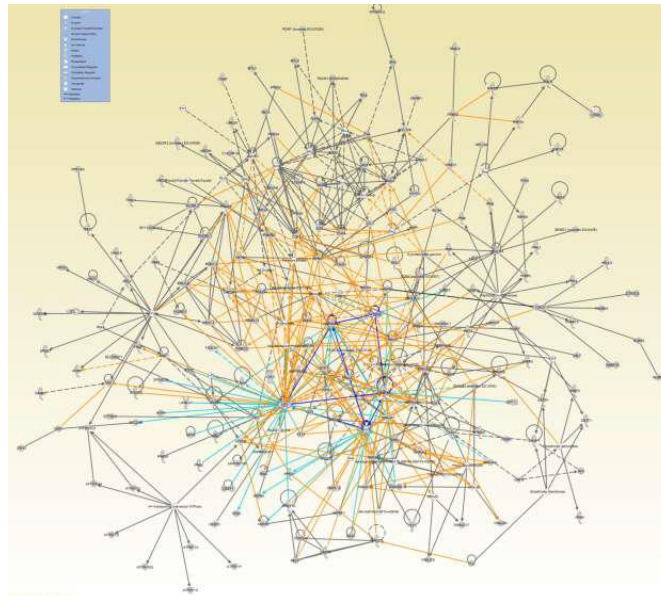
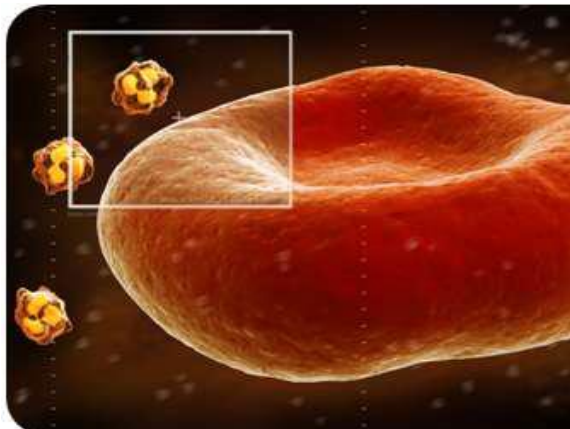




ΕΙΔΙΚΑ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΟΣ ΕΡΥΘΡΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ»



Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, *Ph.D.*

Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας,
Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

In vivo

RBCs number is approximately $4-5 \times 10^{12}/L$ in circulating blood

on the basis of their average lifespan (120 days)

in an individual with 5L of blood

more than 10^{11} erythrocytes are newly formed and removed each single day

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

an issue of special scientific and clinical interest

RBCs: have been used as a **model for aging study**

However, the **molecular participants and signalling pathways** are not yet completely clarified

Επιταχυνόμενη ή διαταραγμένη κυτταρική γήρανση

(ασθένειες, ηλικία, αποθήκευση ΣΕ για μετάγγιση κλπ)

Γήρανση: το σύνολο των μονοδιάστατων και χρονοεξαρτώμενων (αλλά όχι απαραίτητα γραμμικών) μοριακών γεγονότων τα οποία οδηγούν σε **κυτταρική εκκαθάριση-θάνατο**

