

دکتر مریم اسلامی

پزشک و دکتری تخصصی ژنتیک

درک اساس مولکولی بنیادینگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی: پیامدهایی

برای کاربردهای بالینی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان (MSCs) در بیش از 1500 کارآزمایی بالینی برای درمان بیش از 30 بیماری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. با این حال، درک درستی از بنیادینگی MSCها هنوز در دست بررسی است. تاکنون، اطلاعات کمی در مورد چگونگی حفظ حالت تمایز نیافته MSCها یا متعهد شدن آنها به دودمان‌های خاص تحت شرایط مختلف ریزمحیطی وجود دارد. فقدان درک جامع در مورد بنیادینگی MSCها به دلیل مکانیسم عمل نامشخص، تا حد زیادی مانع از تبدیل یافته‌های تحقیقاتی به کاربرد بالینی موفق می‌شود. شواهد نوظهور نشان می‌دهد که عوامل ژنتیکی متنوعی به طور ظریف خودنویایی و تمایز MSCها را تنظیم می‌کنند. در این بررسی، نقش عوامل رونویسی، تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی، ژن‌های پایداری ژنومی، کنترل کیفیت سلولی، تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیک، RNAهای غیر کدکننده، عملکرد میتوکندری، عوامل رشد و اصلاح m6A در تنظیم بنیادینگی MSCها را خلاصه می‌کنیم. استراتژی‌های حفظ بنیادینگی MSC در طول تکثیر ex-vivo نیز مورد بحث قرار گرفته است. این بررسی، درک ما از بنیادینگی MSC را برای پیشبرد کاربردهای بالینی عمیق‌تر می‌کند و بینش‌هایی را در مورد مسیرهای آینده برای تحقیقات با هدف بهبود درمان‌های مبتنی بر MSC ارائه می‌دهد. MSCها از جمله پرکاربردترین سلول‌های بنیادی در کاربردهای بالینی هستند. با این حال،

مکانیسم‌های مولکولی حاکم بر بنیادینگی MSC هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند و این امر به طور قابل توجهی بر پتانسیل درمانی آنها تأثیر می‌گذارد. بنیادینگی MSC به طور دقیق توسط فاکتورهای رونویسی، تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی، ژن‌های پایداری ژنومی، کنترل کیفیت سلولی، تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیک، RNAهای غیر کدکننده، عملکرد میتوکندری، فاکتورهای رشد و اصلاح m6A تنظیم می‌شود. درک اساس مولکولی بنیادینگی MSC، کاربردهای بالینی را افزایش می‌دهد و بینش‌هایی را برای بهبود درمان‌های مبتنی بر MSC فراهم می‌کند. MSCها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که می‌توانند به آدیپوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها و کندروسیت‌ها تمایز یابند. آنها تقریباً در تمام بافت‌های بالغ، از جمله مغز استخوان (BM-MSCs)، بافت چربی (AD-MSCs)، پریوستئوم (PD-MSCs)، ژله وارتون (WJ-MSCs)، بند ناف (UC-MSCs)، خون محیطی (PB-MSCs)، پالپ دندان (DP-MSCs) و فولیکول مو (HF-MSCs) و سایر بافت‌ها وجود دارند. به دلیل چندتوانی، خواص تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و سکرتوم، MSCs به طور گسترده برای آزمایش‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. MSCs دارای پتانسیل تمایز چند رده‌ای قابل توجهی هستند و باعث ایجاد استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها می‌شوند که کاربرد آنها را در ترمیم استخوان، غضروف و بافت‌های نرم امکان‌پذیر می‌سازد. آزمایش‌های بالینی پتانسیل MSCs را در درمان آرتروز، شکستگی‌های استخوان، نقص‌های غضروفی و آسیب‌های نخاعی نشان داده‌اند. MSCs با تعدیل فعالیت سلول‌های T، سلول‌های B، سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و سلول‌های دندریتیک، خواص سرکوب‌کننده سیستم ایمنی را از خود نشان می‌دهند. این امر آنها را در درمان بیماری‌های خودایمنی و التهابی مانند بیماری پیوند علیه میزبان (GvHD)، لوپوس اریتماتوی سیستمیک (SLE)، بیماری کرون و مولتیپل

اسکلروزیس بسیار کاربردی می‌کند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) با کاهش فیبروز میوکارد، ترویج رگ‌زایی و بهبود عملکرد قلب، برای درمان انفارکتوس میوکارد، کاردیومیوپاتی ایسکمیک و بیماری انسدادی مزمن ریوی (COPD) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی همچنین با تعدیل پاسخ ایمنی برای کاهش التهاب، ترویج ترمیم اپیتلیال برای بازیابی یکپارچگی بافت ریه و کاهش فیبروز از طریق ترشح فاکتورهای ضد فیبروتیک و ترمیمی، پتانسیل درمانی برای بیماری‌های ریوی را دارند. مطالعات بالینی پیش‌بالینی و فاز اولیه نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است نتایج را در شرایط نورودژنراتیو و نوروالمنت التهابی بهبود بخشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهندسی‌شده همچنین به عنوان وسیله‌ای برای دارورسانی هدفمند، به ویژه در انکولوژی (<https://www.clinicaltrials.gov>) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اثربخشی درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) تا حد زیادی به حفظ خواص بیولوژیکی بنیادی آنها، که معمولاً به عنوان بنیادینگی (stemness) شناخته می‌شود، وابسته است. بنیادینگی MSC شامل ظرفیت آنها برای تکثیر، تمایز چند رده‌ای به استخوان، غضروف و چربی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی حفظ‌کننده بنیادینگی در تقویت بازسازی، تعدیل پاسخ‌های ایمنی و کاهش التهاب مؤثرتر هستند. در مقابل، از دست دادن بنیادینگی این مزایای درمانی را کاهش می‌دهد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی طول عمر محدودی دارند که منجر به پیری سلولی و از دست دادن تدریجی پتانسیل تمایز در طول تکثیر می‌شود. این امر منجر به کاهش تکثیر، اختلال در ظرفیت تمایز و افزایش ترشح سیتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود که همگی بر اثربخشی درمانی تأثیر منفی می‌گذارند. اگرچه MSCها سلول‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی هستند، MSCهای

آلوژنیک هنوز هم می‌توانند با گذشت زمان باعث شناسایی و رد ایمنی شوند. این فشار ایمنی ممکن است باعث کاهش عملکرد شود و در نتیجه بر قدرت درمانی تأثیر بگذارد. علاوه بر این، تضمین کیفیت پایدار MSC در بین دسته‌ها، یک چالش عمده در کاربرد بالینی است. بنیادی بودن MSC تحت تأثیر شرایط کشت، تعداد پاساژ و پروتکل‌های تولید قرار می‌گیرد. اقدامات دقیق کنترل کیفیت برای حفظ بنیادی بودن و تضمین اثربخشی بالینی ضروری است. تاکنون، درک اساس مولکولی بنیادی بودن MSC بسیار عقب‌تر از کاربرد گسترده MSCها است. اطلاعات کمی در مورد فاکتورهای رونویسی کلیدی و شبکه‌های ژنی حاکم بر بنیادی بودن MSC وجود دارد که به دلیل مکانیسم‌های عمل نامشخص، کاربرد بالینی MSCها از جمله تأیید محصولات MSC را تا حد زیادی تحت تأثیر قرار می‌دهند. شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که تنظیم‌کننده‌های ذاتی و بیرونی، بنیادی بودن MSCها را به طور ظریفی تنظیم می‌کنند. بنابراین، ما بررسی جامعی از عوامل ژنتیکی مختلف، از جمله فاکتورهای رونویسی، ژن‌های چرخه سلولی، ژن‌های پایداری ژنومی، کنترل کیفیت سلولی، تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی و RNAهای غیر کدکننده که بنیادی بودن MSCها را تنظیم می‌کنند، انجام داده‌ایم (شکل 1). علاوه بر این، استراتژی‌های حفظ بنیادی بودن MSC نیز مورد بحث قرار گرفته است. این بررسی، مروری مختصر بر تنظیم‌کننده‌های ژنتیکی تنظیم‌کننده بنیادینگی MSCها برای خواننده فراهم می‌کند که بینش‌هایی را در مورد اساس مولکولی بنیادینگی MSCها و توسعه استراتژی‌های درمانی بهتر برای بهبود کاربرد بالینی MSCها ارائه می‌دهد. فاکتورهای رونویسی (TFs) پروتئین‌هایی هستند که در هسته بیان می‌شوند و به عناصر تنظیمی بالادستی ژن‌های هدف که در ناحیه 5- بالادستی قرار دارند، متصل می‌شوند تا بیان آنها را تنظیم کنند. نشان داده شده است که

