cells raises concern that the aberrant HIF-1 α stability observed at least in this group is indeed an epiphenomenon of the pseudohypoxia conferred by disturbed respiratory function.

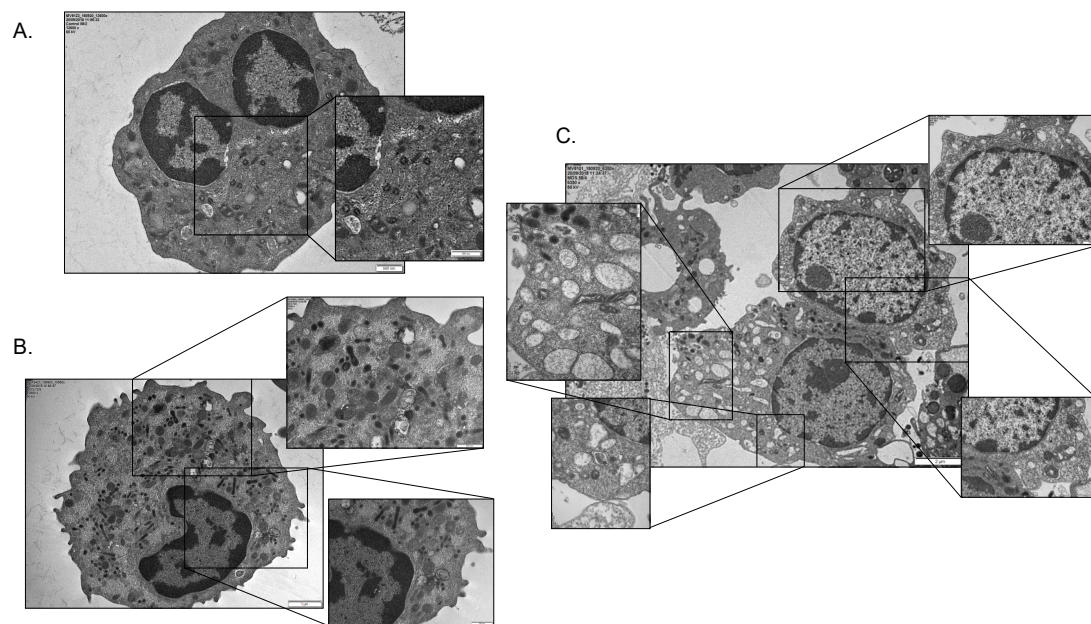


Figure 4. Electron microscopy of the differentiating myeloid lineage following whole bone marrow aspirate ficoll bilayer separation (high-density layer) from MDS patients ($n = 4$) and controls ($n = 2$). (A) Control, (B) MDS ($<5\%$ blasts), (C) MDS ($\geq 5\%$ blasts). (A) Mature healthy neutrophil with numerous small healthy mitochondria (outlined in the black panel). (B) Mature myeloid lineage with complete mitochondrial absence while with the presence of double membrane autophagosomes at variable maturation stages. (C) Markedly atypical maturing myeloid lineage without granules with nuclear immaturity. An abundance of large, elongated mitochondria and numerous maturing autophagosomes, some with engulfed mitochondria, is also evident. Scale bars and magnifications are shown on the upper left corner of each picture.

Subsequently, the overwhelming autophagic flux leads the MDS differentiating myeloids to death. Nuclear membrane convolution and shrinkage, focal concavity of the nuclear surface, focal ballooning of the perinuclear space, numerous autophagosomes and autolysosomes, which along with a dilated and fragmented endoplasmic reticulum and swollen, electron-dense mitochondria with abnormal internal structure essentially translate to a distinctive type of autophagic cellular death called autosis (Figure 4C and Supplementary Figure S4). Classical features of apoptosis were variably present only in the low-risk MDS group. We conclude that increased autophagic flux in general and mitophagy specifically are prominently featured in the MDS differentiating myeloids. We show that their levels vary greatly with MDS severity/risk and that they are directly associated with intra BM blast counts. We also propose autosis as the main mechanism driving ineffective myelopoiesis in malignant MDS subtypes, while a mixed apoptotic-autotic pattern applies better to their benign counterparts. To this end, aberrant HIF-1 stabilization can be secondarily featured in the pseudohypoxic intracellular microenvironment of a greatly disturbed mitochondrial function.

2.4. HIF-1 α Inhibition Enhances the Proliferative and Differentiating Capacity of MDS BM CD34 $^{+}$ Cells

To examine causality between the oxygen-independent HIF-1 activity and the MDS related hematopoietic failure, we used a functional HIF-1 α inhibitor in normoxic *in vitro* cultures of human MDS BM-derived CD34 $^{+}$ cells primed toward myeloid differentiation. A total of six experiments were performed. As expected, the three CD34 $^{+}$ cultures from MDS with excess blasts 1/2 did not flourish either with or without HIF-1 α inhibition. On the other hand, all CD34 $^{+}$ cultures from $<5\%$ intra BM blast count samples reacted variably to HIF-1 α inhibition, all of them uniformly benefiting from it (Figure 5). On culture day 16 (or 14), we evaluated the differentiation stage and morphology using optical microscopy and flow cytometry for CD11b and CD66b, both of them common myeloid mark-

ers (Figure 5C–E) [27]. Out of three low-risk cultures, one showed marked improvement in cellularity and differentiation (Figure 5D,F), one showed moderate increase in numbers of mature forms (Figure 5E), and one showed only mild improvement in differentiation status (Figure 5C). Importantly, culture reaction to HIF-1 α inhibition inversely correlated with culture behavior without it. Successful HIF-1 α inhibition was further confirmed by reduced *REDD1* mRNA levels assessed with qRT-PCR (Supplementary Figure S1B). As expected, HIF-1 α inhibition in control cultures did not significantly change *REDD1* mRNA levels owing to HIF-1 independent, mostly stress-induced *REDD1* regulation in normality.

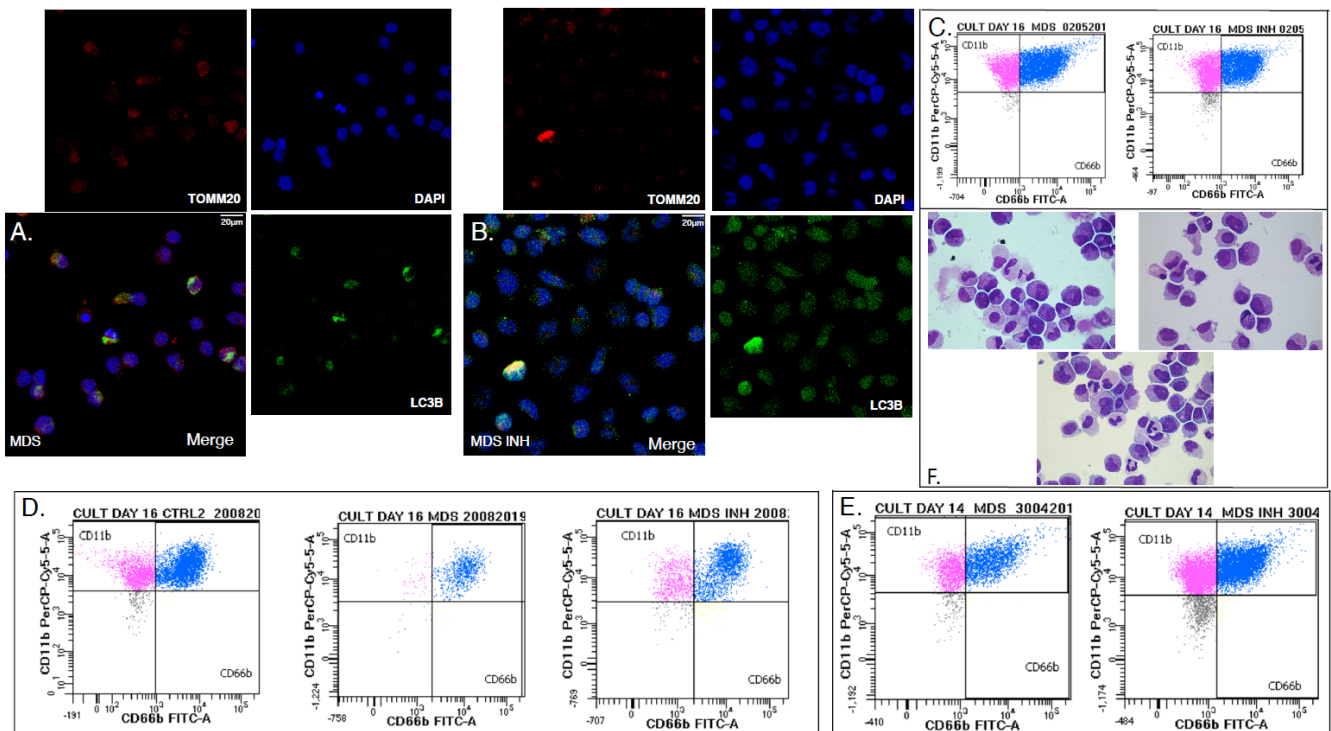


Figure 5. Effects of HIF-1 α inhibition on human CD34 $^{+}$ in vitro cultures primed toward myeloid differentiation. (A,B) Assessment of differentiation, mitochondrial content, and autophagy through immunofluorescence for DAPI (blue), TOMM20 (red), and LC3b (green), objective 63 \times /1.4NA. (A) MDS, (B) MDS plus HIF-1 α inhibitor culture day 16. (C) Flow cytometry for differentiation markers CD66b/CD11b and photon microscopy of culture cytopsin showing differentiation improvement in one out of three presented cultures. (D,E) Flow cytometry for differentiation markers CD66b/CD11b of two independent experiments on days 16 (D) and 14 (E) show marked quantitative and qualitative improvement. (F) Photon microscopy of May-Gruenwald/Giemsa stained cytopsin from the (D) culture on day 16 showing numerical expansion and differentiation improvement. Objective (\times 100). Upper left: Control, Upper right: MDS, Lower center: MDS+INH. All experiments were performed in CD34 $^{+}$ HSCs from patients suffering from MDS with <5% intra bone marrow blasts. One representative control is shown. Each MDS culture corresponds with one or more control cultures. LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, MPO: Myeloperoxidase, TOMM20: Translocase of Outer Mitochondrial Membrane.

HIF-1 α inhibition also improved the autophagic status of the low-risk MDS differentiating myeloid cells (Figure 5A,B). Immunofluorescent for TOMM20 and LC3B on day 16 (or 14) showed that MDS cells treated with the inhibitor showed decreased but not diminished mitophagy compared to their untreated counterparts. Mitochondrial content assessed visually through TOMM20 immunofluorescence did not differ between the two groups. Of note, HIF-1 α inhibition did not suffice to rescue any culture from neither high nor low-risk from demise. It did improve myelopoiesis, almost leading to normalization in cultures that were already viable even without the inhibitor. We suggest that although HIF-1 may largely contribute to ineffective myelopoiesis observed in MDS, its contribution varies with the MDS severity, while its therapeutic potentials are limited to a selected group of benign prognosis patients with <5% intra BM blasts MDS and yet ill-defined

characteristics. Indeed, in those cultures that were benefited by HIF-1 α inhibition, flow cytometric assessment of NIM-IDC accumulation yielded matching kinetics establishing the pseudohypoxic nature of the dye accumulation in MDS (Figure 6).

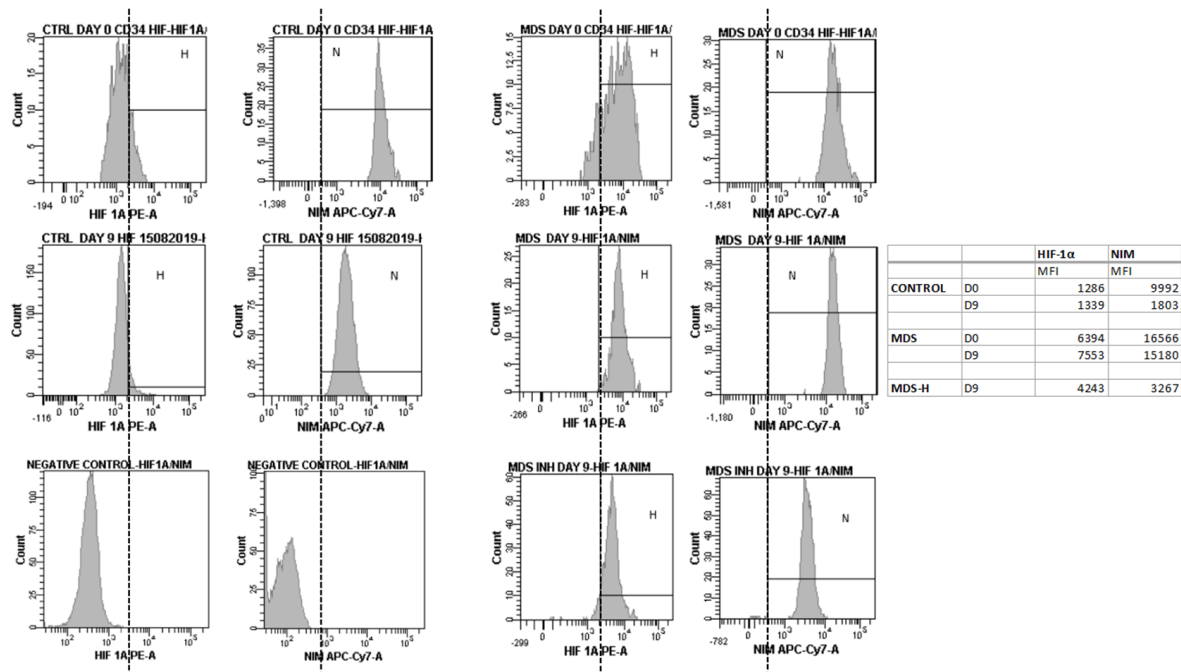


Figure 6. HIF-1 α and NIM median fluorescence intensity (MFI) plots, assessed by flow cytometry, in differentiating control and MDS CD34 $^{+}$ cells cultured in vitro under normoxic conditions. Control cells exhibit low HIF-1 α expression during differentiation, with a rather stable HIF-1 α MFI (d0: 1286, d9: 1339). MDS cells maintain higher levels of HIF-1 α expression during differentiation, even under normoxic conditions, with higher HIF1 α MFI levels compared to controls and a trend of increase in HIF-1 α MFI from d0 to d9 (d0: 6394, d9: 7553). NIM MFI tends to decrease during the normoxic culture of CD34 $^{+}$ control cells (d0: 9992, d9: 1803), while it exhibits higher levels that remain increased during the normoxic culture of MDS cells (d0:16566, d9: 15180). HIF-1 α inhibition in MDS CD34 $^{+}$ cell culture decreases the levels of NIM expression on d9 (NIM MFI 3267 vs. 15180 without inhibition). Due to NIM-IDC autofluorescence, different samples from each culture were used to assess HIF-1 α and NIM-IDC fluorescence each day.