A. Γήρανση RBCs
(αύξηση κυτταρικής ηλικίας)

B. Εκκαθάριση φυσιολογικών RBCs
(κυτταρικός θάνατος)

Κυτταρικός θάνατος αφορά στα RBCs μεγάλης ηλικίας

Άνθρωπος και άλλα είδη θηλαστικών

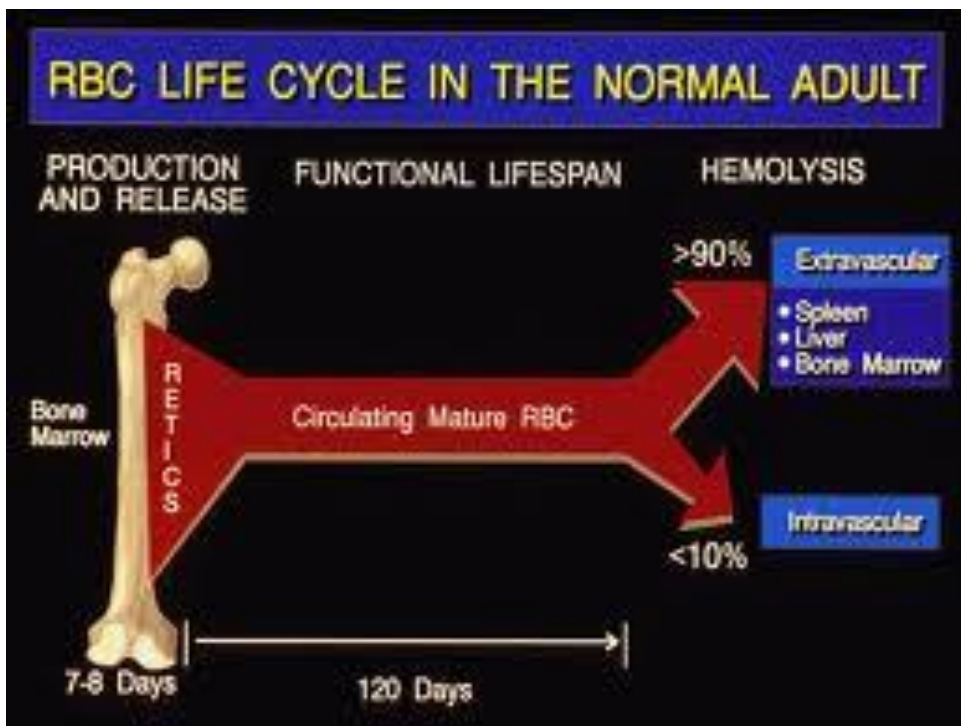
120±4 days:

Normal human RBCs **all survive to about the same age**, which implies the likely existence of a **molecular countdown** that triggers, at the proper time, a series of changes leading to **removal** by the reticuloendothelial system

- **προγραμματισμένη** (μοριακοί μηχανισμοί??) διάρκειας επιβίωσης
- **μη τυχαία** (επιλεκτική) απομάκρυνση γηρασμένων κυττάρων

(Τυχαία αιμόλυση: καταστροφή RBCs ή τμημάτων τους ανεξάρτητα από την κυτταρική ηλικία)

- 1. Εξωαγγειακή αιμόλυση (ερυθροφαγοκυττάρωση – σπλήνας, ήπαρ, ΒΜ)**
- 2. Ενδοαγγειακή αιμόλυση (οσμωτική λύση ή κυτταρική θρυμματοποίηση)**