خانواده‌های مختلف TFs، بنیادینگی MSC، از جمله خودنوزایی و تمایز را تنظیم می‌کنند. ژن‌های خانواده Twist شامل Twist1 و Twist2 (که Dermo-1 نیز نامیده می‌شود) هستند که هر دو بخشی از خانواده فاکتور رونویسی مارپیچ-حلقه-مارپیچ پایه (bHLH) هستند. این پروتئین‌ها حاوی یک دامنه bHLH در انتهای N هستند که در مکان‌های خاص (جعبه‌های E) به DNA متصل می‌شود و یک دامنه جعبه Twist در انتهای C که روشن یا خاموش بودن ژن‌ها را کنترل می‌کند. Twist1 و Twist2 به میزان زیادی در MSC‌ها بیان می‌شوند و سطح آنها در طول تکثیر آزمایشگاهی کاهش می‌یابد. بیان بیش از حد Twist1 و Twist2 در BM- MSC‌ها بیان STRO-1 (یک نشانگر بنیادینگی) را افزایش داده، تکثیر و چربی‌زایی را افزایش داده، اما استخوان‌زایی و غضروف‌زایی را مهار می‌کند، که نشان می‌دهد آنها به حفظ بنیادینگی MSC کمک می‌کنند [1]. به طور مداوم، بیان بالاتر Twist1 با تکثیر قوی‌تر MSC، تشکیل کلونی (CFU-F) و تمایز سه‌رده‌ای مرتبط است [2]. در مقابل، مهار Twist1 پیری را در MSC‌ها افزایش داد، متابولیسم را تغییر داد (افزایش مصرف اکسیژن) و فنوتیپ ترش‌تری مرتبط با پیری (SASP) را آغاز کرد [3]. از نظر مکانیسمی، Twist1 EZH2 را افزایش می‌دهد که با تغییر کروماتین ژن‌های پیری p14 و p16 از طریق H3K27me3 آنها را خاموش می‌کند (شکل 2). Twist1 همچنین E47 را مسدود می‌کند، عاملی که p16 را در سلول‌های پیر فعال می‌کند [4]. این یافته‌ها نشان می‌دهد که Twist1 و Twist2 بنیادینگی، تکثیر، متابولیسم و پیری MSC را تنظیم می‌کنند و آنها را به بازیگران کلیدی در عملکرد MSC تبدیل می‌کنند. ژن‌های HOX خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی بسیار حفاظت‌شده هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی سرنوشت، الگوسازی و تمایز سلولی در طول رشد مهره‌داران عمل می‌کنند

[5]. در انسان، 39 ژن HOX وجود دارد که در چهار خوشه روی کروموزوم‌های مختلف گروه‌بندی شده‌اند. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، الگوی بیان ژن‌های HOX، که به عنوان "کد HOX" شناخته می‌شود، در طول زندگی پایدار است و منشأ بافتی MSCها را منعکس می‌کند [6]. این کد در برابر تغییرات ناشی از عوامل خارجی مقاوم است و می‌تواند به تشخیص MSCها از منابع مختلف، مانند مغز استخوان و خون بند ناف کمک کند [7]. HOXA5 تمایز و تکثیر استخوان‌زایی را در MSCهای پالپ دندان افزایش داد. حذف آن با افزایش بیان p16INK4a و p18INK4c و کاهش بیان سیکلین A، توانایی تشکیل استخوان را مختل کرده و باعث توقف چرخه سلولی می‌شود [8] (شکل 2). بیان HOXB7 با افزایش سن کاهش می‌یابد. افزایش بیان آن باعث افزایش تکثیر MSCها، کاهش نشانگرهای پیری و بهبود تمایز استخوان و غضروف می‌شود [9، 10]. HOXC10 در MSCهای مشتق از آمیون یافت می‌شود اما در بیشتر MSCهای مشتق از دسیدوا یافت نمی‌شود، که آن را به یک نشانگر بالقوه برای تشخیص زیرگروه‌های MSC در همان بافت تبدیل می‌کند [11]. HOXA11 در MSCهای پرئوستال بیان می‌شود و برای ترمیم استخوان حیاتی است. بیان آن پس از آسیب افزایش می‌یابد و عدم وجود آن تشکیل استخوان و غضروف را مختل می‌کند [12، 13]. به طور کلی، ژن‌های HOX بنیادینگی MSC، از جمله توانایی آنها در خودنوزایی و تمایز به انواع سلول‌های خاص را تنظیم می‌کنند. ژن‌های POU نشان‌دهنده‌ی دسته‌ی متنوعی از فاکتورهای رونویسی هستند که توسط دامنه‌ی اختصاصی POU در انتهای (POUS) N و همودومین C-ترمینال (POUHD) که توسط یک رابط انعطاف‌پذیر به هم متصل شده‌اند، متمایز می‌شوند [14، 15]. فاکتور رونویسی متصل‌شونده به اکتامر 4 (Oct4)، که به عنوان دامنه‌ی POU، کلاس 5، فاکتور رونویسی 1

(POU51) نیز شناخته می‌شود، یک فاکتور رونویسی شناخته‌شده است که به طور گسترده با حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی و برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک مرتبط است. OCT4 شامل دو ایزوفرم متصل‌شده‌ی جایگزین، OCT4A و OCT4B است [16، 17]. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بیان OCT4 به شدت تحت تأثیر ترکیب سرم، کشت هیپوکسی و تعداد پاساژ قرار می‌گیرد [18، 19]. بیان بیش از حد OCT4 باعث افزایش تکثیر، CFU-F و غضروف‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود [19، 20]. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی فولیکول موی انسان (hHF-MSCs)، افزایش بیان OCT4، پیشرفت چرخه سلولی، تکثیر و استخوان‌سازی hHF-MSCs را با افزایش بیان DNMT1 برای سرکوب p21 افزایش داد [21، 22] (شکل 2). در مقابل، مهار OCT4A از طریق کاهش بیان سیکلین A2 (CCNA2) تکثیر را کاهش داد و با افزایش بیان DTX1 در حالی که بیان HDAC2 و HDAC4 را در hUC-MSCs کاهش می‌داد، چربی‌زایی را مهار کرد [23]. این موارد نشان دهنده نقش حیاتی OCT4A در حفظ MSC در حالت شبه بنیادی و تمایز نیافته است. در hAD-MSCs، تجزیه و تحلیل کروماتین ایمونوپرسیپیتاسیون (ChIP) نشان داد که Argonaute 2 مستقیماً OCT4 را تنظیم می‌کند، که پروتئین 6 دامنه اتصال متیل-CpG (MBD6) را هدف قرار می‌دهد تا ژن‌های مرتبط با ژن‌های مرتبط با بنیادینگی و فعالیت خودنوزایی MSCs را تنظیم کند [24] (شکل 2). در hBM-MSCها، آنالیزهای ChIP اتصال مستقیم OCT4 به پروموتور DNMT1 را نشان داد که به نوبه خود واسطه متیلاسیون ژن‌های هدف پایین‌دست است. این اصلاح اپی‌ژنتیکی بیان نشانگرهای پیری سلولی مانند p16 و p21 و همچنین ژن‌های مرتبط با تمایز دودمانی را سرکوب کرد [19]. خانواده SOX متعلق به ابرخانواده گروه با تحرک بالا (HMG)

است که با یک دامنه HMG-box و سه دامنه HMG-box مارپیچ آلفا مشخص می‌شود. خانواده SOX شامل 20 فاکتور رونویسی است که در هفت زیرگروه طبقه‌بندی می‌شوند [25]. شواهد نوظهور نشان می‌دهد که SOX2 همچنین نقش مهمی در حفظ بنیادینگی MSC و سرکوب پیری ایفا می‌کند. SOX2 پس از تکثیر آزمایشگاهی کاهش یافت و می‌توان آن را با تراکم سلولی کم کشت نجات داد [26]. MSC‌های پیر، بیان SOX2 کاهش یافته‌ای را در کنار افزایش سطح نشانگرهای پیری p16 و p21 نشان دادند، که نشان می‌دهد کاهش SOX2 با شروع پیری در MSC‌ها مرتبط است [27، 28]. ناکاوت SOX2 در hUC-MSC‌ها منجر به کاهش c-MYC شد، که نشان می‌دهد SOX2 تکثیر MSC را از طریق c-MYC تنظیم می‌کند. سنجش ChIP و سنجش گزارشگر لوسیفراز همچنین نشان داد که SOX2 مستقیماً مهارکننده 1 مسیر سیگنالینگ WNT دیککوف (DKK1) را افزایش می‌دهد، بنابراین مسیر سیگنالینگ WNT را که یک سوئیچ حیاتی در افزایش استخوان‌سازی و مهار چربی‌سازی است، آنتاگونیزه می‌کند [29]. سنجش ChIP همچنین تنظیم‌کننده رونویسی مرتبط با Yes1 (YAP1)، یک عامل مؤثر در مسیر هیپو، را به عنوان هدف SOX2 در سلول‌های پیش‌ساز استخوان شناسایی کرد. YAP1 توانست DKK1 را القا کند و سیگنال‌های Wnt/ β -catenin را آنتاگونیزه کند، که مسیر سیگنالینگ WNT را بیشتر مهار می‌کند [30] (شکل 2). از نظر مکانیسمی، بیان SOX2 توسط مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT تنظیم می‌شود و محور PI3K/AKT/SOX2 مسیر p53/p21/CDK2 را تعدیل می‌کند و در نتیجه بر پیری سلولی تأثیر می‌گذارد [31]. جدا از SOX2، SOX9، یک تنظیم‌کننده اصلی شناخته‌شده غضروف‌سازی، آپوپتوز، تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) را نیز تنظیم می‌کند. مهار Sox9 با افزایش فعالیت