3. Discussion

The mechanisms underlying HIF-1 stabilization in the MDS BM remain essentially elusive. The oxygen sensing α subunit of the heterodimer was found to be uniformly increased in the MDS BM myeloid lineage despite adequate oxygen perfusion. Given that even culturing MDS CD34 $^{+}$ cells in 21% FiO $_2$, which is an oxygen supply way over that of both the control and MDS BM, did not suffice to degrade HIF-1 α (Figure 6), we strongly argue toward a non-canonical pathway of intracellular dysfunction driving the over-tuned HIF-1 activity and therefore will further discuss our theories as future experimental and subsequently therapeutic targets.

Upon normal conditions, when O $_2$ is scarce, “anaerobic respiration” results in excessive free electron release, NIM reduction, and intracellular retention, making it a marker of inadequate O $_2$ perfusion [28]. However, a defective mitochondrial electron transport chain would also result in excess free electron release and would also result in NIM reduction and retention, establishing the phenomenon of pseudohypoxia [23]. Subsequent intracellular retention requires binding of the reduced molecule with glutathione (GSH) and sequential GSH oxidation to oxidized glutathione (GSSG) [29]. The depletion of GSH has been accounted for NIM effects against several solid tumors [30]. In our case, increased NIM-IDC was observed with increasing MDS severity, and it did not at least morphologically accumulate in blast cells. Moreover, the absence of NIM-IDC accumulation in BM

biopsies of control subjects obtained under the very same circumstances as those of MDS patients implies an oxygen-independent pathology (Figure 2). Given that the theory of hypoxic niches has proved rather obsolete and that both CD34+ HSCs and differentiating myeloid cell reside under uniform perfusion conditions [14,31,32], we can safely assume that the differential incorporation of NIM-IDC is in both control and MDS BMs based upon cell conditions intrinsic to each. We also observed increased DAPI/NIM-IDC colocalization directly correlating with MDS intra BM blast percentage. Colocalized areas are morphologically compatible with apoptotic nuclei, and given that the established increased apoptosis is a defining feature of MDS pathobiology [33], despite lacking adequate experimental data, we suggest that these areas correspond to apoptotic cells indeed. Indubitably, our assumption merits further investigation to be confirmed or dismissed. It is possible that segmentation of the nuclear membrane during the apoptotic process allows for the retained NIM-IDC to enter the nucleus (Figure 2 lower middle panels). In accordance with this hypothesis, our team has already established the reliance of differentiating cells of high-risk MDS on reduced GSH for survival and redox balance [34]. NIM-IDC is known to be retained intracellularly through binding with GSH and thus causing its depletion [28,31]. Given that maintenance of the redox balance, namely an increased GSH/GSSG ratio, is vital for survival in MDS myeloids, especially those from high-risk subgroups, we propose that DAPI/NIM-IDC colocalization areas refer to apoptotic nuclei of cells depleted from GSH. Under these circumstances, internalized dye entered the nucleus during the apoptotic nuclear membrane permeabilization and thus was visualized as DAPI/NIM-IDC colocalization. In such a case, corrected normalized NIM-IDC immunofluorescence largely underestimated true NIM-IDC fluorescence. Unfortunately, we could not use other fluorescent markers to establish our theory given the auto-fluorescent properties of the dye used.

While both an aberrant HIF-1 α stabilization and NIM-IDC accumulation come in agreement with the pseudohypoxic theory, whether this state is due to a primary HIF-1 α stabilization event or whether the latter is itself an epiphenomenon of an unknown etiology is still under question. In other words, is excessive mitophagy due to HIF-1 activation through a yet unidentified pathway a primary event, or does it lie upon intrinsic defects in mitochondrial respiration for instance, leading to HIF-1 stability and establishing the pseudohypoxic state? The answer may lie upon mitochondrial morphology itself. Mitochondrial morphology reflects largely mitochondrial function and kinetics [32]. Fission and fusion regulate mitochondrial mass by allowing the autophagic degradation of smaller organelles with defective complexes, while large elongated ones are rescued from degradation even after being encircled in autophagosomes inhibiting lysosome fusion [35,36]. Moreover, mitochondrial kinetics allow for ETC optimization of the surviving organelles by renewing their complexes. Notwithstanding, mitophagy that is so prominently featured in our experiments further regulates the quality of intracellular respiration [37]. The extremely disturbed mitochondrial morphology we observed in the myeloid lineage of MDS-EB1/2 denotes a secondary pseudohypoxic phenotype caused by faulty respiration and secondary HIF-1 stabilization. In fact, the elongation of the organelles in these cells is considered to be a compensatory phenomenon (Figure 4C). Our team has proved that disturbed mitochondrial function in both low and high intra BM blast percentage MDS by means of an aberrant metabolome [34]. Results of the present study come to confirm our data with the benign MDS subtypes suffering marked degradation of their dysfunctional mitochondria, leading to pseudohypoxia and HIF-1 stabilization while as disease progresses, genetic or epigenetic pressure leads to compensatory changes in mitochondrial function, and kinetics that remain faulty cause HIF-1 stability but are also rescued from degradation. Cultures we performed establish this notion (Figures 5 and 6).

HIF-1 signaling has been shown to induce autophagy either through the mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent HIF-1/REDD1 axis or through the mTOR independent BNIP3–Beclin–Bcl2 pathway [38,39]. Autophagy has multiple roles in hematopoietic stem/progenitor cell (HSPC) fate and differentiation [40]. Mitophagy reduces mitochon-

drial mass and the resultant ROS production, thus protecting HSCs from DNA damage and ensuring their quiescence [21]. In addition, during terminal neutrophil differentiation, autophagy provides energy through fatty acid oxidation by degrading lipid droplets [41]. Therefore, it is essential for HIF-1 to be degraded in order for differentiation to ensue, which explains the kinetics and morphology improvement in cultures that benefited from MDS inhibition and establishes our suggestion that its aberrant activity is secondary to a wider disturbance.

Conversely, HIF-1 mediated aberrant propagation of autophagy results in cellular death through consumption of the whole endoplasmic reticulum lipid bilayer in the process of double membrane autophagosome formation [42,43]. A novel form of Na^+ , K^+ , ATPase regulated non-apoptotic cell death, termed “autosis”, has recently been identified, which among other stimuli can be induced by hypoxic signaling [43]. Our study demonstrated increased autophagic activity in MDS myeloid cells, specifically mitochondria (Figure 4 and Supplementary Figure S4). Electron microscopy featured the morphologic criteria of autosis, which is highly suggestive of the dominant role of this phenomenon in MDS-associated cytopenias more prominently in the high intra BM blast count subgroup (Figure 4C and Supplementary Figure S4), while death in the low blast count group was mostly apoptotic compatible with energy depletion. Following HIF-1 stabilization, mitophagy ensues as mentioned, gripping the now differentiating myeloids to this deadly cycle either through overwhelming autophagy, autosis, or through apoptosis due to energy and redox depletion.

While novelty in the field of MDS research has been vividly circling around HIF-1 and managed to ascribe its contribution or even necessity in the establishment of the dyshaematopoietic phenomena [44], a solely human model has yet to be studied along with its therapeutic potential. Our *in vitro* experiments do point out that while HIF-1 may have a permissive role on dyshaematopoiesis and specifically dysmyeloipoiesis, its inhibition certainly does not suffice to rescue all MDS CD34+ myeloid primed cultures (Figure 5). All cultures from MDS-EB1/2 patients failed to even initially expand, underlining the dependence of those CD34+ cells on the BM microenvironment and confirming the epiphenomenal nature of HIF-1 α stabilization. Results in low-risk cultures were more variable and in general optimistic, unraveling a possible therapeutic role for HIF-1 inhibition in MDS associated neutropenia.

The different effect of HIF-1 α inhibition in CD34+ myeloid primed cultures from low and high-risk MDS may lie in inherent differences in major cell signaling pathways. The phosphoinositide 3-kinase (PI3K)–mTOR axis is a major pathway involved in promoting HIF-1 α transcription and translation, regardless of oxygen levels [45]. The PI3K–Akt–mTOR pathway is among one of the intracellular pathways aberrantly upregulated in AML, and its activation seems important in leukemogenesis, since it contributes to the regulation of cellular metabolism by several mechanisms, ensuring energy required for cell proliferation [46,47]. It has been shown that patients with high-risk MDS frequently show an activation of Akt compared with both low-risk MDS patients and healthy donors [48]. Activation of the Akt/mTOR pathway is critical for cell survival and proliferation in high-risk MDS, with studies showing that mTOR inhibition leads to a significant increase in apoptosis of isolated CD33+ bone marrow cells of high-risk MDS patients, which is an effect not observed in low-risk MDS [49]. Although HIF-1 α is a positively regulated downstream target of the PI3K/Akt/mTOR axis, HIF-1 α inhibition alone could not suffice to offset the effects of an extremely enhanced PI3K/Akt/mTOR signaling with multiple other downstream targets, thus explaining the expansion failure observed in our cultured CD34+ cells of high-risk MDS patients. However, inhibiting HIF-1 α in low-risk MDS CD34+, where the PI3K/Akt/mTOR signaling is dampened, seems to be effective in restoring myelopoiesis at least to some degree.

Phosphoinositide–Phospholipase C (PI-PLC) beta1 is a key enzyme implicated in signal transduction pathways, affecting cell proliferation and differentiation, possibly through the activation of Cyclin D3 [50]. The inositide signaling pathway has been correlated with response to current treatment options for MDS patients yet through different regulation

mechanisms in low and high-risk MDS. Namely, PLC β 1 upregulation impairs erythroid differentiation [51], and it has been demonstrated that in low-risk MDS patients responding to erythropoietin, the PI-PLC β 1/cyclin D3 axis is downregulated compared to no responders [52]. On the other hand, in high-risk MDS patients, the combination of azacitidine and valproic acid has demonstrated a potential increased activity by increasing PLC β [53]. This demonstrates the variable effects of treatment in the same signaling pathway, depending on the MDS subtype (low or high risk). We could assume that HIF-1 α signaling inhibition may also have different effects on cultured CD34+ cells from MDS patients with <5% and >5% bone marrow blasts through mechanisms that have not been investigated in the present study but definitely need further elucidation.

4. Materials and Methods

4.1. Study Population

BM aspiration samples, as well as BM biopsies, were collected from 16 newly diagnosed previously untreated MDS patients and seven controls with non-malignant hematologic disorder. MDS subtypes were classified according to WHO 2016 classification [1]. More specifically, the study included the following: 1 MDS with single lineage dysplasia (SLD) patient, 10 MDS with multilineage dysplasia (MLD) patients, 2 MDS with excess blasts 1 (EB1) patients, 2 MDS with excess blasts 2 (EB2) patients, and 1 MDS with isolated del5q patient. The MDS group included 4 females and 12 males with an age ranging from 63 to 90 years (median age 74 years) and the control group 4 females and 3 males with an age ranging from 40 to 83 years (median age 73 years). In the control group, BM aspiration and biopsy were performed for routine diagnostic purposes. The main characteristics of the patients are summarized in Supplementary Table S1.

4.2. BM Cell Isolation

Following patient biopsy, whole BM aspirates were tiled on top of a ficoll bilayer column (Histopaque 10771, Histopaque 11191—Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). After centrifugation, the low-density (upper) and high-density (lower) layers were isolated and washed with PBS. Optical microscopy and flow cytometry allowed characterization of the layers' cellular contents. The high-density layer contained myeloid lineage cells (morphologic characterization: promyelocytes 1.25%, myelocytes 7.75%, metamyelocytes 5.5%, band cells 5.5%, and neutrophils 80%). The percentages did not differ significantly between the control and the MDS group ($p > 0.05$, Mann–Whitney test). CD34+ were identified in the low-density layer, along with all other mononuclear BM cells. The low-density layer was used for CD34+ cell isolation using magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), per the manufacturer's instructions.

4.3. BM Cell Isolation RNA Isolation, cDNA Synthesis and qRT-PCR

CD34+ and myeloid lineage BM cells (high-density layer) were used for mRNA isolation, using a chloroform extraction protocol, and cDNA synthesis was performed (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan) qRT-PCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) for *HIF1A* and *DDIT4/REDD1* was performed as described in Supplementary Table S2.