Γήρανση ερυθροκυττάρων

Τυπική προσέγγιση μελέτης γήρανσης: Νεαρά και γηρασμένα RBCs

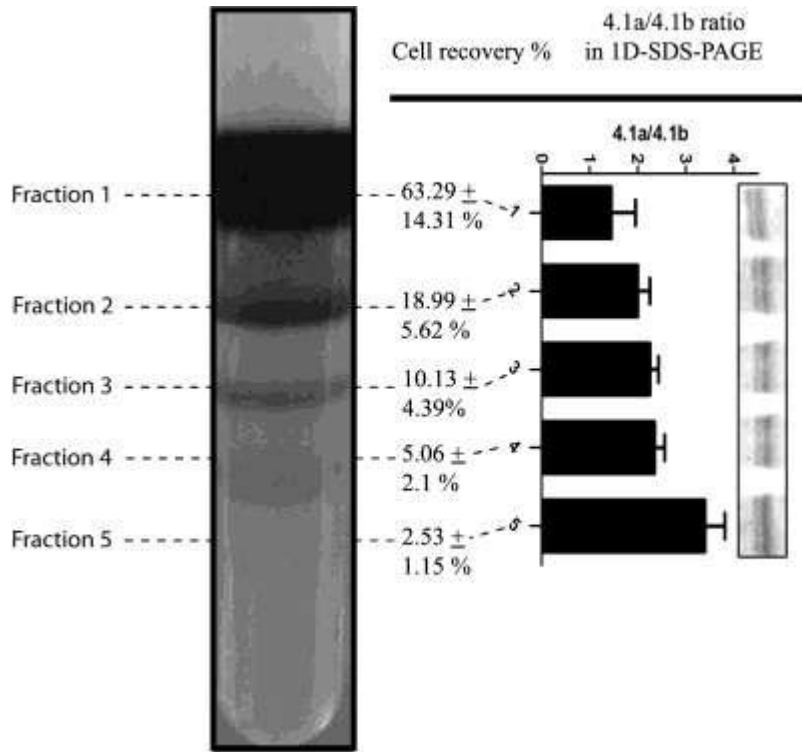
Τεχνικές δυσκολίες στην απομόνωση γηρασμένων RBCs

Since ageing RBCs have been shown to undergo **dehydration** with increased **density** and decreased **size**, most of the investigations have been performed by means of **centrifugation** or through the use of several discontinuous gradients, including albumin and **Percoll**

alternative approaches: **biotin labeling** for the age-dependent separation of normal RBCs in animals

1. Κυτταρική **πυκνότητα**
2. Ασθενείς με κατασταλμένη **ερυθροποίηση**
3. **Βιοτινυλίωση** RBCs σε πειραματόζωα

Γήρανση ερυθροκυττάρων



Percoll density gradient of freshly drawn, RBC concentrates.

Five distinct populations are visible, which are numbered from top to bottom

Angelo D'Alessandro, PhD Thesis, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO, 2013

Γήρανση ερυθροκυττάρων

1. As it has been noted over the years, the mechanisms underlying RBCs aging share some features with programmed cell death of nucleated cells-

Lang's group: "**eryptosis**", that refers to erythrocyte-specific apoptosis

2. **Storage under blood bank conditions**: exacerbation of most of these changes and shortening of RBC lifespan ("**storage lesions**")

ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

pRBCs : πιο **συχνά μεταγγιζόμενο** παράγωγο αίματος

80 εκατομμύρια μονάδες RBCs κάθε χρόνο (worldwide)

1% του πληθυσμού στις ανεπτυγμένες χώρες δέχεται μία μετάγγιση ετησίως

ΣΗΜΕΡΑ:

RBCs: μπορούν να αποθηκευθούν παρουσία πρόσθετων διαλυμάτων μέχρι 6 εβδομάδες

✓ **0.4% hemolysis** in the stored bag (QC 1%)

✓ **84% 24-h in vivo ανάκτηση** (QC 75%)

✓ **Φυσιολογική επιβίωση των υπόλοιπων κυττάρων στην κυκλοφορία**

- Τα τρέχοντα συστήματα αποθήκευσης RBCs είναι **ικανοποιητικά** αλλά **όχι και τα βέλτιστα δυνατά**

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ

Αποθήκευση RBCs σε υγρά μέσα με αντιπηκτικά, συντηρητικά, πρόσθετα διαλύματα



(i) 35-42 ημέρες 4°C

(ii) Cellular and chemical/plasma environment (survival factors/signals)

(iii) Κυτταρικά απόβλητα

(iv) No clearance mechanisms!!!!