کاسپاز 7/3 و کاهش پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 منجر به آپوپتوز rBM-MSCs شد. پروتئین فعال شده با میتوژن (MAP) کیناز p38 نیز مختل شد که منجر به مهار CEPB β مورد نیاز برای چربی‌زایی و افزایش پایداری سیکلین D1 که باعث القای p21، القاکننده آپوپتوز و مهارکننده تکثیر، و استئوکلسین شد [32]. مهار SOX9 در hUC-MSCs بیان IL-8، فاکتور رونویسی مرتبط با بنیادینگی OCT4 و فاکتور رونویسی Spalt Like 4 (SALL4) را کاهش داد و بر توانایی پیش‌درمانی در مدل زخم پوستی تأثیر منفی گذاشت [33]. بیان درون‌زا SOX11 با هر پاساژ در hBM-MSCها کاهش یافت و مهار Sox11 با siRNA تکثیر و استخوان‌سازی hMSCها را کاهش داد، که نشان می‌دهد Sox11 یک تنظیم‌کننده مثبت بنیادینگی MSC است [34]. خانواده فاکتور شبه کروپل (KLF) شامل 17 ژن در سه گروه با دامنه انگشت روی Cys2His2 است که به عناصر DNA جعبه CACCC یا GC متصل می‌شود. KLFها نقش‌های متنوعی در تکثیر، تمایز، رشد، توسعه و بقا دارند [35]. در hBM-MSCها، مطالعات افزایش و از دست دادن عملکرد نشان داد که KLF2 با تنظیم مثبت نشانگرهای پرتوانی (OCT4، Nanog و Rex1) (شکل 2) و تنظیم منفی پروتئین ماتریکس الیگومری غضروف (COMP) و همچنین لیپوپروتئین لیپاز نشانگر چربی، تکثیر را افزایش داده و حالت تمایز نیافته MSCها را حفظ می‌کند [36]. KLF2 مستقیماً به FGFR3 متصل می‌شود تا بنیادینگی hMSCها را تنظیم کند [37]. پروفایل ژنی نشان داد که KLF4 در hAD-MSCها و hBM-MSCها در مقایسه با فیبروبلاست‌های کنترل بیش از حد بیان شده است. KLF4 در طول آدیپوژنز و استئوژنز MSCها کاهش یافت. سنجش ChIP نشان داد که KLF4 مستقیماً به پروموتور FZD1 از مسیر سیگنالینگ WNT و Inhibin beta A (INHBA) از خانواده TGF-

β در MSC های تمایز نیافته متصل است (شکل 2). مهار KLF4 تمایز دودمانی MSC ها را بهبود بخشید، که نشان می دهد KLF4 حالت تمایز نیافته MSC ها را حفظ می کند [38]. KLF15 در طول تمایز غضروفی فعال شد. مهار KLF15 غضروف زایی را کند کرد، در حالی که افزایش بیان KLF15 با فعال کردن بیان SOX9 غضروف زایی را بهبود بخشید [39]. خانواده TBX شامل 17 ژن است و با اتصال دامنه T به توالی اجماع DNA مربوط به TCACACCT مشخص می شود. آنها به پنج زیرخانواده دیگر نیز طبقه بندی می شوند [40]. فاکتورهای رونویسی T-box به دلیل عملکردشان در چندین فرآیند سلولی مانند اندام زایی، چرخه سلولی، خودنوزایی و تمایز سلول های بنیادی جنینی و چندین سلول بنیادی بالغ دیگر شناخته شده اند [41، 42]. بیان Tbx3 در طول تکثیر آزمایشگاهی سلول های بنیادی مزانشیمی کاهش و در طول استخوان سازی افزایش یافت. مهار Tbx3 تکثیر را کاهش داده و تمایز استخوانی hADSC ها را کند کرد [43]. در حالی که بیان بیش از حد TBX3 باعث افزایش خودنوزایی، جلوگیری از پیری و افزایش تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی شد [44]. TBX3 با سرکوب بیان p14ARF از طریق تعامل با هیستون داستیلازها (HDACs) و با مهار p16INK4a یا از طریق سرکوب فعالیت کیناز وابسته به سیکلین یا با همکاری با پروتئین پلی کمب EZH2 برای پیشبرد خاموشی اپی ژنتیکی آن، نقش کلیدی در تنظیم پیری سلولی ایفا کرد [45، 46]. با این حال، مطالعه دیگری با بیان بیش از حد Tbx20، استخوان سازی AD-MSC ها را با کاهش ژن های استخوان ساز، رنگ آمیزی آلیزارین رد S برای رسوب کلسیم و فعالیت ALP مهار کرد [47]. این مطالعات نقش Tbx را در تکثیر و تمایز استخوانی در MSC ها نشان می دهند. اینکه آیا سایر اعضای خانواده T-box بنیادینگی MSC را تنظیم می کنند یا خیر، هنوز مشخص نشده است. خانواده AP-1 شامل

چهار زیرخانواده از فاکتورهای رونویسی، شامل Fos، Jun، فیبروسارکوم عضلانی-پونوروتیک (Maf) و فاکتور رونویسی فعال‌کننده (ATF) است. آنها با دامنه پایه لوسین-زیپ (bZIP) مشخص می‌شوند که با دامنه پایه مجاور دیگر دایمر می‌شود و ساختار α -مارپیچی قیچی‌شکل را تشکیل می‌دهد. یکی از فاکتورهای رونویسی AP-1 شناسایی شده که بنیادینگی MSC را تنظیم می‌کند، c-Maf است که متعلق به زیرخانواده Maf است. کاهش c-Maf منجر به کاهش تکثیر و تمایز استخوانی در طول پیری ناشی از ROS شد. سنجش ChIP نشان داد که c-Maf مستقیماً به پروموتورهای OCT4، Nanog، Sox2، c-MYC، KLF4 و CCND2 متصل می‌شود (شکل 2)، که نشان می‌دهد c-Maf به عنوان تنظیم‌کننده تکثیر و پرتوانی hAD-MSCs عمل می‌کند [48]. REX1 یک نشانگر شناخته شده پرتوانی است که شامل خودنوسازی سلول‌های ES و برنامه‌ریزی مجدد غیرفعال شدن کروموزوم X در طول کسب پرتوانی می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف (hUC-MSCs) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (hAD-MSCs) بیان REX1 بالاتر و MAPK p38 پایین‌تری دارند، در حالی که BM-MSCها برعکس این وضعیت را دارند. مهار REX1 تکثیر سلولی و استخوان‌سازی را کاهش داد اما چربی‌سازی و فسفوریلاسیون MAPK p38 را افزایش داد. مهارکننده MAPK p38 می‌تواند با مهار REX1 در hUCB-MSCها، رشد سلولی و بیان CDK2 و CCND1 کاهش یافته را نجات دهد. سنجش ChIP نشان داد که REX1 مستقیماً به MKK3، یک تنظیم‌کننده بالادست MAPK p38، متصل می‌شود تا اثرات خود را بر بنیادینگی MSC اعمال کند [49] (شکل 2). چرخه سلولی شامل سه مرحله مجزا است. حالت سکون (G0) (مرحله استراحت)، اینترفاز (G1، S، G2) و مرحله میتوز (M). تنظیم‌کننده‌های منفی