4.4. Flow Cytometry

HIF-1 α and REDD1 protein expression, based on median fluorescence intensity (MFI), was determined in BM buffy coat cells, after red blood cells lysis (Cytognos, Salamanca, Spain). Following fixation and permeabilization (IncellID \times , San Carlos, CA, USA), intracellular labeling was performed using a mouse anti-human HIF-1 α -PE antibody (BioLegend) and polyclonal rabbit anti-human REDD1 antibody (Proteintech). A donkey anti-rabbit immunoglobulin (Ig) G (BioLegend, San Diego, CA, USA) was used as secondary antibody.

HIF-1 α and NIM MFI in cultured CD34+ BM cells was assessed on different culture days (namely day 0 and day 9). For HIF-1 α , the protocol described above was followed,

while the flow cytometric study of NIM expression was performed after direct incubation of the cultured CD34+ BM cells with the IDC labeled NIM.

BM cell populations were distinguished using anti-CD45, CD34, CD117, CD11b, CD14, and CD66b antibodies.

The flow cytometry acquisition was performed on a FACSCanto II flow cytometer.

4.5. NIM Dye-Conjugate Synthesis

The NIM dye conjugate used in this work was synthesized as previously described [54]. For each reaction step, the procedure described in the work of Pavlik et al. was followed [54]. Modifications mainly concerned workup or purification methods of the intermediates (Supplementary Table S3).

4.6. NIM Staining and Immunofluorescence in BM Biopsies

Right after the acquisition of BM biopsies, specimens were fully immersed in 200 μ M NIM solution for 10 min at 37 °C, washed twice in PBS for 1 min, and then immediately introduced to formalin. One BM biopsy incubated with indocyanine green was used as control staining for fluorescent NIM. The specimens were fixed in buffered formalin, decalcified with ethylene diamine tetraacetic acid EDTA/HCl, and embedded in paraffin. Slides with serial sections (7 μ m thick) of each sample were studied. Samples were deparaffinized with xylene and rehydrated by incubating in 100% ethanol for 5 min, 96% ethanol for 2 min, 80% ethanol for 2 min, 50% ethanol for 2 min, then in dH₂O for 1–3 min. Slides were washed in phosphate buffered saline (PBS), immersed in a citrate buffer (10 Mm, pH 6) and incubated in a microwave oven. After cooling, slides were washed in PBS and blocked with blocking solution (2% horse serum) for 45 min at room temperature. DNA was counterstained using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immunofluorescence was observed and scanned with a 10 \times and 40 \times objective using the Leica TCS-SP8 Confocal Microscope. Full bone marrow biopsies were tile-scanned, and a full bone marrow profile was constructed using 10 \times objective. Then, 60 \times close-ups were also obtained from each sample. Fluorescence intensity was calculated correcting for background artifacts for both NIM-ICS and DAPI through meticulous area of interest (ROI) circumscription. Each value obtained was thereafter standardized by division with the negative control NIM-ICS and DAPI immunofluorescence accordingly. To correct for NIM-ICS/DAPI colocalization, standardized NIM-ICS values were divided by the corresponding standardized DAPI fluorescent value. Statistical analysis of the ratios that were calculated was performed and is presented in Figure 2.

4.7. Immunofluorescence

Immunofluorescence study was performed in BM cells isolated with ficoll bilayer centrifugation. Cells from high and low density were examined separately. Cells were seeded in lysine-coated glass coverslips and cultured in roswell park memorial institute (RPMI) culture medium supplemented with 2% human serum at 37 °C and 5% CO₂ for 30 min until they attach. Then, they were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 1 h at 4 °C. Nonspecific binding sites were blocked with 5% horse serum in PBS.

For detection of autophagy in specific cell population, samples were stained with a rabbit anti-human LC3B antibody (1:300 dilution; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) along with a mouse anti-human CD34 (Agilent) or mouse anti-human MPO (Agilent, Santa Clara, CA, USA) monoclonal antibody. For further qualitative analysis of autophagy, a monoclonal mouse anti-human LAMP1 antibody (1:200 dilution; OriGene, Rockville, MD, USA) or a monoclonal mouse anti-human TOMM20 antibody (1:200 dilution; Novus Biological, Centennial, CO, USA) were used in combination with anti-LC3B. A polyclonal donkey anti-rabbit and a polyclonal goat anti-mouse antibody were used as secondary antibodies. DNA was counterstained by using DAPI. Appropriate mouse IgGs were used as negative controls. Immunofluorescence was observed and scanned with a 63 \times /1.4NA objective using the Leica TCS-SP8 Confocal Microscope.

4.8. Electron Microscopy

For conventional electron microscopy, the myeloid cells following isolation (high-density layer) were pelletized at 800 g for 5 min. Pellets were fixed with 2.5% glutaraldehyde made up in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 1 h at 4 °C. After subsequent buffer washes, pellets were embedded in 4% low-melting agarose in 0.1 M PB. Following solidification, small cubes were cut and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h on ice. After washing with the above buffer, the samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon/Araldite resin mixture. Ultrathin sections were cut with a Diatome diamond knife at a thickness of 65 nm on a Leica EM UC7 ultramicrotome (Leica Microsystems, Vienna, Austria); then, they were mounted onto 300 mesh carbon grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined with a Philips 420 Transmission Electron Microscope at an acceleration voltage of 60 kV and photographed with a Megaview G2 CCD camera (Olympus SIS, Münster, Germany).

4.9. CD34+ Cell Cultures

Following isolation, CD34+ cells (purity 91% to 98%) from 3 MDS patients with MLD, 3 MDS with EB, and 3 controls were cultured and expanded in 6-well plates (100,000 cells/well). The plates were placed in an incubator at 37 °C, with 5% CO₂, 85% humidity and 21% O₂ in the air. Cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Biosera, Metro Manila, Philippines), supplemented with 10% FBS, penicillin G (5 U/mL), and streptomycin (5 µg/mL). A staged culture protocol was performed for ex vivo expansion and differentiation as a modification of a previously published method [55], which included Stage 1 (days 0–3) and Stage 2 (days 4–16). For each stage, different combinations of growth factors and cytokines were supplemented to the culture media. The combination used were as follows: for Stage 1 (days 0–3), stem cell factor (SCF) 100 µg/mL (PeproTech, Rocky Hill, CT, USA), interleukin (IL)-3 10 ng/mL (PeproTech, Rocky Hill, CT, USA), fms like tyrosine kinase 3 ligand (FLT-3L) 100 ng/mL (PeproTech, Rocky Hill, CT, USA), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 75 ng/mL (PeproTech, Rocky Hill, CT, USA), granulocyte, monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) 15 ng/mL (PeproTech, Rocky Hill, CT, USA), and for Stage 2 (days 4–16), SCF 100 ng/mL, FLT-3L 100 ng/mL, and G-CSF 100 ng/mL. Fresh cytokines were replaced every three days. For HIF-1 inhibition, CD34+ cultures were performed under the same conditions described above with the addition of 10 µM HIF-1α inhibitor (methyl 3-[[2-[4-(2-adamantyl)phenoxy]acetyl]amino]-4-hydroxybenzoate, Santa Cruz Biotechnology) from day 0. Cell numbers and morphological characteristics were determined every three days using an automated cell counting system (Coulter, Brea, CA, USA) and cell cytopins stained with May–Grunwald–Giemsa reagents (Merck, Kenilworth, NJ, USA) respectively.

4.10. Statistics

Statistical analyses were performed using Mann–Whitney tests non-parametric tests. All data were analyzed using GraphPad Prism v8 software (San Diego, CA USA, www.graphpad.com, accessed on 10 April 2021). Data are presented as mean ± SD. Differences considered statistically significant at $p < 0.05$ level.

5. Conclusions

In this study, we experimentally test the hypothesis of an aberrant, non-canonical, oxygen-independent HIF-1 activity as a prominent feature of the MDS pathobiology along with its potential as a therapeutic target. We conclude that although HIF-1α is aberrantly expressed and non-canonically regulated in all MDS irrespective of intra BM blast percentage, at least when referring to the myeloid lineage, its expression is most likely the result of a global HSCs interruption with variable contribution in the disease establishment and evolution. Its therapeutic targeting is probably of limited potential and mainly confined to MDS with low blast percentage. Overall, our work suggests that the MDS BM is a holistically disrupted nest of faulty CD34+ HSCs, which start differentiating surrounded

by a dysfunctional microenvironment that eventually dictates their premature death or malignant transformation. We show that pseudohypoxia most likely due to mitochondrial dysfunction is evidently present in all MDS subtypes. While MDS with excess blasts ($\geq 5\%$) demonstrate a pseudohypoxic phenotype caused by faulty respiration, as featured by their pathologic mitochondrial morphology, benign MDS with $< 5\%$ blasts acquire the same pseudohypoxic phenotype due to the marked degradation of their dysfunctional mitochondria. This mitochondrial dysfunction induces a secondary HIF-1 α stabilization and sequentially causes NIM-IDC accumulation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22084099/s1>, Table S1: MDS patient characteristics, Table S2: Primer sequences for qRT PCR, Table S3: Synthesis of NIM dye conjugate, Figure S1: (A) HIF1A and REDD1 mRNA expression in CD34+ and myeloid cells of MDS patients (n = 16) and controls (n = 7) (B) REDD1 mRNA expression in vitro cultures of CD34+ cells after 16 days of differentiation. Figure S2: Immunofluorescence for CD34 and LC3B in one control and one MDS sample, Figure S3: Electron microscopy of normal differentiating myeloid lineage (control sample) at the myelocyte–metamyelocyte stage, Figure S4: Electron microscopy of mature MDS myeloid lineage showing marked autophagy, mitophagy, and eventual autophagic cell death (autosis) with cytoplasmic abundance of autophagosomes and perinuclear membrane convolution, Figure S5: Immunofluorescence of LC3B and LAMP-1 in myeloid cells of control (CTRL-A) and MDS (B and C) patients.

Author Contributions: Conceptualization, I.E.S., A.P., K.R., S.G. and M.V.; Data curation, I.E.S., K.K. and A.P.; Formal analysis, A.P. and A.D.; Funding acquisition, G.P.P., A.G.T. and M.V.; Investigation, I.E.S., K.K., T.K., A.D., V.V., V.M., I.K., E.X., S.N.P. and L.P.; Methodology, K.K., A.P., S.G. and M.V.; Project administration, S.G. and M.V.; Resources, I.E.S., S.G. and M.V.; Supervision, S.G. and M.V.; Validation, I.E.S., A.P., S.G. and M.V.; Visualization, K.K., A.P. and A.D.; Writing—original draft, I.E.S., A.P. and S.G.; Writing—review and editing, I.E.S., A.P., S.G. and M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported in part by research funding from the Special Account for Research Grants of National and Kapodistrian University of Athens, and the Hellenic Society of Hematology to M.V. This study was also partially supported by a European Commission grant (H2020-668353) to G.P.P.

Institutional Review Board Statement: The study protocol is in accordance with the Declaration of Helsinki and has been approved by the ethics review board of Athens General Hospital “Laiko” REF. NO.: 13011, 05/10/2017 SC.: 1300.

Informed Consent Statement: A written informed consent was obtained from each individual participating in the study.

Acknowledgments: We would like to thank the members of the Hellenic Pasteur Institute Light Microscopy Unit and the members of the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens Biological Imaging Unit, for their help with microscopy work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References





1. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M.J.; Le Beau, M.M.; Bloomfield, C.D.; Cazzola, M.; Vardiman, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2391–2405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hofmann, W.K.; Koeffler, H.P. Myelodysplastic syndrome. *Annu. Rev. Med.* **2005**, *56*, 1–16. [[CrossRef](#)]
3. Hsu, J.; Reilly, A.; Hayes, B.J.; Clough, C.A.; Konnick, E.Q.; Torok-Storb, B.; Gulsuner, S.; Wu, D.; Becker, P.S.; Keel, S.B.; et al. Reprogramming identifies functionally distinct stages of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2019**, *134*, 186–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mossner, M.; Jann, J.C.; Wittig, J.; Nolte, F.; Fey, S.; Nowak, V.; Obländer, J.; Pressler, J.; Palme, I.; Xanthopoulos, C.; et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* **2016**, *128*, 1246–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Papaemmanuil, E.; Gerstung, M.; Malcovati, L.; Tauro, S.; Gundem, G.; Van Loo, P.; Yoon, C.J.; Ellis, P.; Wedge, D.C.; Pellagatti, A.; et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2013**, *122*, 3616–3627, quiz 3699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Steensma, D.P.; Bejar, R.; Jaiswal, S.; Lindsley, R.C.; Sekeres, M.A.; Hasserjian, R.P.; Ebert, B.L. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **2015**, *126*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Acuna-Hidalgo, R.; Sengul, H.; Steehouwer, M.; van de Vorst, M.; Vermeulen, S.H.; Kiemeny, L.; Veltman, J.A.; Gilissen, C.; Hoischen, A. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, *101*, 50–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Masala, E.; Valencia-Martinez, A.; Pillozzi, S.; Rondelli, T.; Brogi, A.; Sanna, A.; Gozzini, A.; Arcangeli, A.; Sbarba, P.D.; Santini, V. Severe hypoxia selects hematopoietic progenitors with stem cell potential from primary Myelodysplastic syndrome bone marrow cell cultures. *Oncotarget* **2018**, *9*, 10561–10571. [[CrossRef](#)]
9. Thompson, J.E.; Conlon, J.P.; Yang, X.; Sanchez, P.V.; Carroll, M. Enhanced growth of myelodysplastic colonies in hypoxic conditions. *Exp. Hematol.* **2007**, *35*, 21–31. [[CrossRef](#)]
10. Ito, K.; Bonora, M.; Ito, K. Metabolism as master of hematopoietic stem cell fate. *Int. J. Hematol.* **2019**, *109*, 18–27. [[CrossRef](#)]
11. Kohli, L.; Passegué, E. Surviving change: The metabolic journey of hematopoietic stem cells. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 479–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Suda, T.; Takubo, K.; Semenza, G.L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem. Cell* **2011**, *9*, 298–310. [[CrossRef](#)]
13. Zhang, C.C.; Sadek, H.A. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 1891–1901. [[CrossRef](#)]
14. Takubo, K.; Goda, N.; Yamada, W.; Iriuchishima, H.; Ikeda, E.; Kubota, Y.; Shima, H.; Johnson, R.S.; Hirao, A.; Suematsu, M.; et al. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem. Cell* **2010**, *7*, 391–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Liu, W.; Shen, S.M.; Zhao, X.Y.; Chen, G.Q. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *3*, 165–178.
18. Lu, H.; Forbes, R.A.; Verma, A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 23111–23115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Semenza, G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* **2007**, *405*, 1–9. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, H.; Bosch-Marce, M.; Shimoda, L.A.; Tan, Y.S.; Baek, J.H.; Wesley, J.B.; Gonzalez, F.J.; Semenza, G.L. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10892–10903. [[CrossRef](#)]
21. Yang, C.; Suda, T. Hyperactivated mitophagy in hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 2–3. [[CrossRef](#)]
22. Shoshani, T.; Faerman, A.; Mett, I.; Zelin, E.; Tenne, T.; Gorodin, S.; Moshel, Y.; Elbaz, S.; Budanov, A.; Chajut, A.; et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 2283–2293. [[CrossRef](#)]
23. Hayashi, Y.; Yokota, A.; Harada, H.; Huang, G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 1510–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Iommarini, L.; Porcelli, A.M.; Gasparre, G.; Kurelac, I. Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 286. [[CrossRef](#)]
25. Klionsky, D.J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M.J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A.; Adachi, H.; Adams, C.M.; Adams, P.D.; Adeli, K.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **2016**, *12*, 1–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kishi-Itakura, C.; Buss, F. The Use of Correlative Light-Electron Microscopy (CLEM) to Study PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1759*, 29–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Gustafson, M.P.; Lin, Y.; Maas, M.L.; Van Keulen, V.P.; Johnston, P.B.; Peikert, T.; Gastineau, D.A.; Dietz, A.B. A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Nunn, A.; Linder, K.; Strauss, H.W. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur. J. Nucl. Med.* **1995**, *22*, 265–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Takanuki, K.; Igarashi, T.; Hata, K.; Hori, H.; Shibata, T.; Kitagawa, H.; Satoh, T.; Inayama, S. Glutathione depletion by 2-nitroimidazole-1-acetohydroxamic acid as a radiosensitizer in hypoxic rat hepatocytes. *Biochem. Int.* **1988**, *17*, 155–162.
30. Liu, K.; Zhu, H.L. Nitroimidazoles as anti-tumor agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 687–691. [[CrossRef](#)]
31. Krohn, K.A.; Link, J.M.; Mason, R.P. Molecular imaging of hypoxia. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (Suppl. 2), 129s–148s. [[CrossRef](#)]
32. Westrate, L.M.; Drocco, J.A.; Martin, K.R.; Hlavacek, W.S.; MacKeigan, J.P. Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95265. [[CrossRef](#)]

33. Michaela, F.; Emmanuel, G. Apoptotic pathways to death in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **2008**, *93*, 1288–1292. [[CrossRef](#)]
34. Poulaki, A.; Katsila, T.; Stergiou, I.E.; Giannouli, S.; Gómez-Tamayo, J.C.; Piperaki, E.T.; Kambas, K.; Dimitrakopoulou, A.; Patrinos, G.P.; Tzioufas, A.G.; et al. Bioenergetic Profiling of the Differentiating Human MDS Myeloid Lineage with Low and High Bone Marrow Blast Counts. *Cancers* **2020**, *12*, 3520. [[CrossRef](#)]
35. Twig, G.; Hyde, B.; Shirihai, O.S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1777*, 1092–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A.J.A.; Mohamed, H.; Wikstrom, J.D.; Walzer, G.; Stiles, L.; Haigh, S.E.; Katz, S.; Las, G.; et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **2008**, *27*, 433–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liesa, M.; Shirihai, O.S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 491–506. [[CrossRef](#)]
38. Brugarolas, J.; Lei, K.; Hurley, R.L.; Manning, B.D.; Reiling, J.H.; Hafen, E.; Witters, L.A.; Ellisen, L.W.; Kaelin, W.G., Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2893–2904. [[CrossRef](#)]
39. Bellot, G.; Garcia-Medina, R.; Gounon, P.; Chiche, J.; Roux, D.; Pouyssegur, J.; Mazure, N.M. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell Biol.* **2009**, *29*, 2570–2581. [[CrossRef](#)]
40. Riffelmacher, T.; Simon, A.-K. Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation. *FEBS J.* **2017**, *284*, 1008–1020. [[CrossRef](#)]
41. Riffelmacher, T.; Clarke, A.; Richter, F.C.; Stranks, A.; Pandey, S.; Danielli, S.; Hublitz, P.; Yu, Z.; Johnson, E.; Schwerd, T.; et al. Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity* **2017**, *47*, 466–480.e465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Liu, Y.; Levine, B. Autosis and autophagic cell death: The dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 367–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, Y.; Shoji-Kawata, S.; Sumpter, R.M., Jr.; Wei, Y.; Ginet, V.; Zhang, L.; Posner, B.; Tran, K.A.; Green, D.R.; Xavier, R.J.; et al. Autosis is a Na⁺/K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20364–20371. [[CrossRef](#)]
44. Hayashi, Y.; Zhang, Y.; Yokota, A.; Yan, X.; Liu, J.; Choi, K.; Li, B.; Sashida, G.; Peng, Y.; Xu, Z.; et al. Pathobiological Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1438–1457. [[CrossRef](#)]
45. Agani, F.; Jiang, B.H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: Novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 245–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Braccini, L.; Ciraolo, E.; Martini, M.; Pirali, T.; Germena, G.; Rolfo, K.; Hirsch, E. PI3K keeps the balance between metabolism and cancer. *Adv. Biol. Regul.* **2012**, *52*, 389–405. [[CrossRef](#)]
47. Nepstad, I.; Hatfield, K.J.; Grønningsæter, I.S.; Reikvam, H. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2907. [[CrossRef](#)]
48. Nyåkern, M.; Tazzari, P.L.; Finelli, C.; Bosi, C.; Follo, M.Y.; Grafone, T.; Piccaluga, P.P.; Martinelli, G.; Cocco, L.; Martelli, A.M. Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* **2006**, *20*, 230–238. [[CrossRef](#)]
49. Follo, M.Y.; Mongiorgi, S.; Bosi, C.; Cappellini, A.; Finelli, C.; Chiarini, F.; Papa, V.; Libra, M.; Martinelli, G.; Cocco, L.; et al. The Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signal Transduction Pathway Is Activated in High-Risk Myelodysplastic Syndromes and Influences Cell Survival and Proliferation. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4287–4294. [[CrossRef](#)]
50. Faenza, I.; Matteucci, A.; Manzoli, L.; Billi, A.M.; Aluigi, M.; Peruzzi, D.; Vitale, M.; Castorina, S.; Suh, P.G.; Cocco, L. A role for nuclear phospholipase C β 1 in cell cycle control. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30520–30524. [[CrossRef](#)]
51. Manzoli, L.; Billi, A.M.; Gilmour, R.S.; Martelli, A.M.; Matteucci, A.; Rubbini, S.; Weber, G.; Cocco, L. Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: Tiazofurin down-regulates phospholipase C β 1. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2978–2980. [[PubMed](#)]
52. Follo, M.Y.; Mongiorgi, S.; Clissa, C.; Paolini, S.; Martinelli, G.; Martelli, A.M.; Fioravanti, G.; Manzoli, L.; Finelli, C.; Cocco, L. Activation of nuclear inositide signalling pathways during erythropoietin therapy in low-risk MDS patients. *Leukemia* **2012**, *26*, 2474–2482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Follo, M.Y.; Finelli, C.; Mongiorgi, S.; Clissa, C.; Chiarini, F.; Ramazzotti, G.; Paolini, S.; Martinelli, G.; Martelli, A.M.; Cocco, L. Synergistic induction of PI-PLC β 1 signaling by azacitidine and valproic acid in high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2011**, *25*, 271–280. [[CrossRef](#)]
54. Pavlik, C.; Biswal, N.C.; Gaenzler, F.C.; Morton, M.D.; Kuhn, L.T.; Claffey, K.P.; Zhu, Q.; Smith, M.B. Synthesis and fluorescent characteristics of imidazole-indocyanine green conjugates. *Dyes Pigment.* **2011**, *89*, 9–15. [[CrossRef](#)]
55. Jie, Z.; Zhang, Y.; Wang, C.; Shen, B.; Guan, X.; Ren, Z.; Ding, X.; Dai, W.; Jiang, Y. Large-scale ex vivo generation of human neutrophils from cord blood CD34⁺ cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Bioenergetic Profiling of the Differentiating Human MDS Myeloid Lineage with Low and High Bone Marrow Blast Counts

Aikaterini Poulaki ^{1,2,†}, Theodora Katsila ^{3,†}, Ioanna E. Stergiou ¹, Stavroula Giannouli ^{2,*}, Jose Carlos Gómez-Tamayo ⁴, Evangelia-Theophano Piperaki ⁵, Konstantinos Kambas ^{1,6}, Aglaia Dimitrakopoulou ⁷, George P. Patrinos ⁸, Athanasios G. Tzioufas ¹ and Michael Voulgarelis ^{1,*}

¹ Department of Pathophysiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 115 27 Athens, Greece; aikaterini.poulaki@gmail.com (A.P.); stergiouioanna@hotmail.com (I.E.S.); kkampas@hotmail.com (K.K.); agtzi@med.uoa.gr (A.G.T.)

² Second Department of Internal Medicine, Hematology Unit, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 115 27 Athens, Greece

³ Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, 116 35 Athens, Greece; thkatsila@eie.gr

⁴ Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; josecarlosgt@gmail.com

⁵ Department of Microbiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 115 27 Athens, Greece; epiper@med.uoa.gr

⁶ Laboratory of Molecular Genetics, Department of Immunology, Hellenic Pasteur Institute, 115 21 Athens, Greece

⁷ Laboratory of Flow Cytometry, Immunology Department, Laiko Hospital of Athens, 115 26 Athens, Greece; liladim1@hotmail.com

⁸ Department of Pharmacy, University of Patras, 265 02 Patras, Greece; gpatrinos@upatras.gr

* Correspondence: stgiannouli@gmail.com (S.G.); mvoulgar@med.uoa.gr (M.V.); Tel.: +30-698-4070242 (S.G.); +30-210-7462647 (M.V.)

† These authors contributed equally to this paper.

Received: 23 September 2020; Accepted: 20 November 2020; Published: 26 November 2020



Simple Summary: Myelodysplastic syndromes (MDS) encompass a very heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell differentiation disorders with malignant potential, an elusive pathobiology, and a poor prognosis. Given that the bioenergetic profile of the hematopoietic precursors is central to their effective differentiation, we investigated the metabolic status of a human differentiating MDS bone marrow-derived myeloid lineage. Our findings suggest that a perturbed metabolism underlies the syndrome's pathogenesis and also determines the disease severity. We also propose that these bioenergetic alterations are essentially featured in and indeed drive the process of leukemic transformation. Our data not only offer novel insight into the elusive MDS pathophysiology, but also change our viewpoint on MDS-related acute myeloid leukemia biology.

Abstract: Myelodysplastic syndromes (MDS) encompass a very heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell differentiation disorders with malignant potential and an elusive pathobiology. Given the central role of metabolism in effective differentiation, we performed an untargeted metabolomic analysis of differentiating myeloid lineage cells from MDS bone marrow aspirates that exhibited <5% (G1) or ≥5% (G2) blasts, in order to delineate its role in MDS severity and malignant potential. Bone marrow aspirates were collected from 14 previously untreated MDS patients (G1, $n = 10$ and G2, $n = 4$) and age matched controls ($n = 5$). Following myeloid lineage cell isolation, untargeted mass spectrometry-based metabolomics analysis was performed. Data were processed and

analyzed using Metabokit. Enrichment analysis was performed using Metaboanalyst v4 employing pathway-associated metabolite sets. We established a bioenergetic profile coordinated by the Warburg phenomenon in both groups, but with a massively different outcome that mainly depended upon its group mitochondrial function and redox state. G1 cells are overwhelmed by glycolytic intermediate accumulation due to failing mitochondria, while the functional electron transport chain and improved redox in G2 compensate for Warburg disruption. Both metabolomes reveal the production and abundance of epigenetic modifiers. G1 and G2 metabolomes differ and eventually determine the MDS clinical phenotype, as well as the potential for malignant transformation.

Keywords: myelodysplastic syndrome; metabolomics; acute myeloid leukemia; epigenetics; Warburg effect; redox; redox ratios; mitochondria; mitochondrial uncoupling

1. Introduction

Every aspect of the cellular life cycle from quiescence to terminal differentiation and regulated cell death to cancerous transformation is defined by a continuous interplay between the genome and metabolome [1,2]. Proteins arbitrate such interactions by facilitating metabolic reactions while being regulated and simultaneously regulating transcriptional and metabolic processes. Acetylation [3]; Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)-dependent deacetylases; sirtuins [4]; the oncometabolite 2-Hydroxyglutarate (2HG) [5], which is notorious for its inhibitory effects upon dioxygenases; and the global methyl-group donor S-adenosyl-methionine (SAM) [6] are only a few of the countless interconnections that exist between metabolism and gene expression [1,7]. By manipulating the epigenetic modifiers, malignant cells rapidly adjust to their altering microenvironment, and their adaptation is translated into their metastatic potential [2,8].