(senescent RBCs are probably sentenced to "survive" for a longer period than they were probably programmed for...) ⇒

κατάλληλο σύστημα μελέτης γήρανσης των ερυθροκυττάρων

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ

“Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθρών”

1. Μεταβολικές αλλαγές
2. Οξειδωτικές αλλαγές
3. Φυσιολογικές αλλαγές
4. Αιμόλυση
5. Απώλεια μεμβρανικών πρωτεϊνών/σκελετικών πρωτεϊνών/λιπιδιακές σχεδίες
6. Σηματοδότηση Ca^{++}
7. ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ_ΕΡΥΘΡΟΠΤΩΣΗΣ_ΕΡΥΘΡΟΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ-ΘΑΝΑΤΟΥ

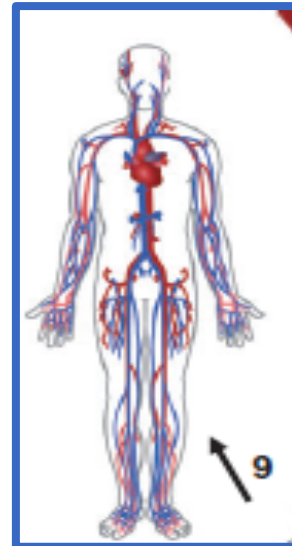
- ✓ storage lesions are **only reversible to some extent**
- ✓ **affect RBC viability and functionality**
- ✓ effectiveness of the transfusion **therapy with older units**
(controversial clinical data)

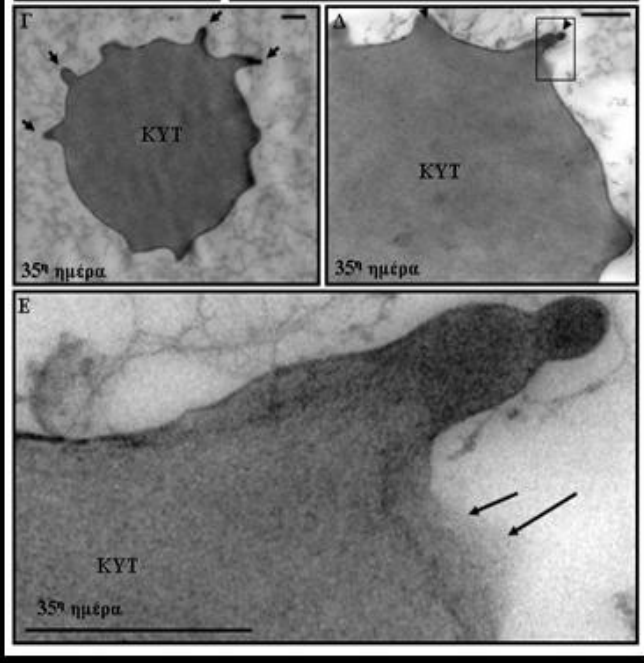
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ

- Μεταβολισμός – Ενέργεια
- Αναδιοργάνωση Μembrάνης
- Κυστιδιοποίηση
- Σηματοδότηση Γήρανσης-Θανάτου ΑΙΜΟΛΥΣΗ
- Οξειδωτικές βλάβες
- Συσσώρευση βιοενεργών συστατικών (MPs, proteins, lipids)