چرخه سلولی، مانند پروتئین‌های سرکوبگر تومور و مهارکننده‌های CDK (CDKIها)، منجر به توقف چرخه سلولی می‌شوند که منجر به سکون یا پیری می‌شود. سکون برگشت‌پذیر است و در مرحله G0 رخ می‌دهد که معمولاً توسط سیکلین D1 و غیرفعال‌سازی CDK وابسته به p27 انجام می‌شود، در حالی که پیری برگشت‌ناپذیر است و عمدتاً در مراحل G1 و G2 رخ می‌دهد. تنظیم‌کننده‌های مثبت، از جمله انکوژن‌ها و کمپلکس‌های CDK-سایکلین، چرخه سلولی را به جلو هدایت می‌کنند تا تکثیر سلولی امکان‌پذیر شود. آن‌ها می‌توانند توقف و پیشرفت چرخه سلولی را متعادل کنند، بنابراین با جلوگیری از اتمام ذخیره سلول‌های بنیادی و تبدیل به بدخیمی، نیازهای بازسازی را برآورده می‌کنند. نشان داده شده است که ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی مانند p53، Nucleostemin، BMI1 و Retinoblastoma خودنوزایی و تمایز MSC را تنظیم می‌کنند. p53 که "نگهبان ژنوم" نیز نامیده می‌شود، تنظیم‌کننده آپوپتوز، ترمیم DNA و توقف چرخه سلولی است. p53 به عنوان یک پروتئین سرکوب‌کننده تومور، چرخه سلولی را با القای بیان ژن‌های توقف چرخه سلولی مانند p21، $14-3-3\sigma$ ، فسفاتاز 1 القا شده توسط p53 نوع وحشی (WIP1) و 45 القا شده توسط توقف رشد و آسیب DNA (GADD45) متوقف می‌کند، در حالی که بیان ژن‌های پیشرفت چرخه سلولی مانند سیکلین B1 را سرکوب می‌کند [50]. در زمینه خاص MSCها، MSCهای فاقد p53 تغییرات مورفولوژیک و فنوتیپی، افزایش سرعت تکثیر، کاهش زمان دو برابر شدن و افزایش تشکیل CFU-F را نشان دادند. علاوه بر این، حذف p53 همچنین تمایز MSC، پایداری ژنومی، سطح c-Myc و رشد وابسته به لنگرگاه را تغییر داد [51]. مطابق با این یافته‌ها، کاهش p53 با افزایش بیان TWIST2، تکثیر و CFU-F سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش داد، با سرکوب

PPARG، استخوان‌سازی را به قیمت چربی‌سازی بهبود بخشید و تولید ROS میتوکندریایی را کاهش داد، که نشان می‌دهد p53 یک تنظیم‌کننده منفی خودنوزایی و استخوان‌سازی MSCها است [52]. NS یک پروتئین هستکی جدید متصل شونده به p53 است که در سلول‌های بنیادی غنی شده است. به عنوان یک تنظیم‌کننده چندگانه پیشرفت چرخه سلولی. ممکن است با p53 برای حفظ تکثیر سلول‌های بنیادی با تثبیت MDM2 برای جلوگیری از یوبیکوئیتیناسیون و تخریب پروتئازومی آن، تعامل داشته باشد. سطوح غیرطبیعی NS می‌تواند باعث توقف چرخه سلولی وابسته به p53 شود. NS می‌تواند مستقیماً با همولوگ دو دقیقه‌ای 2 موشی (MDM2)، یک لیگاز E3 که p53 را برای تخریب در سطح بالا برچسب‌گذاری می‌کند، تعامل داشته و آن را مهار کند. NS همچنین پروتئین‌های ریبوزومی L5 و L11 را برای تخریب غیرمستقیم MDM2 در سطح پایین تحریک می‌کند [53]. این مطالعه تا حدی محل قرارگیری NS در هسته، جایی که رونویسی و مونتاژ rRNA رخ می‌دهد، و نحوه تنظیم تکثیر سلولی از طریق سنتز ریبوزوم را توضیح می‌دهد [54]. نقش عملکردی NS عمدتاً در سلول‌های بنیادی عصبی و سلول‌های سرطانی بررسی می‌شود. NS همچنین نشانگر تکثیر MSCها است [54,55,56]. NS در BM-MSCهای تمایز نیافته نسبتاً زیاد بیان می‌شد، اما پس از القای تمایز به شدت کاهش یافت و ظرف 6 ساعت پس از شروع، غیرقابل تشخیص شد [55]. NS در طول تمایز MSCها به آدیپوسیت‌ها، استئوسیت‌ها و کندروسیت‌ها کاهش یافت. FGF2 تکثیر MSC را وابسته به دوز افزایش داد، که می‌تواند با مهار NS از بین برود [54]. NS در امتداد بازوهای کروموزوم قرار دارد. با این حال، اختلال در میکروتوبول‌های میتوزی منجر به جدا شدن آن از کروموزوم‌ها و پراکندگی در سراسر سیتوپلاسم می‌شود. علاوه بر این، بیان NS mRNA به تدریج

در UC-MSC های پیر کاهش می یابد و به تدریج در طول تمایز آدیپوژنیک MSC ناپدید می شود [56]. این یافته ها نشان می دهد که NS به عنوان نشانگری برای MSC های انسانی عمل می کند و منعکس کننده وضعیت تکثیر و تمایز آنها است. از نظر مکانیسمی، مهار NS به طور قابل توجهی تکثیر BM-MSC ها را به موازات کاهش survivin و cyclin D1، دو تنظیم کننده شناخته شده تکثیر سلولی، کاهش داد. هیچ تغییر قابل توجهی در سطح بیان p21، عامل اصلی p53، مشاهده نشد، که نشان می دهد تکثیر MSC تنظیم شده توسط NS مستقل از p53 است [57]. تنظیم کننده اپی ژنتیک BMI1، که به عنوان پروتئین انگشت حلقه ای 51 (RNF51) یا پروتئین انگشت حلقه ای 4 گروه پلی کامب (PCGF4) نیز شناخته می شود، یک جزء کلیدی از کمپلکس گروه پلی کامب 1 (PRC1) است. BMI1 با عمل به عنوان یک سرکوبگر رونویسی در جایگاه INK4a/ARF، پیشرفت چرخه سلولی را افزایش داده و پیری را تنظیم می کند [58]. BMI1 تکثیر و آپوپتوز MSC ها را از طریق سرکوب بیان p16INK4a تنظیم کرد. BMI1 همچنین استخوان سازی و چربی سازی MSC ها را تنظیم کرد [59]. BMI1، p16، p19 و p27 را مهار کرد تا خودنوزایی BM-MSC ها را حفظ کند. حذف BMI1، تکثیر کندروسیت ها را کاهش و آپوپتوز را افزایش داد؛ در نتیجه، موش های دارای کمبود BMI1، عقب ماندگی رشد اسکلتی را نشان دادند که تا حدی به تغییر در تمایز چربی زا-استخوان زا، حداقل تا حدی از طریق افزایش بیان SIRT1 نسبت داده شد [60]. موش های فاقد BMI1 همچنین دژنراسیون دیسک بین مهره ای را نشان دادند که با کاهش قابل توجه آنزیم های آنتی اکسیدانی، از جمله سوپراکسید دیسموتازها (SOD1 و SOD2) و گلوکوتاتیون پراکسیدازها (GPX1 و GPX3)، و همچنین کاهش تنظیم کننده های چرخه سلولی p16، p21 و p53 همراه بود. نکته قابل توجه این است که این

فوتوپ می‌تواند با درمان آنتی‌اکسیدانی با N-استیل سیستئین (NAC) بهبود یابد. کشت هیپوکسیک، تکثیر و اثرات سرکوب‌کننده سیستم ایمنی hUC-MSCها را با افزایش BMI1 افزایش داد. این اثرات با کاهش بیان BMI1 از بین رفتند و با کاهش بیان COX-2/PGE2 همراه بودند. در مقابل، افزایش بیان BMI1، کیناز P38 MAP فسفریله شده را افزایش داد. از نظر مکانیسمی، BMI1 مستقیماً به پروموتور MAPK فسفاتاز 1 (MKP-1)، که با نام DUSP1 نیز شناخته می‌شود) متصل شد تا بیان آن را سرکوب کند. این داده‌ها نشان می‌دهد که BMI1 تعدیل ایمنی hUCB-MSCها را از طریق بیان COX-2 با واسطه p38 MAP کیناز تنظیم می‌کند [61]. MCP-1 که با نام CCL2 نیز شناخته می‌شود، جزء اصلی فوتوپ ترشحی مرتبط با پیری (SASP) در طول پیری UCB-MSC است که مستقیماً توسط BMI1 به عنصر تنظیمی آن متصل شد تا بیان آن را سرکوب کند [62]. رتینوبلاستوما (Rb) متعلق به خانواده پروتئین‌های جیبی است که به عنوان تنظیم‌کننده منفی رشد سلولی عمل می‌کند و عمدتاً در فاز G0 و اوایل G1 با مهار فاکتورهای رونویسی E2F و جلوگیری از رونویسی ژن‌های هدف مرتبط با تکثیر آن عمل می‌کند [63]. RB1 نقش‌های اساسی در خودنوسازی و تمایز MSC ایفا می‌کند. کاهش RB1 باعث افزایش p53 و p21 شد؛ بنابراین MSCهای فاقد RB1 فوتوپ پیری با خواص خودنوسازی مختل شده و پتانسیل تمایز کاهش یافته را نشان دادند [64]. RB در MSCهای پاساژ اولیه با DNMT1 بالاتر نسبت به MSCهای پاساژ آخر بیشتر بیان می‌شود. کاهش RB پتانسیل تکثیر و تمایز را کاهش داد و باعث پیری زودرس MSCها در پاساژ اولیه شد. در مقابل، بیان بیش از حد RB از پیری جلوگیری کرد و پتانسیل تمایز MSCها را در پاساژ آخر افزایش داد. به طور مشابه، مهار DNMT1 باعث افزایش پیری و کاهش پتانسیل تمایز