In de novo occurring acute myeloid leukemia (AML), aberrations in transcription-related genes cause deregulation of the cell cycle and lead to leukemic transformation [9]. However, when AML develops on myelodysplastic grounds, no specific mutations have been identified [10]. Furthermore, the disease has a much worse prognosis, being mostly chemo-resistant [11]. We therefore investigated the sequence of events that transform healthy hematopoietic precursors to those presenting initially dysplastic, yet eventually blastic, offspring. The aberrant expression of Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1) in all differentiating myeloid lineage cells, even neutrophils and bands (I.E.S. and K.K. unpublished data, 2020) [12], indicated that metabolism may indeed play a crucial role in myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS-related AML pathogenesis [13]. HIF1-induced metabolic reprogramming consists of a finely tuned network of extramitochondrial catabolism of glucose, despite adequate oxygen perfusion (the Warburg effect), coupled with an adequate mitochondrial function to reinstate redox balance [14]. The mitochondrial function can be broken down into two main and tightly interwoven complex biochemical processes: the Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) and the accompanying OXidative PHOSphorylation (OXPHOS). The TCA cycle involves the cyclic oxidation of acetyl-CoA, resulting in the production of several intermediates (anabolic reactions), along with the major reducing equivalents NADH and FADH₂, with both functioning as electron donors during OXPHOS [15,16]. OXPHOS is the process in which ATP is formed as a result of electron transfer from NADH or FADH₂ to O₂ by a series of electron carriers, also known as the mitochondrial electron transport chain (ETC) [16].

We reached the intriguing conclusion that in the MDS bone marrow (BM) microenvironment, metabolic dysregulation probably occurs and most likely majorly affects hematopoietic precursor differentiation [17]. Their resultant death is described as the ineffective erythropoiesis of MDS. The ongoing metabolic stress eventually shapes cell life, adjusting it to a new environment in a unique natural selection model. Many cells die in the process, but those which survive transform into leukemic blasts and further establish a high BM blast count MDS profile. The blasts shaped through

such a strenuous process possess impressive adaptive capabilities that are largely reflected in the chemo-resistant nature of MDS-related AML.

In this study, we present the theory outlined above that was shaped through a metabolomic analysis of differentiating myeloid lineage cells from MDS BM aspirates. Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing <5% blasts (Group 1, G1) were compared to their counterparts isolated from MDS BM aspirates containing $\geq 5\%$ blasts (Group 2, G2). G1 and G2 were also compared to differentiating myeloids from control BM aspirates.

2. Results

The bioenergetic status of isolated BM myeloid lineage cells from MDS patients with <5% ($n = 10$; 1 MDS-SLD, 8 MDS-MLD, 1 MDS-del5q, Group 1 (G1)) and >5% BM blasts ($n = 4$; 2 MDS-EB1, 2 MDS-EB2, Group 2 (G2)) were compared to those of controls ($n = 5$), as well as with one another. MDS metabolotypes indicate distinct clusters for patients (high- and low-BM blast count MDS) and non-MDS individuals, establishing the adequacy and normality of the sample selection process (Figure 1).

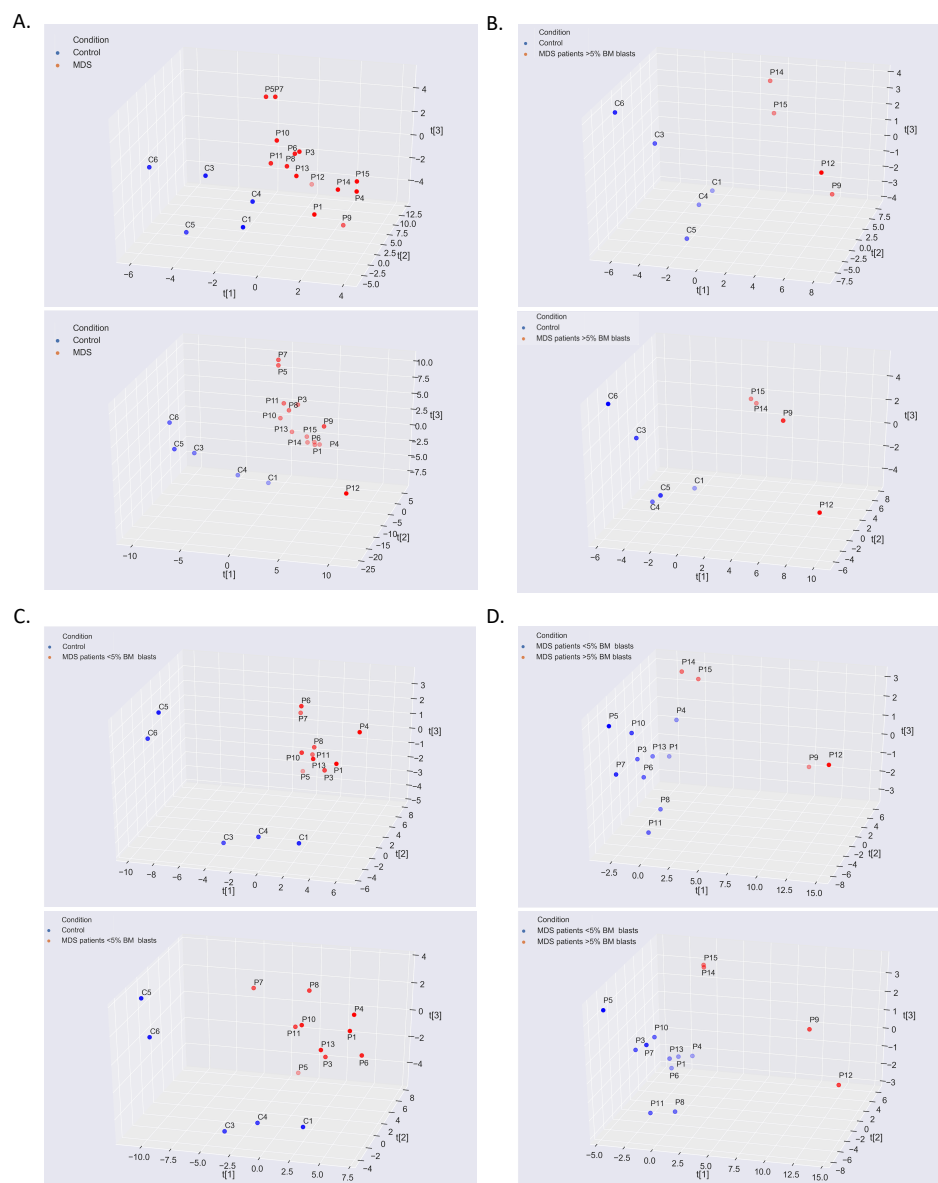


Figure 1. Myelodysplastic syndrome (MDS) metabolotypes indicate distinct clusters for patients (high-

and low-blast count MDS) and non-MDS individuals. Log2fold calculation and partial least squares (PLS) analysis were performed for (A) MDS vs. control metabolome, (B) G2 vs. control metabolome, (C) G1 vs. control metabolome, and (D) G1 vs. G2 metabolome. Upper panels correspond to negative ion mode datasets, whereas lower panels represent positive ion mode datasets (positive and negative ion modes were employed during liquid chromatography mass spectrometry analysis for metabolite characterization). G1: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS bone marrow (BM) aspirates containing <5% blasts. G2: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing \geq 5% blasts.

2.1. The Warburg Effect and Its Branches in the MDS Metabolome

Given the aberrant HIF1 activity in MDS, the Warburg effect, which describes the complete anaerobic oxidation of the glucose carbonic backbone, despite adequate oxygen perfusion [14], occurs in both MDS groups (G1 and G2). When comparing the MDS metabolome to that of control cells, Glucose-6-Phosphate (upper glycolysis) was found to be significantly increased (Figure 2A), while Glycerol-3-Phosphate was also upregulated in MDS containing <5% blasts vs. control cells (Figure S1A). However, as MDS differentiating cells perform Warburg glycolysis, we failed to establish significant differences between G1 and G2 groups regarding key Warburg metabolites. Furthermore, the major glycolysis branching pathway—the Pentose Phosphate Pathway (PPP) [14,18]—was significantly upregulated in the MDS group, as shown by an increase of PPP metabolites (6-Phosphogluconic, Gluconic acid), Inosine MonoPhosphate (IMP), and pyrimidine nucleotides, when compared to control cells (Figure 2A). One Carbon transfer (1C) cycle, representing another branch of upper glycolysis [18], was also significantly upregulated in the MDS metabolome; to name a few, SAM, S-Adenosyl Homocysteine (SAH), methionine, glycine, Cytidine DiPhosphate(CDP)-choline, and histidine metabolism stand out (Figure 2D). Branching from upper glycolysis, the pathway of de novo phospholipid synthesis (Cytidine 2',3'-cyclic monophosphoric acid (CMP), CDP-choline) was deregulated in MDS, particularly in the G2 group (Figures 2B and 3).

To assess the redox state of G1 and G2 groups, we determined key metabolic ratios (Table 1). This is a common practice when exploring the redox potential and bioenergetics to ensure maximum data reliability, instead of single metabolite calculations. Metabolic perturbations of interest, herein, were revealed upon data comparisons juxtaposing individual ratios per case. Engagement in Warburg glycolysis was established and further supported by a markedly increased ADP/ATP ratio, as well as a decreased pyruvate/lactate ratio, in both G1 and G2 vs. control sample comparisons (Table 1). Failure to establish a significant difference in lactate levels is probably due to the shunting of this metabolite outside the cell [19]. We established Warburg glycolysis in both G1 and G2 groups (Figures 2 and 3). Unlike glycolysis and its major branching pathways PPP and 1C, every other aspect of cellular metabolism differed greatly with MDS severity.

Table 1. Important metabolic ratios that decipher the MDS metabolome.

Ratios	G1 vs. Controls	G2 vs. Controls	G1 vs. G2
NAD ⁺ /NADH	3.76	0.97	0.41
ADP/ATP	6.82	26.01	0.95
Citrate/aKG	12.45	3.77	0.38
GSH/GSSG	0.86	3.35	3.87
NADP ⁺ /NADPH	1.21	0.25	0.21
FAD/FADH ₂	2.19	2.94	2.22
NADH/FADH ₂	1.02	1.34	0.48
Pyruvate/Lactate	0.97	0.83	2.31

G1: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing textless 5% blasts.
G2: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing \geq 5% blasts.

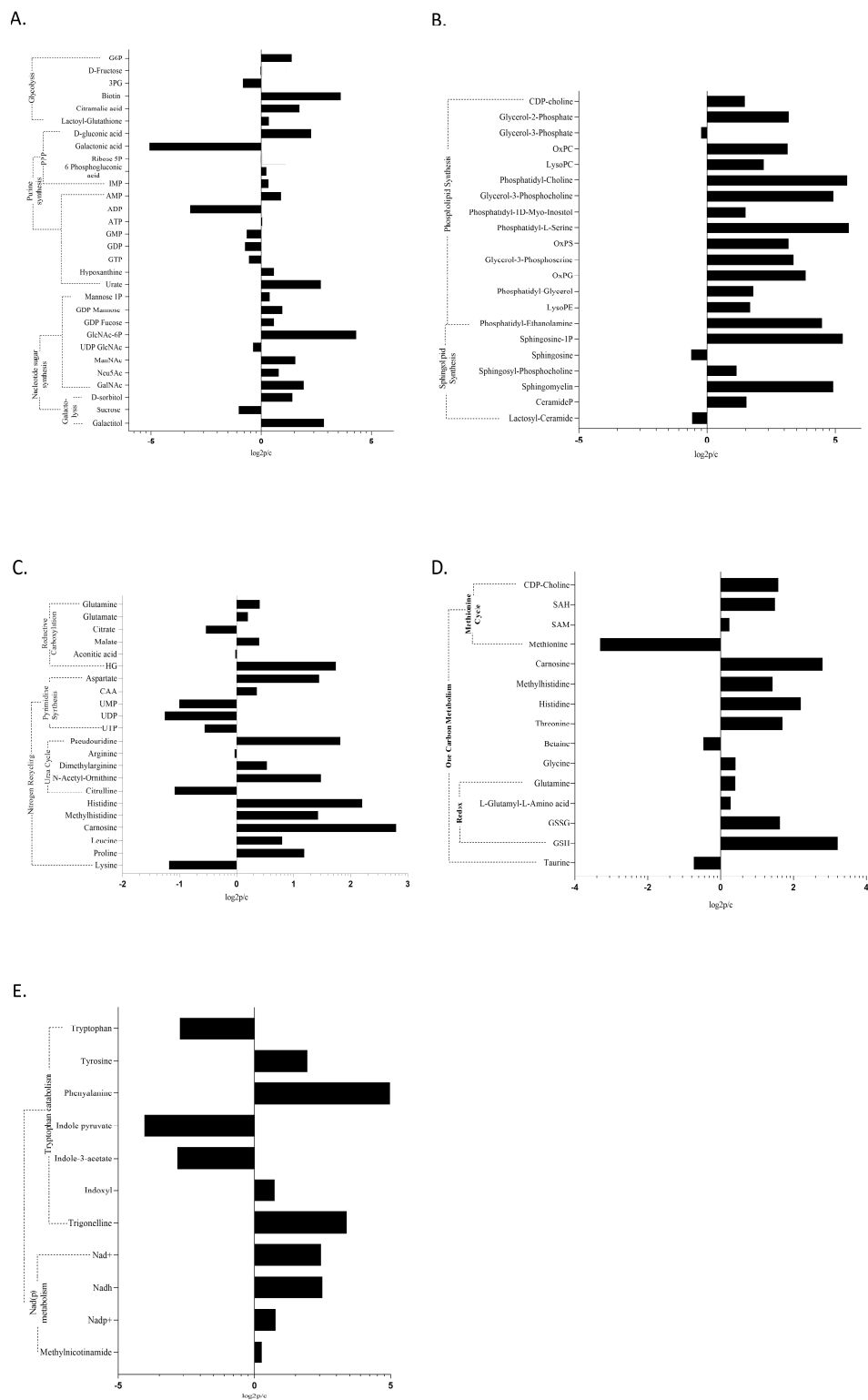


Figure 2. Modulation of metabolites in MDS myeloid cells compared to controls per metabolic pathway: (A) The Warburg effect by means of each immediate branching pathway; (B) sphingolipid and phospholipid metabolism; (C) nitrogen recycling and reductive carboxylation; (D) One Carbon transfer metabolism; and (E) nicotinate and nicotinamide metabolism. Data were processed using MetaboKit [20]. A threshold of a minimum of three samples expressing a given metabolite was set against data sparsity. Missing data were annotated with a small value (1). Data tables were scaled by data centering and setting the unit variance. Both datasets were merged in a unique data table by