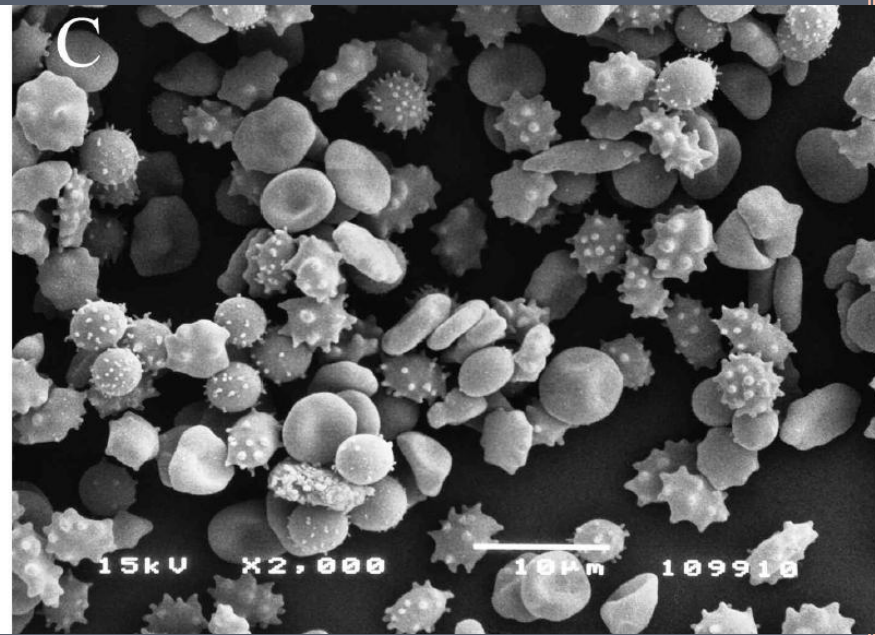
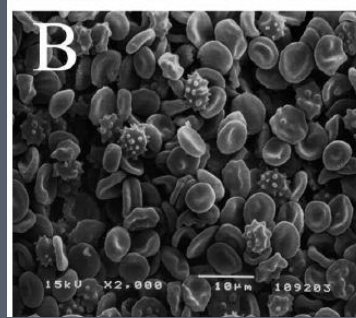
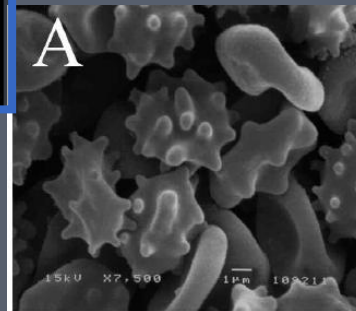
✓ **ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO***