MSCها در پاساژ اولیه شد، در حالی که افزایش بیان DNMT1 در MSCهای پاساژ آخر اثر معکوس دارد، که نشان می‌دهد RB با افزایش بیان DNMT1، پتانسیل تکثیر و تمایز MSCها را حفظ می‌کند [65]. کاهش بیان RB1 و S18-2 با کاهش بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی، مانند OCT-4، KLF-4، NANOG و c-MYC در MSCهای انسانی مرتبط بود [66]. پایداری ژنومی نیز برای بنیادینگی MSC بسیار مهم است، زیرا MSCها باعث ایجاد نسل‌هایی می‌شوند که بافت‌های بدن ما را بازسازی و ترمیم می‌کنند. سلول‌های بنیادی بالغ عمدتاً در حالت سکون هستند و دائماً در معرض عوامل آسیب‌رسان به DNA قرار دارند. برخلاف اکثر سلول‌های سوماتیک تمایز یافته نهایی، سلول‌های بنیادی بالغ تحت فرآیندهای تکثیر و تمایز گسترده‌ای قرار می‌گیرند که احتمال آسیب DNA را در طول تکثیر DNA افزایش می‌دهد. ترمیم نادرست آسیب DNA منجر به تخلیه ذخایر سلول‌های بنیادی با تحریک آپوپتوز، پیری و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود که می‌توانند جهش‌ها را به نسل‌های بعدی خود منتقل کنند [67]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به عنوان سلول‌های بنیادی بالغ، به تدریج پتانسیل خودنوسازی و تمایز را در طول تکثیر آزمایشگاهی از دست می‌دهند، که با مسیر پاسخ به آسیب DNA فعال شده و آسیب DNA انباشته شده مرتبط بود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) در طول تکثیر آزمایشگاهی، آسیب DNA را تجمع می‌دهند که منجر به کاهش قابل توجه پتانسیل تمایز MSCs می‌شود [68]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیر شده در P3 در غضروف‌سازی و ترمیم غضروف نسبت به سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان تازه جدا شده، به موازات کاهش فعالیت تلومراز، تغییر مورفولوژی کروموزومی، کاهش تنظیم چرخه سلولی، همانندسازی DNA و مسیرهای ترمیم عدم تطابق (MMR) [69]، عملکرد ضعیف‌تری داشتند. تکثیر طولانی مدت

mMSCs منجر به از دست دادن تدریجی توانایی آنها در تشخیص شکستگی‌های DNA دو رشته‌ای شد که منجر به اختلال در پاسخ به آسیب DNA و افزایش بی‌ثباتی کروموزومی شد، همانطور که با تعداد بیشتر ریزهسته‌ها مشهود است [70]. تلومر یک ساختار DNA-پروتئینی خاص با توالی‌های DNA تکراری در انتهای کروموزوم است که ژنوم را از تخریب محافظت می‌کند و خودنوزایی و حالت تمایز نیافته سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کند. ترانس کریپتاز معکوس تلومراز انسانی (hTERT) طول عمر hMSCها را افزایش داده و پتانسیل استخوان‌سازی آنها را حفظ می‌کند. پس از پیوند زنوژنیک، hMSCهای بیان‌کننده hTERT بافت‌های استخوانی بیشتری تشکیل دادند [71، 72]. برعکس، MSCهای فاقد تلومراز، حتی در پاساژهای اولیه، توانایی تمایز به آدیپوسیت‌ها و کندروسیت‌ها را از دست می‌دهند. MSCهای فاقد تلومراز در پاساژهای انتهایی دچار پیری می‌شوند و کوتاه شدن تلومر و اتصال انتهای کروموزومی را نشان می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهد که تلومراز تمایز MSCها را تنظیم می‌کند [73]. ترکیبی از محرومیت از سرم و افیدیکولین، بیان mRNA و پروتئین hTERT را افزایش داد. این امر منجر به هماهنگ‌سازی hMSCها در فاز S شد که بیان تلومراز وابسته به چرخه سلولی را در hMSCها نشان می‌دهد [74]. مهار hTERT تکثیر سلولی را کاهش و پیری و آپوپتوز MSCها را افزایش داد، در حالی که بیان بیش از حد hTERT اثرات متضادی بر MSCها از طریق مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT داشت [75]. ثابت شد که افزایش فعالیت تلومراز توسط تورین، غضروف‌سازی را در DP-MSCها بهبود می‌بخشد [76]. این مطالعات نشان می‌دهد که تلومراز نقش مهمی در خودنوسازی و تمایز MSCها ایفا می‌کند. شواهد فزاینده نشان می‌دهد که زیرمجموعه‌ای از MSCها ممکن است افزایش طول تلومرها (ALT) را فعال کنند، یک مکانیسم مستقل از تلومراز

که برای طویل کردن تلومرها به فرآیندهای مبتنی بر نوترکیبی همولوگ متکی است. این امر منجر به طول تلومر بسیار ناهمگن می‌شود. فعال‌سازی ALT بیشتر در MSCهای نامیرا یا تغییر شکل یافته که فاقد فعالیت تلومراز قابل تشخیص هستند، مشاهده می‌شود. نکته قابل توجه این است که سلول‌هایی که از ALT استفاده می‌کنند، اغلب طیف گسترده‌ای از تکرارهای متنوع تلومری را نشان می‌دهند که بین رده‌های سلولی به طور قابل توجهی متفاوت است [77]. حفظ تلومر با واسطه ALT، پتانسیل افزایش طول عمر MSC را بدون فعال‌سازی مجدد تلومراز دارد و به طور بالقوه خطر سرطان‌زایی را در مقایسه با بیان بیش از حد hTERT کاهش می‌دهد. با این حال، فعالیت ALT اغلب با بی‌ثباتی ژنومی همراه است و نگرانی‌های ایمنی را برای کاربردهای درمانی ایجاد می‌کند. در حالی که فعال‌سازی ALT در MSCهای اولیه نادر است، ظهور احتمالی آن تحت کشت طولانی مدت یا استرس سلولی، اهمیت نظارت دقیق بر پویایی تلومر و یکپارچگی ژنومی در درمان‌های مبتنی بر MSC را برجسته می‌کند. تحقیقات بیشتری برای روشن کردن محرک‌های مولکولی، شیوع و پیامدهای عملکردی فعال‌سازی ALT در جمعیت‌های MSC مورد نیاز است. کنترل کیفیت سلولی، شامل پاسخ پروتئین‌های تا نشده و پروتئین‌های شوک حرارتی، تولید پروتئین‌های معیوب را با تاخوردگی مجدد، تخریب یا انتقال به بخش‌های کنترل کیفیت متمایز کاهش می‌دهد. پاسخ پروتئین تا نشده (UPR) یک واکنش تطبیقی برای حفظ عملکرد و زیست‌پذیری سلول با کنترل هموستاز پروتئین شبکه آندوپلاسمی (ER) و کاهش بار پروتئین تا نشده است. UPR بقای سلول را در شرایط استرس ER به عنوان یک مکانیسم تطبیقی حفظ شده تکاملی افزایش می‌دهد [78]. UPR در شرایط عادی فعال نمی‌شود. UPR می‌تواند تحت استرس‌های خاصی مانند گلیکوزیلاسیون تغییر یافته یا هیپوکسی فعال شود. UPR با تجمع

پروتئین‌های تا نشده یا تا نشده فعال می‌شود و به حفظ هموستاز و بقای سلولی تحت استرس ER کمک می‌کند. پروتئین‌های تا شده صحیح در طول پردازش پروتئین به دستگاه گلژی ترجمه می‌شوند، در حالی که پروتئین‌های تا نشده یا تا نشده در لومن ER تجمع می‌یابند تا برای تخریب هدف قرار گیرند یا دوباره تا شوند. هنگامی که UPR نتواند استرس ER را کاهش دهد، سلول‌های تحت استرس از طریق آپوپتوز خود تخریب می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) خارجی، مانند پراکسید هیدروژن، با فعال کردن p38 و JNK آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از طریق مسیرهای میتوکندریایی و ER القا کردند. اولی آپوپتوز اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تنظیم می‌کرد، در حالی که دومی در آپوپتوز دیررس نقش داشت [79].