taking into account the maximum absolute log2fold values when a metabolite was found in both datasets. Data represent log2fold change, $p < 0.05$. G6P: Glucose-6-Phosphate; 3-PG: 3-Phosphoglycerate; 6GP acid: 6-phosphogluconic acid; IMP: inosine monophosphate; AMP: adenosine monophosphate; ATP: adenosine triphosphate; GMP: guanosine monophosphate; GDP: guanosine diphosphate; GTP: guanosine triphosphate; GlcNAc-6P: N-acetylglucosamine-6-Phosphate; ManNAc: N-acetyl-D-mannosamine; Neu5Ac: 5-acetyl-neuraminate; GalNAc: N-acetyl-galactosamine; SAH: S-adenosyl-homocysteine; SAM: S-adenosyl-methionine; GSSG: glutathione disulfide; GSH: glutathione; oxPC: oxidized phosphatidyl-choline; oxPS: oxidized phosphatidyl-serine; oxPG: oxidized phosphatidyl-glycerol; PE: phosphatidyl-ethanolamine; HG: hydroxyglutarate; CAA: carbamoyl-aspartic acid; UMP: uridine monophosphate; UDP: uridine diphosphate; and UTP: uridine triphosphate.

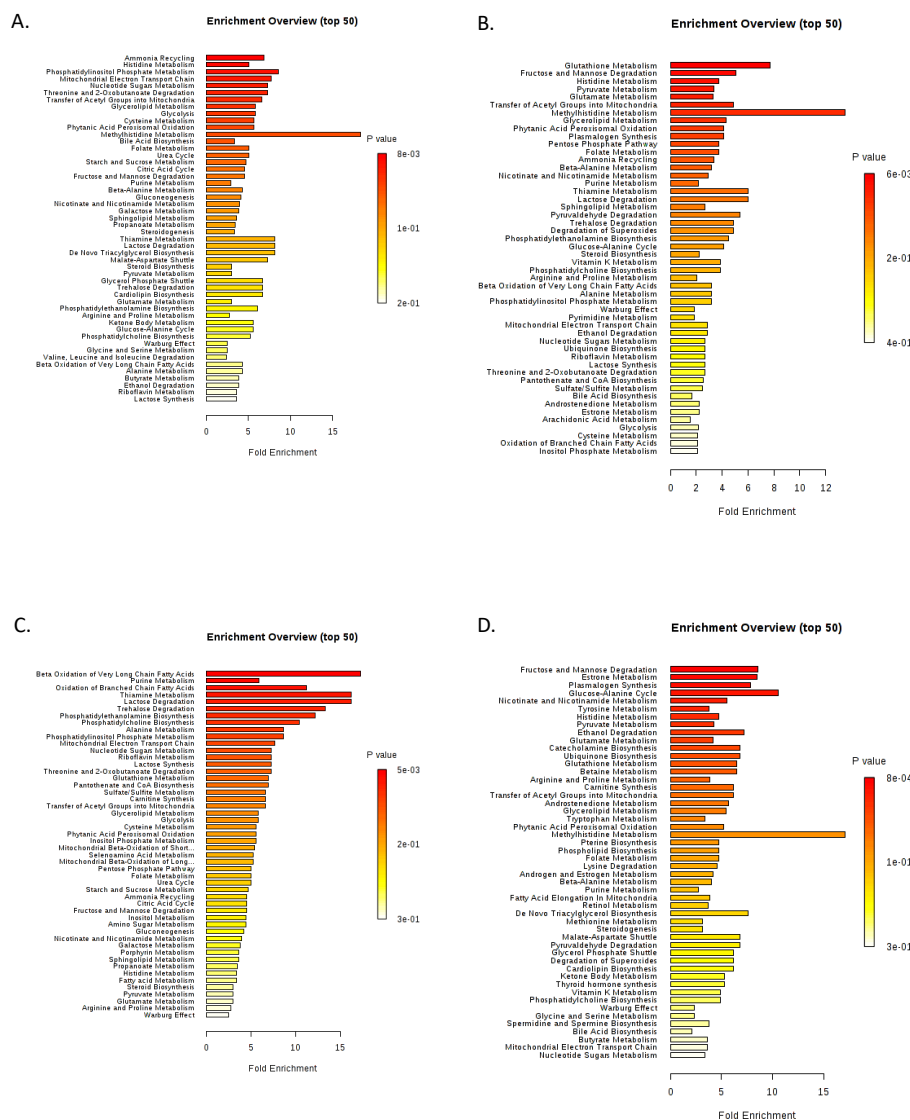


Figure 3. Excessive metabolic dysregulation is present in myeloid cells of MDS patients. Metabolite set enrichment analysis (MSEA) was carried out by MetaboAnalyst (v4.0). Enriched pathways were ranked by significance (see color scale) calculated by the MetPa method implemented in MetaboAnalyst (v4.0). (A) MDS vs. control metabolome, (B) G2 vs. control metabolome, (C) G1 vs. control metabolome, and (D) G1 vs. G2 metabolome. G1: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing <5% blasts. G2: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing ≥5% blasts.

2.2. The MDS Metabolome Is Dominated by Fat, While the BM Blast Count Delineates the Lipid Origin and Degradation Pathway

The most prominent feature in the MDS metabolome is lipids. Almost all metabolites that were deregulated enough to survive our statistical strictness were associated with fatty acid (and in general, lipid) metabolism (Figure 3). To be soluble in the predominantly aquatic cytoplasm, lipids are enzymatically conjugated with a hydrophilic phosphoric head, forming phospholipids. Phospholipids, including Phosphoethanolamines, Phosphatidylethanolamines (PE), Phosphatidylserines (PS), Phosphatidylinositols (PI), Phosphatidylcholines (PC), and Phosphatidylglycerol (PG), accompanied by medium, long, very long, and branched chain fatty acids were extremely upregulated in the MDS metabolome (Figure 2B). Notwithstanding, the origin and the number and type of lipids differed greatly between G1, G2, and control groups. Phospholipid upregulation became apparent in the G2 metabolome (vs. control). G1 exhibited pronounced lipid deregulation (PC, PE, monoeladin, Very Long Chain Fatty Acids (VLCFAs), and Branched Chain Fatty Acids (BCFAs)) when compared to G2 or control samples. Medium and long chain Fatty Acids (FAs) were more prominent in the G2 metabolome than that of G1.

VLCFAs/BCFAs oxidation was found to be among the most deregulated pathways when the G1 metabolome was compared to that of control samples (Figure 2C), while a significant upregulation of carnitines (palmitoyl-, oleoyl-, and propionyl-carnitine) was obtained when the G2 metabolome was compared to either control (Figure 3B) or G1 samples (Figure 3D). Beta-oxidation of long chain FAs, as well as the transfer of Acyl-groups, with both involving functional mitochondria, were also observed in the G2 metabolome [21]. Such findings imply that beta oxidation also occurs in G1 cells, but most likely outside mitochondria inside peroxisomes, as VLCFAs and BCFAs preferentially undergo peroxisomal degradation [21,22]. Of note, carnitines, including palmitoyl-carnitine, were uniformly downregulated in G1 (Figure 3C).

The origins of FAs in MDS also varied with BM blast counts; G1 metabolomic analysis suggests an increased autophagic consumption of internal organelles metabolically denoted by markedly increased di- and tri-peptides, as well as the upregulation of ceramides (sphingomyelin (SM), Ceramide-P). Tables S2–S9 summarize the lipids assigned a Variable Importance in Projection (VIP) score greater than or equal to 1 for G1, G2, and control groups (negative- and positive-ion modes upon liquid chromatography mass spectrometry analyses). G1 and G2 exhibited increased citrate levels, indicating ongoing de novo lipid synthesis, which, at least in the G2 group, is further supported by the NADP/NADPH ratio [23] (Table 1).

2.3. The Optical Ratio NADH/FADH₂, and the Redox Ratios NAD/NADH, GSH/GSSG, and NADP/NADPH

While, in previously published studies, a lower mitochondrial mass was found in MDS differentiating cells—to a great extent depending on uncontrolled mitophagy—the mitochondrial function has never been studied (I.E.S. and K.K. unpublished data, 2020). From a metabolic point of view, in the G2 group, mitochondrial adequacy was established through a reduced NAD/NADH ratio (when compared to the control group) in the presence of a functional TCA cycle (Table 1). The increase of the optical redox ratio of NADH/FADH₂ in the G2 metabolome suggests an atypical mechanism of their mitochondrial function, specifically controlled partial uncoupling of the TCA from the ETC [24] (Figure 2 and Figure S1). The uncoupling was further supported by the massively upregulated ADP/ATP ratio detected when the G2 group was compared to the control group [24]. Electrons leaking from the ETC under these conditions form reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide (H₂O₂), and superoxide [24,25]. A ROS-inducing metabolomic signature became evident in G2 vs. control samples, while the most impressive aspect of the G2 metabolome was the improved redox state these cells demonstrated, based on the increased reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio and increased NADP and FAD levels in all comparisons. All majorly upregulated pathways in the G2 group (vs. control samples) contributed to an improved redox state through glutathione synthesis (GSH, GSSG, L- γ -Glutamyl-L-glutamic Acid), nicotinate and nicotinamide

metabolism (NAD, NADP, methyl nicotinamide, trigonelline, L-aspartate—Figure 2E), and ubiquinone synthesis (Figure S1B). The G1 group (vs. control samples) presented the opposite ratios: a defective redox state decreased the NADH/FADH₂ ratio and as will be discussed further, induced a defective TCA cycle (Table 1).

2.4. Glutamine Metabolism, Nitrogen Detoxification, and the TCA in MDS

Glutamine is the major contributor of organic carbons fueling the TCA cycle in the absence of adequate influx from glycolysis [26]. Glutamine and glutamic acid were upregulated in the G1 vs. control (Figure 3C) and also in the G2 vs. G1 comparisons (Figure 3D).

In the G2 group, the reduced NAD/NADH ratio compared to control samples and FAD/FADH₂ ratio compared to the G1 metabolome confirm the TCA cycle function [27] (Table 1). Additionally, the G2 group presented an increased FAD/FADH₂ ratio when compared to the control one, most likely due to the aforementioned uncoupling occurring in G2 mitochondria. Conversely, in the G1 group, the TCA cycle flow seems disturbed given the high NAD/NADH, extremely high aKG/citrate, and high FAD/FADH₂ ratios. Although reductive carboxylation was confirmed by the reduced aKG/citrate and increased aKG/succinate ratios in both MDS groups, the oxidative metabolism of glutamine (TCA cycle) was only present in the G2 metabolome, possibly to normalize the NADP/NADPH ratio via the regulation of NAD/NADH. The G2 metabolome also presented a higher NADP/NADPH ratio compared to G1, which further establishes the upregulated glutamine reduction in G2.

The detoxification of glutamine-derived nitrogen is confirmed via increased aspartate, urate, carbamoyl-aspartic acid, and asparagine, as well as purine and pyrimidine diphosphates [26,28]. Overall, purine and pyrimidine synthesis were the most affected pathways in the MDS metabolome (Figures 2A, 3 and S1). Nitrogen from glutamine was also shunted toward histidine metabolism, which is an upregulated pathway in MDS, especially in the G1 group. When comparing the MDS metabolome to that of control samples, ergothioneine, carnosine, methyl-histidine, and methyl-histamine were among the most upregulated metabolites (Figure 2).

Furthermore, glutamine metabolism is tightly bound to GSH synthesis. Both GSH and GSSG were upregulated in the MDS metabolome, yet only that of G2 was compatible with survival of the GSH/GSSG ratio, as stated above.