Φλεγμονή
Θρόμβωση
Ανοσορύθμιση





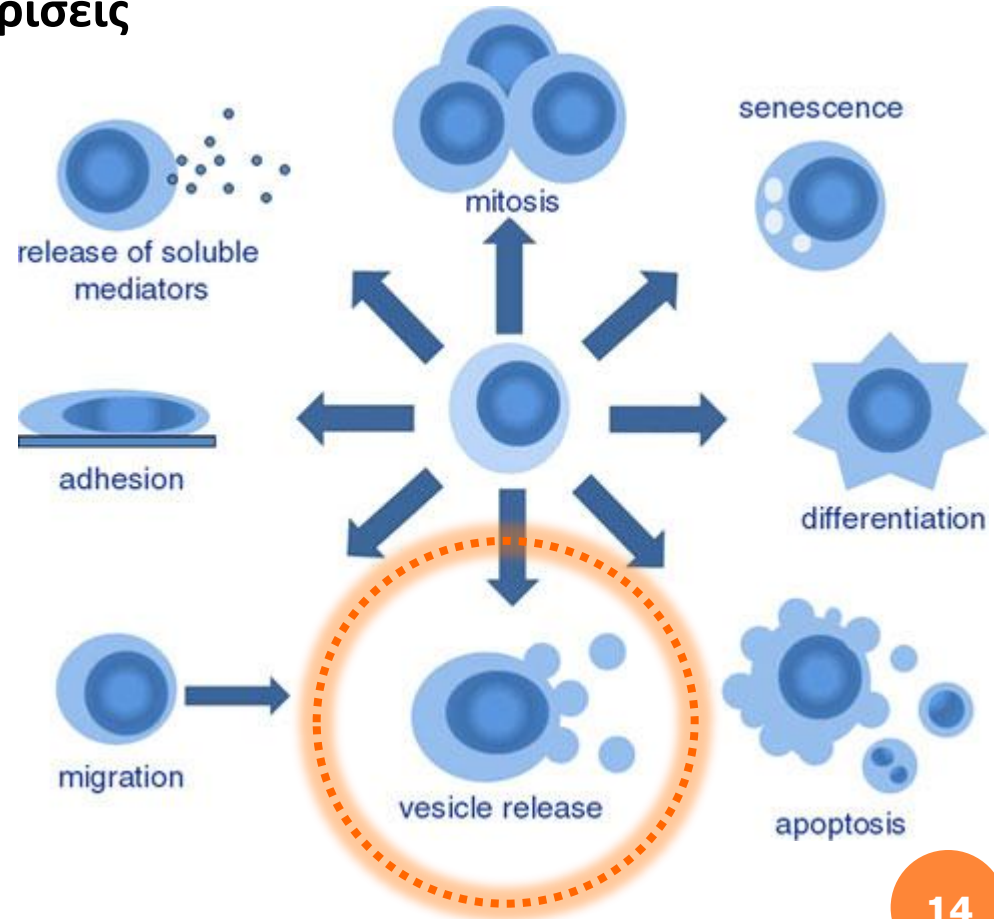
Δισκοκύτταρα σε σφαιροεχθνοκύτταρα



ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Προσαρμοστικές κυτταρικές αποκρίσεις

Χρόνος
Περιβάλλον
Ερεθίσματα



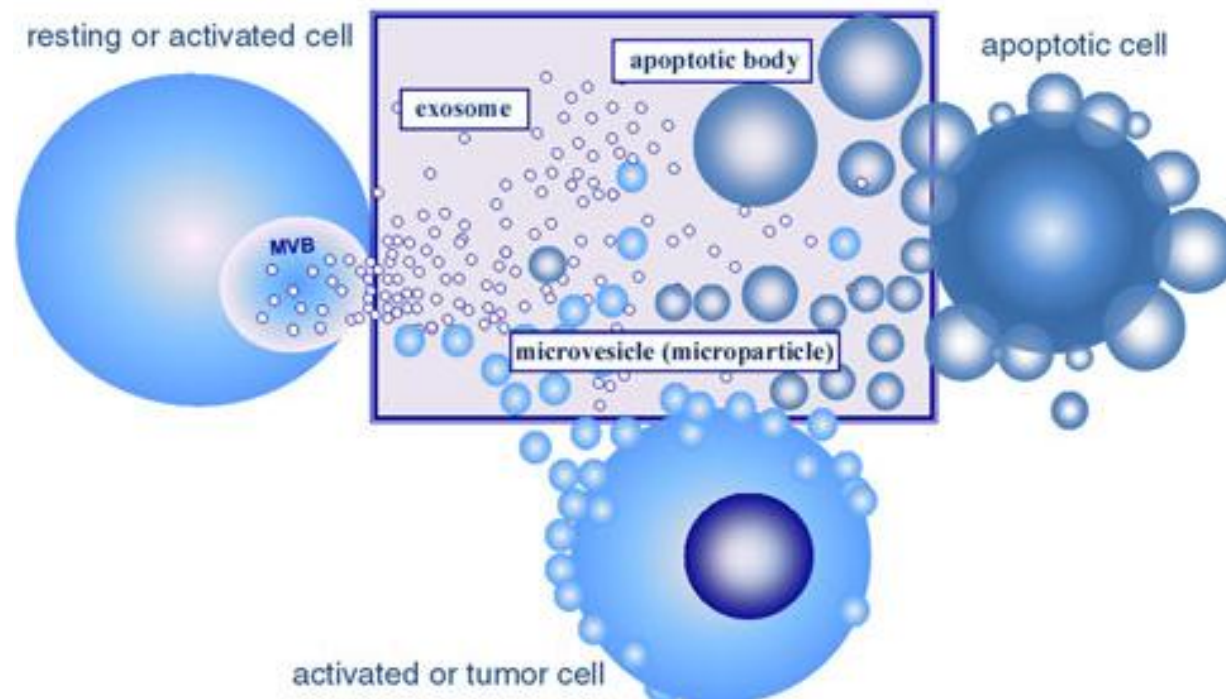
(Gyorgy et al., Cell Mol Life Sci, 68:2667, 2011)

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Υποκυτταρικά σωματίδια/κυστίδια – αποκόπτονται σε συνθήκες **μηχανικού στρες**, κυτταρικής ενεργοποίησης, βλάβης ή απόπτωσης