تونیکامایسین (TM) به طور قابل توجهی بیان چاپرون‌های ER، GRP78 و GRP94، را در MSCها افزایش داد و به سلول‌ها در مقاومت در برابر آسیب ناشی از استرس کمک کرد [80].

پالمیتات اسید چرب آزاد با فعال کردن p38، استرس ER و آپوپتوز را در hBM-MSCها القا کرد، که می‌تواند توسط یک فعال‌کننده AMPK جلوگیری شود [81]. C/EBP β استرس ER را افزایش داد، زیرا بیان بیش از حد آن در MSCها باعث استرس ER شد، که با افزایش بیان نشانگر پیش آپوپتوزی CHOP و کاهش بیان ژن چاپرون BiP نشان داده شده است [82].

آرسنیک تری‌اکسید باعث القای آپوپتوز تعدیل‌شده توسط میتوکندری و استرس ER در UC-MSCها و BM-MSCها شد [83]. کاهش قابل توجه فعالیت پروتئازوم در hWJ-MSCها با پیری سلولی مرتبط بود. بیان بیش از حد زیر واحد کاتالیزوری $\beta 5$ عملکرد پروتئازوم را افزایش داد و منجر به افزایش تکثیر WJ-MSC، بهبود پتانسیل تمایز سده‌ای و افزایش بیان نشانگرهای بنیادینگی از جمله OCT4، SOX2 و NANOG شد [84]. GRP78 یک چاپرون

مولکولی ضروری است که مسئول اتصال به پروتئین‌های بدتاخورده یا تاخورده در طول استرس ER است. بیان بیش از حد GRP78 در برابر آپوپتوز ناشی از استرس ER محافظت کرد و آپوپتوز را در طول غشروفزایی ناشی از BMP2 کاهش داد، در حالی که مهار GRP78 آبشار کاسپاز اختصاصی استرس ER را در کندروسیت‌های در حال توسعه فعال کرد [85]. استرس فیزیولوژیکی شبکه آندوپلاسمی منجر به بلوغ سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. BMP2 مبدل‌های UPR مانند PERK، OASIS، IRE1 α و ATF6 را فعال می‌کند که باعث القای استخوان‌سازی MSCها می‌شوند [86، 87]. سیگنالینگ UPR از طریق مسیر PERK-eIF2 α -ATF4 بر زیست‌شناسی استخوان تأثیر می‌گذارد. PERK یکی از مبدل‌های اصلی مسیر سیگنالینگ UPR است. کمبود PERK منجر به استئوپنی شدید، کاهش استئوبلاست‌های بالغ، ترشح کلاژن نوع I و تمایز استئوبلاست در ماتریکس استخوان شد. کمبود PERK بیان RUNX2 و Osterix، تنظیم‌کننده‌های اصلی استخوان‌سازی و همچنین عوامل مهم چرخه سلولی مانند CCND، CCNE، CCNA و CDK1 را کاهش داد که منجر به کاهش تکثیر سلولی شد [88] (شکل 3). بیان بیش از حد PERK باعث افزایش فسفوریلاسیون eIF2 α و القای بیان ATF4، BSP و OCN شد که نشان می‌دهد مسیر سیگنالینگ PERK-eIF2 α -ATF4 تمایز استئوبلاستی را در پاسخ به استرس شبکه آندوپلاسمی (ERS) تنظیم می‌کند. ATF4 به عنوان یک هدف پایین‌دست PERK نقش مهمی در استخوان‌زایی و تشکیل استخوان ایفا می‌کند [78] (شکل 3). OASIS متعلق به خانواده CREB/ATF است که یک فاکتور رونویسی bZIP (زیپ لوسین پایه) متصل به غشاء ER با دامنه غشایی است. OASIS به میزان زیادی در استئوبلاست‌ها بیان می‌شود و توسط پروتئولیز درون غشایی تنظیم‌شده (RIP) در پاسخ به استرس خفیف ER

پردازش می‌شود. OASIS در تشکیل استخوان با واسطه ER نقش دارد. موش‌های فاقد OASIS به دلیل کاهش COL1A1 در ماتریکس استخوان و کاهش فعالیت استئوبلاست‌ها با هدف قرار دادن و فعال کردن COL1A1، ER، خشن غیرطبیعی و استئوپنی شدید را نشان دادند [89].

IRE1 α یک واسطه کلیدی UPR است و فاکتور رونویسی پایین‌دست آن، پروتئین متصل‌شونده به X-box 1 (XBP1)، برای استخوان‌سازی القا شده توسط BMP2 ضروری است. XBP1 مستقیماً OSX، عامل کلیدی استخوان‌سازی، را هدف قرار داد. مسیر IRE1 α -XBP1 با ترویج رونویسی OSX به استخوان‌سازی کمک کرد، که نشان می‌دهد مسیر IRE1 α -XBP1 استخوان‌سازی را از طریق رونویسی OSX تنظیم می‌کند [90]. علاوه بر این، IRE1 α به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی، تمایز کندروسیت‌های واسطه‌شده توسط GEP را مهار کرد، که با تغییر IHH و PTHrP همراه بود [91]. BMP2 استخوان‌سازی را القا کرد و رونویسی OC را مستقیماً از طریق ATF6 وابسته به Runx2، یک مبدل UPR، تنظیم کرد [86] (شکل 3). ATF6 تشکیل استخوان درون غضروفی و هیپرتروفی کندروسیت‌ها را از طریق Runx2 به طور مثبت تنظیم کرد [92]. پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) به عنوان کنترل کیفیت مهم عمل می‌کنند و با تسهیل سنتز، تاخوردگی، تاخوردگی مجدد، انتقال، تثبیت و تخریب پروتئین‌ها به عنوان چاپرون‌های مولکولی عمل می‌کنند. در شرایط سخت مانند دمای بالا، استرس اکسیداتیو و محرومیت از مواد مغذی، فاکتورهای شوک حرارتی (HSFs) با اتصال به عناصر شوک حرارتی (HSEs) به استرس پروتئوتوکسیک پاسخ می‌دهند و در نتیجه بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) را افزایش می‌دهند. نشان داده شده است که HSPs خودنوسازی و تمایز MSC را تنظیم می‌کنند. HSP90 با کاهش گیرنده‌های غشایی TLR-4 و ErbB2 برای فعال کردن

مسیرهای پایین دست PI3K/Akt و ERK1/2 آنها، زنده ماندن MSCها را افزایش داده و از MSCها در برابر آپوپتوز ناشی از محرومیت از سرم و هیپوکسی محافظت می کند [93]. گرمایش ملایم دوره‌ای با افزایش قابل توجه پروتئین شوک حرارتی 70 (HSP70)، استخوان‌سازی و غضروف‌سازی hMSCها را افزایش می‌دهد. مهار HSP70، استخوان‌سازی و غضروف‌سازی hMSCها را کند کرد، که نشان می‌دهد کاهش تنظیم HSP70 تمایز استخوان‌سازی و غضروف‌سازی hMSCها را مختل می‌کند [94]. پاساژ دیر هنگام DP-MSCها، پتانسیل استخوان‌سازی کاهش یافته‌ای را با کاهش بیان HSPB8 نشان داد. مهار HSPB8، استخوان‌سازی DP-MSCها را از بین برد، که نشان می‌دهد HSPB8 برای پتانسیل تمایز DP-MSCها ضروری است [95]. اصلاح اپی‌ژنتیکی، شامل متیلاسیون DNA، اصلاح هیستون و m6A، خودنویایی و تمایز MSCها را در هر دو سطح کروماتین و رونویسی بدون تغییر توالی‌های DNA تعدیل می‌کند، که یک مکانیسم حیاتی مؤثر بر بنیادینگی MSCها است. یکی از نشانه‌های مولکولی معماری اپی‌ژنتیک، متیلاسیون DNA است. وضعیت متیلاسیون اساسی MSCها این است که بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی باید هیپومتیله باشد. در مقابل، ژن‌های مختص دودمان معمولاً هایپرمتیله می‌شوند اما انعطاف‌پذیری خود را حفظ می‌کنند تا پس از القا، هیپومتیله شوند. تجزیه و تحلیل‌های متیلوم، تغییراتی را در چشم‌انداز متیلاسیون DNA کلی MSC در طول پیری و کهولت نشان داده‌اند که در آن چندپتانسیلی و تکثیر به خطر می‌افتند [96، 97]، که نشان می‌دهد متیلاسیون و دمتیلاسیون DNA فرآیندهای حیاتی برای کنترل بیان ژن هستند که در رفتار MSC نقش دارند. متیلاسیون DNA کلی توسط مهارکننده‌های DNMTs، مانند RG108 (مهارکننده DNMT1)، 5-آزاسیتیدین یا دسیتابین (5-آزا-2-دئوکسی سیتیدین؛