2.5. Epigenetic Modifiers Are a Distinctive Feature of MDS

MDS metabolism culminates in the reprogramming of epigenetic modifiers. SAM, which is the major intracellular methyl-donor, comes from 1C transfer and was found to be uniformly upregulated in the MDS metabolome; surprisingly more so in the G1 than G2 group (Figure 2D). We have already stated the altered usage and kinetics of acetyl-groups, mostly in the form of altered TCA cycle flow, particularly when the G2 metabolome is considered. As lysine is a major protein acetylation site, marked acetyl-lysine upregulation in the MDS vs. control metabolome indicates altered protein acetylation [3]. Furthermore, the altered NAD/NADH ratio also radically affects sirtuins (deacetylators). The ADP/ATP and GDP/GTP ratios, as revealed by MDS vs. control comparisons, may govern the enzymatic activity of epigenetic modifiers [29]. Protein glutathionylation is also thought to be affected in the MDS state given the altered levels of GSH, GSSG, and their GSH/GSSG ratio [30]. This intertwined metabolome–genome interaction reaches a crescendo with the oncometabolite 2HG. This is a byproduct of reductive glutamine carboxylation that was found to be largely upregulated in the MDS group (G2 vs. control group). The larger the 2HG area under the curve (AUC), the higher the percentage (%) of blasts in the bone marrow and thus, the higher the MDS risk.

3. Discussion

Cell genome and metabolome shed light on cellular function and fate, being tightly interwoven in a dynamically balanced inter-relationship [1]. Upon failing to establish a distinctive genomic profile driving the MDS phenotype and the enormous variability of genomic aberrations defining

the MDS genome [10], our research focused on cell metabolic profiling. Our assumption was further supported by Hayashi et al. [31], who identified that HIF1 is highly and essentially deregulated in MDS pathogenesis, a transcription factor and master regulator of stemness metabolism, greatly dysregulated, and pathogenetically connected to the MDS phenotype [32]. Furthermore, given that disease behavior varies greatly with the percentage of BM blasts, we also hypothesized that disease severity may also be affected by the metabolic profile of the dysplastic clones, which, as proven by our analysis and depicted in Figure 1, presents high variability and disparity in comparison to the control group.

MDS are considered diseases of the Hematopoietic Stem Cell (HSC) and thus, clonal disorders [33]. It is important to mention that metabolic deregulation in the MDS BM is not confined to transformed leukemic/blastic clones, but affects every dysplastic clone. The persistence of metabolic deregulation in differentiated metamyelocytes, bands, and even neutrophils proves the clonal nature of the disorders. We believe that dysplastic cells residing under the pressure of their deregulated metabolism transform into leukemic blasts to survive—an assumption which we have yet to prove.

Differentiated cells from G2 present a viable reprogramming of their metabolism towards redox of increased ROS produced by partial uncoupling of their mitochondrial ETC to maintain mitochondrial viability when consuming, through beta oxidation, high-energy FAs [21,34]. This metabolic reprogramming established by their increased GSH/GSSG and NADH/FADH₂ ratios also entails a functional TCA cycle, confirmed by reduced (vs. controls) and increased (vs. G1) NAD/NADH and FAD/FADH₂ ratios, in order to retain control of the essentially active, as it will be stated later, Warburg phenomenon [27,34]. Of note, Warburg glycolysis produces NADH decreasing the NAD/NADH ratio and the partially coupled ETC acts to compensate for this [14,35,36]. Glycolysis, the TCA cycle, and ETC kind of self-regulate their activity in the G2 group [36]. Aerobic glycolysis assures that glucose fluxed into the cell will not be burnt through acetyl-CoA oxidation; on the contrary, it will be used through its branching anabolic pathways, which are PPP, the 1C cycle, and phospholipid synthesis [18,36]. Mitochondrial uncoupling combined with the shunting of upper glycolysis to its branches markedly increases the ADP/ATP ratio, maintaining the Warburg phenomenon. PPP maintains the reduced NADP/NADPH ratio available for either GSSG reduction or glutamine reductive carboxylation to refeed the TCA cycle. 1C transfer provides the building blocks for nucleotides and along with the methionine cycle and PPP, is a pathway of glutamine nitrogen detoxification [26,37]. Glutamine is also used for GSH production [37], while MDS metabolism results in the vast upregulation of epigenetic modifiers. SAM, 2HG, NAD, and even GSH assure close bidirectional regulation between the metabolome and genome [8]. Finally, phospholipids, produced in masses upon either autophagy or de novo from upper glycolysis, act as secondary intra- and inter-cellular messengers allowing for the adaptation of the cell to its environment by altering the environment itself [38,39]. In fact, phospholipid deregulation is a prominent feature in the vast majority of malignancies [39]. In 2018, Stevens et al. proved that in the BM of MDS patients with >5% blasts, a distinct clonal population of CD34⁺/CD123⁺ stem-like cells with altered bioenergetics dominated by an improved redox potential and nitrogen recycling resides. These cells, which also present with upregulated protein synthesis, are thought of as the precursors of an expanding leukemic clone in these patients [40]. Interestingly, these cells presented with no increased mitotic activity, establishing the theory that leukemic stem cells (LSCs) are in fact a distinctive population of HSCs in relative quiescence. Our data support the findings of Stevens et al. and also suggest that even in the differentiating myeloids of the G2 patients, this metabolic imprint is evident. Such a metabolic profile, closely resembling that of malignant cells [41], consists of a balance between several, initially thought of as emulous, metabolic pathways and is the result of a strenuous process of trial and error, with error meaning the cellular death observed in G1.

Indeed, differentiating cells (G1 group) presented an increased death rate when cultured in vitro (I.E.S. and K.K. unpublished data, 2020) [12]. In these cells, mitophagy is featured as the most prominent metabolic feature, probably due to dysfunctional mitochondria (I.E.S. and K.K. unpublished data, 2020) [12]. A failing TCA cycle, namely an increased NAD/NADH and FAD/FADH₂ ratio with markedly increased ADP/ATP levels, leads to FA accumulation due to the failure of effective adequate

beta oxidation [34,36]. The uncontrolled NAD/NADH ratio stimulates upper glycolysis in a turbo mode, which engages the cell in never-ending deadly metabolism [42]. The enormous abundance of upper glycolytic intermediates is relieved through phospholipid and ceramide synthesis [36]. FAs, mostly phospholipid and ceramide accumulation, interrupt the mitochondrial membrane lipidome. Phospholipids and ceramides are the cellular membrane building blocks. Mitochondrial membrane disorganization equals ETC dysfunction and thus, ROS leakage [38,43]. Eventually, damaged mitochondria are targeted for autophagic consumption, further increasing phospholipid release and incapacitating mitochondrial function fulfilling this deadly cycle [43]. Increased ROS levels and hence, increased oxidative stress, are featured in our analysis as a decreased GSH/GSSG ratio, despite the increased GSH production. Of note, though, the seemingly improved GSH/GSSG ratio in the G1 vs. G2 comparison is most likely the result of massively upregulated glutamine metabolism. The latter does not result in an improved redox state, as proved by the G1 vs. control and G2 vs. control comparisons. Instead, increased glutathionylation and the functional impairment of mitochondrial proteins became apparent in G1 [30,44]. Furthermore, the failure of mitochondria to oxidize FAs leads to their accumulation and peroxisomal degradation. Peroxisomal biogenesis is stimulated upon the increased needs of peroxisomes and the endoplasmic reticulum is sequentially consumed in the process of autophagosome formation and peroxisome-genesis, eventually conferring death of the cell [13,45,46]. Figure 4 summarizes the metabolomic profile of both G1 (Figure 4A) and G2 (Figure 4B).

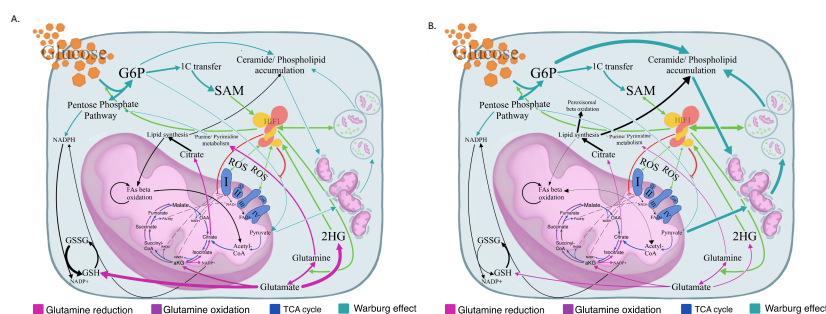


Figure 4. Schematic presentation of dysregulated metabolism of G1 and G2 MDS myeloid lineages. (A) Schematic presentation of the proposed metabolic profile of the G1 MDS differentiating myeloid precursors with predominant glycolysis, marked ceramide and phospholipid accumulation, and blunted mitochondrial function in the field of aberrant HIF1 stabilization. Line widths reflect the grade of pathway upregulation compared to controls. (B) Schematic presentation of the proposed metabolic profile of the G2 MDS differentiating myeloid precursors with abundant glycolysis when compared to controls, yet with an evidently improved redox status and functional mitochondrial TCA through anaplerotic reductive glutamine carboxylation. Line width reflects the extent of pathway upregulation compared to controls. SAM: S-Adenosyl-Methionine; 2-HG: 2-HydroxyGlutarate; OAA: oxaloacetate; a-Ketoglutarate: a-KG; TCA: Tricarboxylic Acid Cycle; HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1; Acetyl-CoA: Acetyl-Coenzyme A; and SuccinylCoA: Succinyl-Coenzyme A. Green arrows indicate enzyme upregulation by HIF-1, while the red line shows enzyme inhibition. G1: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing <5% blasts. G2: Differentiating myeloid lineage cells isolated from MDS BM aspirates containing \geq 5% blasts.

Due to the scarcity of such samples in our patient pool, our cohort did not include clinical cases of MDS with ring sideroblasts (RS). Notwithstanding, we addressed this challenge via in silico means. Current knowledge and datasets were reviewed in an effort to compare the bioenergetic state of MDS-RS, representing this distinct relatively benign MDS subgroup, with that of our G1 myeloid lineage. The vast majority of MDS-RS cases reported are dominated by *SF3B1* mutations [47]. While *SF3B1* mutations drive the formation of RS in the erythroid lineage of the dysplastic clone, a veil of mystery surrounds their effects on the myeloid sub-clone [48]. From a metabolomic perspective, *SF3B1* mutations have been shown to cause profound defects in the ETC and thus in mitochondrial

respiration due to the impairment of Complex III assembly [49] in the differentiating myeloid lineage of MDS-RS [48].

4. Materials and Methods

4.1. Sample Collection and Preparation

Isolated BM myeloid cells (high-density layer) from MDS patients with <5% ($n = 10$; 1 MDS-SLD, 8 MDS-MLD, 1 MDS-del5q, Group 1 (G1)) and >5% BM blasts ($n = 4$; 2 MDS-EB1, 2 MDS-EB1, Group 2 (G2)) and aged matched controls ($n = 5$) were subjected to untargeted mass spectrometry-based metabolomics analysis (Table S1). Two different metabolite extraction protocols were applied (1° extraction: 50% MeOH, 30% ACN, 20% H₂O; 2° extraction: 40% MeOH, 40% EtOH, 20% H₂O). The first extraction procedure was chosen for the best metabolite yield. In total, 50 µL of samples was used for metabolite extraction by adding 750 µL of extraction buffer and shaking the mixture at 4 °C for 15 min. Samples were then centrifuged at 14,000 g for 10 min and supernatants were collected for LC-MS/MS analysis using the UPLC 1290 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to a TripleTOF 5600+ mass spectrometer (SCIEX) equipped with SWATH acquisition, SelexION technology, and an electrospray ionization source (ESI). Both G1 and G2 samples along with control ones were examined under optical microscopy to assure equal representation of every myeloid differentiation stage in all samples. To exclude the possibility of an artificial myeloid lineage disturbed metabolome due to contamination of the high-density layer of G2 samples from blastic cells, we performed a control BM ficoll bilayer isolation protocol on a BM aspirate of a patient with MDS-EB2 and assessed the isolated layer, namely the myeloid layer, with flow cytometry, after staining for appropriate antigens. The flow cytometry acquisition was performed on a FACSCanto II flow cytometer. Flow cytometry analysis was performed using FlowJo software. A purity of >95% mature myeloid lineage with less than 0.1% CD34+ blastic contamination was established. Flow cytometric tables from both the BM aspirate and the isolated layer are shown in Figure S2.

4.2. Chromatography

UPLC separation was performed on metabolite extracts using a pZIC-HILIC column (5 µm, 2.1 mm × 150 mm) operating at 45 °C by directly injecting 10 µL of samples. The flow rate was 0.2 mL/min with mobile phase A (acetonitrile) and mobile phase B (ammonium carbonate 20 mM + 0.1% ammonium hydroxide). The gradient, in both positive and negative mode, was from 20% to 80% B in 15 min.

4.3. Mass Spectrometry

The TripleTOF 5600+ system was used for data acquisition, over a mass range of 75–1000 m/z. Automated calibration was performed using an external calibrant delivery system (CDS), which infuses APCI positive or negative calibration solution every five samples. To monitor the instrument performance over time, quality control samples (QC) were prepared as a mix of each sample and analyzed every five samples. A TOF MS survey scan experiment with an IDA set to monitor the eight most intense candidate ions was performed (accumulation time of 150 msec in TOF-MS and 50 msec in the IDA experiment), with a collision energy of 35 eV and a collision energy spread of 10 eV, a declustering potential of 80 V, a source temperature (TEM) of 500 °C, and IonSpray Voltage Floating (ISVF) of 5500 V (positive polarity) or 4500 V (negative polarity) in high-sensitivity mode.

4.4. Data Processing

Data were processed and analyzed using MetaboKit [20] (<https://github.com/MetaboKit/MetaboKit>). Patient data were separated into two cohorts, depending on the severity of MDS disease (G1, $n = 10$ and G2, $n = 4$). All groups were cross-compared, resulting in a total of three different analyses: non-MDS vs. G1; non-MDS vs. G2; and G1 vs. G2. These comparisons were designed first to

obtain insights into the MDS metabolome at different disease stages and then, identify key metabolites differentiating G1 and G2.