مهارکننده DNMT1، DNMT3b) مهار شد، که منجر به یک معماری کروماتین باز برای حفظ بنیادینگی MSCها شد. RG108 یک مهارکننده متیل ترانسفراز DNA است که تغییرات اپیژنتیکی را در هر دو سطح ژن و اختصاصی سراسری القا می‌کند. در BM-MSCها، RG108 فعال‌سازی اپیژنتیکی NANOG و OCT4 را افزایش داد و بنابراین نشانگرهای سلول‌های مزانشیمی CD105، NANOG و OCT4 را از طریق اصلاح اپیژنتیکی افزایش داد [98]. درمان با RG108 همچنین ژن‌های ضد پیری (TERT، bFGF) و ژن ضد آپوپتوز (BCL2) را افزایش داد، در حالی که ژن پیش‌آپوپتوز (BAX) را کاهش داد و در نتیجه از MSCها در برابر آپوپتوز محافظت کرد [99]. اصلاح هیستون‌ها، مانند متیلاسیون، دمتیلاسیون، استیلاسیون و داستیلاسیون، معماری کروماتین را تغییر می‌دهد که هیستون‌ها را وادار می‌کند تا اتصال خود را به DNA شل یا سفت کنند تا پتانسیل خودنوزایی، پیری و تمایز MSC را تنظیم کنند. شواهد نوظهور نشان می‌دهد که بنیادینگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) توسط متیلاسیون اپیژنتیکی هیستون تنظیم می‌شود. هومولوگ Zeste 2 (EZH2) یک هیستون متیل ترانسفراز است که بیان آن در طول آدیپوژنز افزایش یافته اما در طول استخوان‌زایی hMSCها کاهش یافته است. بیان بیش از حد EZH2 باعث افزایش آدیپوژنز اما مهار استخوان‌زایی می‌شود در حالی که کاهش بیان EZH2 با تغییر H3K27me3 اثرات معکوسی داشت [100]. مهارکننده EZH2 تشکیل استخوان را افزایش داده و از دست دادن استخوان را کاهش می‌دهد [101]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی فاقد EZH2 در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوع وحشی، پتانسیل تمایز سه‌رده‌ای بیشتری نشان دادند. موش‌های فاقد EZH2 استخوان قشری نازک‌تری داشتند که منجر به کاهش استحکام مکانیکی به دلیل افزایش پتانسیل استئوکلاستوژنز و افزایش

بیان Rankl و M-csf شد [102]. از نظر مکانیسمی، EZH2 یک هدف پایین دست TWIST1 است که جایگاه Ink4A/Arf را از طریق H3K27me3 مهار کرد تا رونویسی p16/p14 و پیری MSC های انسانی را سرکوب کند [4]. علاوه بر این، EZH2 زیر واحد کاتالیزوری کمپلکس سرکوبگر پلی کمب 2 (PRC2) است که رونویسی ژن را از طریق هدف قرار دادن لیزین-27 هیستون H3 سرکوب می کند. EZH2 مستقیماً توسط β -catenin تنظیم می شود [103]. آرژنین متیل ترانسفراز 1 مرتبط با کوآکتیواتور (CARM1) مستقیماً به گیرنده دامنه دیسکوئیدین 2 (DDR2) متصل می شود تا بیان DDR2 و پیری MSC را از طریق متیلاسیون H3R17 تنظیم کند [104]. پروتئین 4 حاوی دامنه SET (SETD4) یکی دیگر از لیزین متیل ترانسفرازهای هیستون است که متیلاسیون کلی ژنوم MSC را تغییر می دهد. کاهش SETD4 به طور قابل توجهی تکثیر BM-MSC ها را افزایش داد در حالی که پتانسیل مهاجرت و تمایز آنها را کاهش داد [105]. دمتیلاسیون همچنین بر بنیادینگی MSC تأثیر می گذارد. KDM3A و KDM4C دو دمتیلاز H3K9 هستند که با تنظیم NCAPG2 و NCAPD2 با پیری MSC همبستگی معکوس دارند. سرکوب KDM3A یا KDM4C منجر به پاسخ شدید به آسیب DNA و تشدید پیری سلولی شد، در حالی که بیان بیش از حد KDM3A یا KDM4C سازماندهی مجدد هتروکروماتین را افزایش داده و پاسخ به آسیب DNA را کاهش داد [106]. KDM4A چربی زایی را افزایش و استخوان زایی BM-MSC ها را مهار کرد [107]. KDM5A با سرکوب بیان Runx2 از طریق H3K4me3 استخوان زایی را مهار کرد [108]، در حالی که KDM6A چربی زایی را مهار کرده و استخوان زایی/غضروف زایی BM-MSC ها را افزایش داد [100]. KDM7A در طول چربی زایی و استخوان زایی MSC ها افزایش یافت. مهار KDM7A، چربی زایی

را مسدود کرد اما تمایز استخوانی را افزایش داد، در حالی که بیان بیش از حد KDM7A با اتصال مستقیم به پروموتورهای C/EBP α و SFRP1، اثرات متضادی را اعمال کرد و H3K9me2 و H3K27me2 را دمتیله کرد [109]. استیلایون هیستون از طریق هیستون استیل ترانسفرازها (HATs) یک اصلاح اپیژنتیکی حیاتی است که باقیمانده‌های لیزین پروتئین‌های هیستون را خنثی می‌کند تا ساختار کروماتین را باز کند و بیان ژن را تنظیم کند، که می‌تواند توسط هیستون داستیلازها (HDACs) برای حذف گروه‌های استیل معکوس شود. نشان داده شده است که استیلایون هیستون نقش حیاتی در خودنوزایی و تمایز MSCها دارد. هیستون استیل ترانسفراز p300 در hUC-MSCهای پیر در پاساژ آخر کاهش یافت، مهار p300 باعث پیری زودرس و کاهش تکثیر hUC-MSCها شد [110]. لیزین استیل ترانسفراز A (KAT6A)6 در MSCهای پیر کاهش یافت، که همزمان با کاهش تکثیر، تشکیل کلونی و استخوان‌سازی MSCها با تنظیم ژن آنتی‌اکسیدانی Nrf2 برای مهار تجمع ROS بود [111]. پروتئین مونتاژ نوکلئوزومی شبه 2 (NAP1L2)، یک چاپرون هیستون، با مقایسه پروفایل بیان ژن BM-MSCهای انسانی از اهداکنندگان جوان و پیر، مشخص شد که با پیری BM-MSC مرتبط است. NAP1L2 در MSCهای پیر افزایش یافت که با جذب SIRT1 برای داستیلایون H3K14ac روی پروموتور ژن‌های استخوان‌ساز، تمایز استخوانی MSCها را سرکوب کرد. فنوتیپ‌های پیری BM-MSCها را می‌توان توسط مونونوکلئوتید نیکوتین‌آمید (NMN) از طریق پیوند احتمالی بین NAP1L2 و NMN کاهش داد [112]. استیلایون هیستون بر رونویسی ژن تأثیر می‌گذارد و توسط داستیلازهای هیستون (HDAC) تنظیم می‌شود. BM-MSCهای پیر، تمایز و تکثیر کمتری را در کنار افزایش پیری نشان می‌دهند، فرآیندهایی که توسط

HDACها و داستیلازهای مرتبط با طول عمر مانند سیرتوئینها (SIRT) واسطه‌گری می‌شوند. سیرتوئینها داستیلازهای وابسته به NAD+ هستند که به صورت شیمیایی تغییرات استیل‌لیزین پروتئین‌های سلولی را معکوس می‌کنند. در BM-MSCها، مهار SIRT1 با افزایش استیلاسیون، یوبیکوئیتیناسیون و خروج آن از هسته، سطح پروتئین SOX2 را کاهش داد و منجر به تخریب پروتئازومی و کاهش ظرفیت خودنوزایی و تمایز BM-MSCها شد. رسوراترول، یک فعال‌کننده شناخته‌شده SIRT1، استیلاسیون و یوبیکوئیتیناسیون SOX2 با واسطه TSA را کاهش داد و در نتیجه توانایی تشکیل کلونی و همچنین تمایز استخوان‌زا و چربی‌زا BM-MSCها را به صورت وابسته به دوز افزایش داد. این نشان می‌دهد که محور SIRT1-SOX2 برای قابلیت خودنوزایی و چندتوانی BM-MSCها از طریق تغییرات پس از ترجمه ضروری است [113]. SIRT1 در MSCهای پیر کاهش می‌یابد، که با پیری سلولی و اختلال در قابلیت تکثیر همراه است. مهار SIRT1 منجر به پیری سلولی و کاهش قابل توجه تکثیر سلولی در MSCهای جوان شد، در حالی که بیان بیش از حد SIRT1 فنوتیپ پیری را جوان کرد و تکثیر سلولی MSCهای پیر را افزایش داد. از نظر مکانیسمی، SIRT1 به طور منفی p16 و p21 را تنظیم می‌کند که در هدایت پیری در پاسخ به آسیب DNA ضروری هستند. SIRT1 به طور مثبت فعالیت و بیان تلومراز را به جای طول تلومر از طریق تری‌پتیدیل‌پتیداز 1 (TPP1) تنظیم می‌کند، که از انتهای کروموزوم در برابر آسیب DNA محافظت می‌کند [114]. SIRT3 داستیلاز اصلی میتوکندری است که اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. SIRT3 با افزایش سن کاهش می‌یابد اما با تمایز MSC افزایش می‌یابد. مهار SIRT3 چربی‌زایی و استخوان‌زایی MSCها را کند می‌کند، در حالی که بیان بیش از حد SIRT3 پیری و استرس اکسیداتیو مرتبط با پیری را کاهش

می‌دهد، اما پتانسیل تمایز MSC‌های دیررس را افزایش می‌دهد [115]. حذف SIRT7 با تنظیم آسپلاسیون لیزین SP7/Osterix برای کاهش تشکیل استخوان و افزایش استئوکلاست‌ها، استئوپنی شدید را نشان داد [116]. m6A-متیل‌آدنوزین شایع‌ترین تغییر در RNA‌های کدکننده و غیرکدکننده‌ی ترانسکرپتوم یوکاریوتی است که یک تغییر RNA رایج و برگشت‌پذیر است که نقش حیاتی در پیری و تمایز MSC‌ها ایفا می‌کند. تغییر m6A به طور ظریفی توسط متیل‌ترانسفرازها/نویسندگان که تغییر m6A را می‌نویسند، دمتیلازها/پاک‌کننده‌هایی که تغییر m6A را حذف می‌کنند و خوانندگان m6A که عملکرد تغییر m6A را کنترل می‌کنند، تنظیم می‌شود. تغییر m6A تقریباً در کل ترانسکرپتوم رخ می‌دهد و پیرایش، پایداری، پوسیدگی، انتقال و ترجمه RNA را تنظیم می‌کند. METTL3، یک متیل‌ترانسفراز m6A، در طول استخوان‌سازی BM-MSC‌ها کاهش می‌یابد و نقش حیاتی در تنظیم تمایز و بقای MSC از طریق مکانیسم‌های وابسته به m6A ایفا می‌کند. مهار METTL3 بیان ژن‌های استخوان‌ساز و تشکیل گره‌های معدنی را از طریق فسفوریلاسیون Akt کاهش داد [117]. مهار METTL3 به میزان زیادی سطح کل m6A در mRNA را کاهش داد و چربی‌زایی BM-MSC‌های خوک را از طریق مسیر JAK/STAT به شیوه‌ای وابسته به m6A-YTHDF2 افزایش داد [118]. مهار METTL3 در BM-MSC‌ها باعث افزایش تحلیل استخوان و پوکی استخوان در موش‌ها شد که پیامدهای پاتولوژیک m6A را در بیماری‌های اسکلتی نشان می‌دهد [119]. اصلاح m6A circSTAT6 با واسطه METTL3، تمایز استخوانی BM-MSC‌ها را با تعدیل محور miR-188-3p/Beclin1 افزایش داد [120]. به طور مشابه، بیان بیش از حد METTL3 با تثبیت mRNA HOXD8 از طریق اصلاح m6A، استخوان‌زایی را در MSC‌های بیماران مبتلا به آرتروز

کاذب مادرزادی تیپیا افزایش داد [121]. در UC-MSC ها، افزایش بیان METTL3 با افزایش اصلاح m^6A در circCTTN [122] و واسطه‌گری متیلاسیون lncRNA MIR99AHG [123]، استخوان‌سازی را تسهیل کرد. علاوه بر این، METTL3 با افزایش پایداری mRNA مربوط به Bcl-2، Mcl-1 و BIRC5، از طریق اتصال IGF2BP2 به روشی وابسته به m^6A ، از BM-MSC ها در برابر آپوپتوز ناشی از هیپوکسی محافظت کرد [122، 124]. متیلاسیون RNA m^6A با واسطه METTL3، تمایز MSC های مشتق از ریه به میوفیبروبلاست‌ها را افزایش داد [125]. در BM-MSC ها، METTL14 تمایز استخوانی را از طریق محور سیگنالینگ m^6A /IGF2BPs/Beclin-1 تنظیم کرد [126]، در حالی که METTL16 با ترویج اصلاح m^6A رونوشت‌های PPAR γ ، استخوان‌سازی را سرکوب کرد و در نتیجه بیان آن را افزایش داد [127]. علاوه بر این، METTL3 با هدف قرار دادن MMP3، MMP13 و GATA3، تمایز غضروفی MSC های مشتق از سینوویوم را افزایش داد [128]. اصلاح m^6A را می‌توان توسط دمتیلازها/پاک‌کننده‌های m^6A ، مانند FTO و ALKBH5، که متعلق به خانواده دی‌اکسیژنازهای وابسته به آهن a/II-کتوگلوکوتارات (a-KG) هستند و متیلاسیون سیتوزین و آدنین را در DNA و RNA تشخیص می‌دهند، معکوس کرد. ALKBH5 یکی از دمتیلازهای کلیدی m^6A است که پیری MSC را از طریق اصلاح m^6A تنظیم می‌کند. تغییرات m^6A در طول پیری BM-MSC افزایش یافت در حالی که ALKBH5 کاهش یافت. در BM-MSC ها، ALKBH5 به طور معمول برای حذف تغییرات m^6A از RNA عمل می‌کند. مهار ALKBH5 منجر به تجمع نشان‌های m^6A روی mRNA های هدف شد. به طور خاص، افزایش تغییرات m^6A روی mRNA می CYP1B1 پایداری آن را افزایش داد و منجر به افزایش بیان پروتئین

CYP1B1 و در نتیجه تسريع پيري MSC شد [129]. در مقابل، در AD-MSC ها، تغييرات m6A کاهش مي يابد، در حالي كه بيان ALKBH5 در طول پيري افزايش مي يابد. در اين زمينه، ALKBH5 بيان يك هدف متفاوت، CDKN1C، يك مهاركننده كيناز وابسته به سيكلين كه توقف چرخه سلولي را تقويت مي كند، با تعديل پايداري mRNA از طريق فعاليت دمتيلاسيون m6A تنظيم كرد [130]. اين يافته ها نشان مي دهد كه ALKBH5 ممكن است بسته به ژن هاي هدف و چشم انداز m6A، اثرات تنظيمي خاص منبع سلولي را بر پيري MSC اعمال كند. خوانندگان m6A شامل YTHDC1/2، YTHDF1/2/3، eIF3، HNRNP و IGF2BP1/2/3 هستند كه عملکرد m6A را روي RNA ها در سطوح مختلف تعيين مي كنند. YTHDF1 از طريق تنظيم ترجمه ZNF839، استخوان سازي BM-MSC ها را افزايش داد [131]، در حالي كه حذف YTHDF1، استخوان سازي BM-MSC ها را در شرايط آزمايشگاهي مختل كرد و منجر به کاهش توده استخواني در داخل بدن شد [131]. YTHDF1 همچنين با فعال كردن مسير سيگنالينگ Wnt/ β -catenin، غضروف سازي را افزايش داد [132]. اصلاح m6A با واسطه WTAP-YTHDF1 از mRNA هاي IDO1، PD-L1، ICAM1 و VCAM1 در تنظيم عملكردهاي سرکوب كننده سيستم ايمني داراي مجوز IFN- γ در MSC ها نقش داشت [133]. YTHDF3 mRNA مربوط به IL32 را تثبيت كرد و تمايز استخواني AS-BMSC ها را از طريق مكانيسمي وابسته به m6A افزايش داد [134]. در حالي كه اين يافته ها اهميت m6A را در بنياديني و عملکرد MSC برجسته مي كند، مكانيسم هاي تنظيمي دقيق هنوز به طور كامل روشن نشده اند.