Data processing and analysis for each experiment were performed after employing both positive and negative ion modes during liquid chromatography mass spectrometry analysis. Metabolites present in more than 33% of the samples were included in the analyses. After removing uninformative features, the resulting number of metabolites was decreased drastically to $\sim 1/4$. For those metabolites passing the criteria, empty values were annotated with a small value (1). Data centering and unit variance scaling were performed. Log₂fold calculation, PCA, and PLS analyses were performed for every comparative analysis (both negative and positive ion modes). PLS VIP (variable importance in projection) values were determined. Only metabolites with a log₂fold ≥ 2 were selected for subsequent enrichment analysis. Enrichment analysis was performed using Metaboanalyst v4 [50] employing pathway-associated metabolite sets (SMPDB).

4.5. Study Approval

The study protocol is in accordance with the Declaration of Helsinki and has been approved by the ethics review board of Athens General Hospital “Laiko”. IRB protocol number: 13011. Written informed consent was obtained from each individual participating in the study.

5. Conclusions

In the G1 group, the Warburg effect predominates. The silencing of the mitochondrial function with increased NAD⁺/NADH and markedly increased ADP/ATP ratios increases cellular oxidative pressure. In fact, the GSH/GSSG and NADP⁺/NADPH ratios were decreased and increased accordingly, when compared to the control group, underlining the increased oxidative stress that low-risk precursors reside in. On the contrary, the G2 metabolome presented with opposite ratios. The relief of an increase NAD⁺/NADH ratio as we suggest via the mitochondrial TCA cycle allows for the high blast count MDS myeloid precursors to utilize aerobic glycolysis for anabolic processes. Of note, the mitochondrial function in this latter group of MDS was supported by our analysis. In fact, a moderately decreased ADP/ATP ratio permits the viable utilization of the Warburg effect. When these precursors acquire the ability to balance aerobic glycolysis and mitochondrial oxidative stress, AML transformation occurs. We hypothesize that due to an initiating event, which we have yet to identify, HSCs fail to shut down HIF1 metabolism and enter the G1 bioenergetic mode. Under the resultant continuous metabolic stress and epigenetic modifier abundance, low blast count MDS transforms to its high-risk counterpart and eventually to AML blasts. Identifying this event and meticulously ascribing the MDS metabolome will offer improved therapeutic strategies against this enigmatic entity.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3520/s1>. Figure S1: Key metabolic pathways in MDS profiling; Figure S2: Control BM flow cytometry; Table S1: MDS patient characteristics; Table S2: MDS myeloid cell metabolome compared to that of non-MDS (control group). LC-MS analysis in negative ion mode; Table S3: MDS myeloid cell metabolome compared to that of non-MDS (control group). LC-MS analysis in positive ion mode; Table S4: G2 metabolome compared to that of non-MDS (control group). LC-MS analysis in negative ion mode; Table S5: G2 metabolome compared to that of non-MDS (control group). LC-MS analysis in positive ion mode; Table S6: G1 metabolome compared to that of non-MDS (control group) LC-MS analysis in negative ion mode; Table S7: G1 metabolome compared to that of non-MDS (control group) LC-MS analysis in positive ion mode; Table S8: G1 metabolome compared to that of G2. LC-MS analysis in negative ion mode; Table S9: G1 metabolome compared to that of G2. LC-MS analysis in positive ion mode.

Author Contributions: Conceptualization, A.P., S.G. and M.V.; methodology, T.K. and J.C.G.-T.; sample collection, I.E.S., K.K. and A.D.; software, T.K. and J.C.G.-T.; validation, T.K. and A.P.; formal analysis, T.K., A.P. and J.C.G.-T.; investigation, T.K., I.E.S., J.C.G.-T., K.K. and A.D.; resources, I.E.S., S.G. and M.V.; data curation, T.K.; writing—original draft preparation, A.P. and T.K.; writing—review and editing, A.P., T.K., S.G., J.C.G.-T., E.-T.P. and M.V.; visualization, T.K. and A.P.; supervision, S.G., A.G.T. and M.V.; project administration, S.G. and M.V.; funding acquisition, G.P.P. and M.V. Overall, A.P. and T.K. contributed equally to the manuscript production. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported in part by research funding from the Special Account for Research Grants of National and Kapodistrian University of Athens, and the Hellenic Society of Hematology to M.V. This study was also partially supported by a European Commission grant (H2020-668353) awarded to G.P.P.

Acknowledgments: Special thanks to Huyngwon Choi for constructive discussions and Metabokit, which is a bioinformatics workflow for untargeted metabolomic analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ito, K.; Suda, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 243–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Turgeon, M.O.; Perry, N.J.S.; Poulogiannis, G. DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wang, Q.; Zhang, Y.; Yang, C.; Xiong, H.; Lin, Y.; Yao, J.; Li, H.; Xie, L.; Zhao, W.; Yao, Y.; et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* **2010**, *327*, 1004–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Anderson, K.A.; Madsen, A.S.; Olsen, C.A.; Hirschey, M.D. Metabolic control by sirtuins and other enzymes that sense NAD(+), NADH, or their ratio. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2017**, *1858*, 991–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Shim, E.H.; Livi, C.B.; Rakheja, D.; Tan, J.; Benson, D.; Parekh, V.; Kho, E.Y.; Ghosh, A.P.; Kirkman, R.; Velu, S.; et al. L-2-Hydroxyglutarate: An epigenetic modifier and putative oncometabolite in renal cancer. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 1290–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Newman, A.C.; Maddocks, O.D.K. One-carbon metabolism in cancer. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 1499–1504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Canto, C.; Menzies, K.J.; Auwerx, J. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 31–53. [[CrossRef](#)]
8. Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27–36. [[CrossRef](#)]
9. Mrozek, K.; Bloomfield, C.D. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **2006**, *1*, 169–177. [[CrossRef](#)]
10. Zahid, M.F.; Malik, U.A.; Sohail, M.; Hassan, I.N.; Ali, S.; Shaukat, M.H.S. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* **2017**, *11*, 231–239.
11. Jabbour, E.; Ghanem, H.; Huang, X.; Ravandi, F.; Garcia-Manero, G.; O'Brien, S.; Faderl, S.; Pierce, S.; Choi, S.; Verstovsek, S.; et al. Acute myeloid leukemia after myelodysplastic syndrome and failure of therapy with hypomethylating agents: An emerging entity with a poor prognosis. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2014**, *14*, 93–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Stergiou, I.; Kambas, K.; Giannouli, S.; Katsila, T.; Dimitrakopoulou, A.; Vidali, V.; Synolaki, E.; Papageorgiou, A.; Nezos, A.; Patrinos, G.; et al. Autophagy in Myelodysplastic Syndromes: The Role of HIF-1a/REDD1 Molecular Pathway. *Blood* **2018**, *132*, 1808. [[CrossRef](#)]
13. Bosc, C.; Broin, N.; Fanjul, M.; Saland, E.; Farge, T.; Courdy, C.; Batut, A.; Masoud, R.; Larrue, C.; Skuli, S.; et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mailloux, R.J.; Beriault, R.; Lemire, J.; Singh, R.; Chenier, D.R.; Hamel, R.D.; Appanna, V.D. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE* **2007**, *2*, 690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. Oxidative Phosphorylation. In *Biochemistry*, 5th ed.; W H Freeman: New York, NY, USA, 2002.
17. Kumar, B.; Garcia, M.; Weng, L.; Jung, X.; Murakami, J.L.; Hu, X.; McDonald, T.; Lin, A.; Kumar, A.R.; DiGiusto, D.L.; et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia* **2018**, *32*, 575–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rosenzweig, A.; Blenis, J.; Gomes, A.P. Beyond the Warburg Effect: How Do Cancer Cells Regulate One-Carbon Metabolism? *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Ma, L.; Zong, X. Metabolic Symbiosis in Chemoresistance: Refocusing the Role of Aerobic Glycolysis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 5. [[CrossRef](#)]
20. Narayanaswamy, P.; Teo, G.; Ow, J.R.; Lau, A.; Kaldis, P.; Tate, S.; Choi, H. MetaboKit: A comprehensive data extraction tool for untargeted metabolomics. *Mol. Omics* **2020**. [[CrossRef](#)]
21. Houten, S.M.; Violante, S.; Ventura, F.V.; Wanders, R.J. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 23–44. [[CrossRef](#)]
22. Wanders, R.J.; Waterham, H.R.; Ferdinandusse, S. Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hosios, A.M.; Vander Heiden, M.G. The redox requirements of proliferating mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 7490–7498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Samudio, I.; Fiegl, M.; Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2163–2166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhao, R.Z.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z.B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *44*, 3–15. [[CrossRef](#)]
26. Wang, Y.; Bai, C.; Ruan, Y.; Liu, M.; Chu, Q.; Qiu, L.; Yang, C.; Li, B. Coordinative metabolism of glutamine carbon and nitrogen in proliferating cancer cells under hypoxia. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Stein, L.R.; Imai, S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 420–428. [[CrossRef](#)]
28. Gaude, E.; Schmidt, C.; Gammage, P.A.; Dugourd, A.; Blacker, T.; Chew, S.P.; Saez-Rodriguez, J.; O'Neill, J.S.; Szabadkai, G.; Minczuk, M.; et al. NADH Shuttling Couples Cytosolic Reductive Carboxylation of Glutamine with Glycolysis in Cells with Mitochondrial Dysfunction. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 581–593. [[CrossRef](#)]
29. Zala, D.; Schlattner, U.; Desvignes, T.; Bobe, J.; Roux, A.; Chavrier, P.; Boissan, M. The advantage of channeling nucleotides for very processive functions. *F1000Research* **2017**, *6*, 724. [[CrossRef](#)]
30. Cooper, A.J.; Pinto, J.T.; Callery, P.S. Reversible and irreversible protein glutathionylation: Biological and clinical aspects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2011**, *7*, 891–910. [[CrossRef](#)]
31. Hayashi, Y.; Zhang, Y.; Yokota, A.; Yan, X.; Liu, J.; Choi, K.; Li, B.; Sashida, G.; Peng, Y.; Xu, Z.; et al. Pathobiological Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1438–1457. [[CrossRef](#)]
32. Tong, H.; Hu, C.; Zhuang, Z.; Wang, L.; Jin, J. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma* **2012**, *53*, 2412–2418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Greenberg, P.L.; Tuechler, H.; Schanz, J.; Sanz, G.; Garcia-Manero, G.; Sole, F.; Bennett, J.M.; Bowen, D.; Fenaux, P.; Dreyfus, F.; et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **2012**, *120*, 2454–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Speijer, D. Can All Major ROS Forming Sites of the Respiratory Chain Be Activated By High FADH2/NADH Ratios?: Ancient evolutionary constraints determine mitochondrial ROS formation. *Bioessays* **2019**, *41*, 1800180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Santidrian, A.F.; Matsuno-Yagi, A.; Ritland, M.; Seo, B.B.; LeBoeuf, S.E.; Gay, L.J.; Yagi, T.; Felding-Habermann, B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 1068–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Velez, J.; Hail, N., Jr.; Konopleva, M.; Zeng, Z.; Kojima, K.; Samudio, I.; Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the reprogramming of intermediary metabolism in leukemia cells. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yang, C.; Ko, B.; Hensley, C.T.; Jiang, L.; Wasti, A.T.; Kim, J.; Sudderth, J.; Calvaruso, M.A.; Lumata, L.; Mitsche, M.; et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 414–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Morad, S.A.; Cabot, M.C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 51–65. [[CrossRef](#)]
39. Santos, C.R.; Schulze, A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* **2012**, *279*, 2610–2623. [[CrossRef](#)]
40. Stevens, B.M.; Khan, N.; D'Alessandro, A.; Nemkov, T.; Winters, A.; Jones, C.L.; Zhang, W.; Pollyea, D.A.; Jordan, C.T. Characterization and targeting of malignant stem cells in patients with advanced myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3694. [[CrossRef](#)]

41. Loew, A.; Kohnke, T.; Rehbeil, E.; Pietzner, A.; Weylandt, K.H. A Role for Lipid Mediators in Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2425. [[CrossRef](#)]
42. Haanstra, J.R.; van Tuijl, A.; Kessler, P.; Reijnders, W.; Michels, P.A.; Westerhoff, H.V.; Parsons, M.; Bakker, B.M. Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17718–17723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Patingre, S.; Bauvy, C.; Levade, T.; Levine, B.; Codogno, P. Ceramide-induced autophagy: To junk or to protect cells? *Autophagy* **2009**, *5*, 558–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ribas, V.; Garcia-Ruiz, C.; Fernandez-Checa, J.C. Glutathione and mitochondria. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fujiki, Y.; Okumoto, K.; Mukai, S.; Honsho, M.; Tamura, S. Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liu, Y.; Levine, B. Autosis and autophagic cell death: The dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 367–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Palomo, L.; Sole, F. SF3B1: The lord of the rings in MDS. *Blood* **2020**, *136*, 149–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Dalton, W.B. The metabolic reprogramming and vulnerability of SF3B1 mutations. *Mol. Cell Oncol.* **2020**, *7*, 1697619. [[CrossRef](#)]
49. Dalton, W.B.; Helmenstine, E.; Walsh, N.; Gondek, L.P.; Kelkar, D.S.; Read, A.; Natrajan, R.; Christenson, E.S.; Roman, B.; Das, S.; et al. Hotspot SF3B1 mutations induce metabolic reprogramming and vulnerability to serine deprivation. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 4708–4723. [[CrossRef](#)]
50. Chong, J.; Wishart, D.S.; Xia, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2019**, *68*, 86. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).