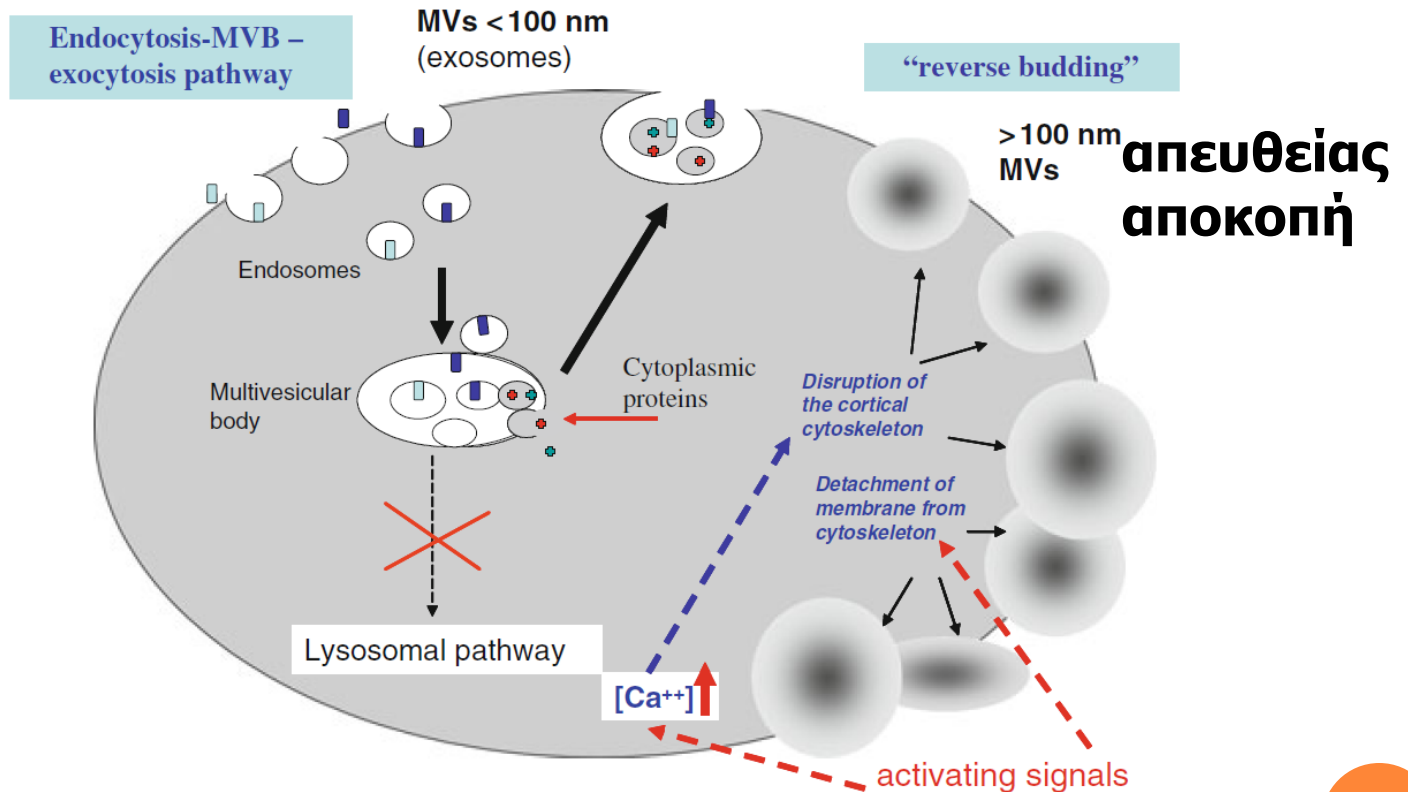
Παράγοντες του **Εξωκυττάριου Κυστιδιακού Διαμερίσματος**

(Gyorgy et al., Cell Mol Life Sci, 68:2667, 2011)



ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

- ▶ Μικροκυστίδια = Εξωκυστίδια (\neq Εξωσώματα)



ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Exosomes

vesicles secreted by **antigen-presenting cells** - potential role in the immune response

50–100nm diameter

Resident proteins: **hsc70**, **Alix** or **Tsg101**

Ubiquitylation, ESCRT machinery

Exosomes were **first described in erythroid cells**, during reticulocyte maturation (extensive membrane remodeling through exosome secretion)

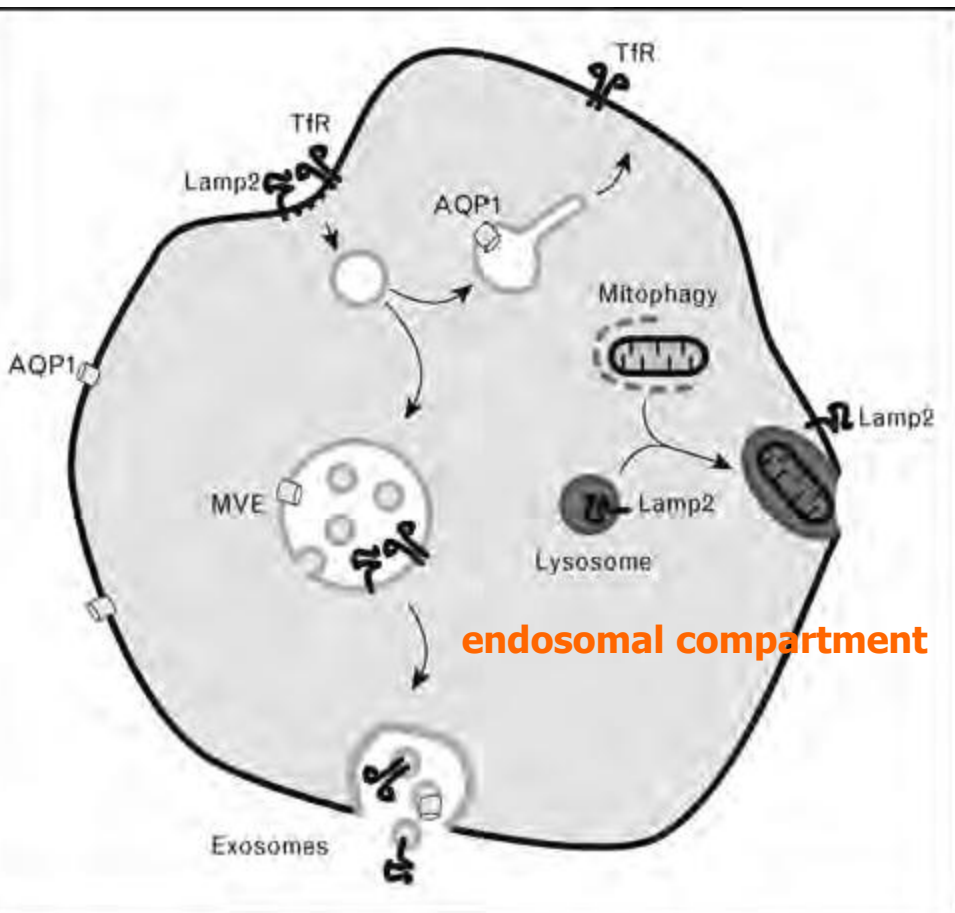
- 1) integral part of the red cell differentiation program
- 2) protein sorting –Retention (B3, glycoporphins etc) or Disposal (unwanted proteins eg. TrfR, Aqp1 etc)

ΚΥΣΤΙΑΙΟΠΟΙΗΣΗ

Exosomes

(Blanc and Vidal, *Curr Opin Hematol* 17:177, 2010)

Adaptation to new roles and new environmental conditions



TfR, Aqp-1, adhesion molecules κλπ

The extracellular osmotic conditions found in the peripheral circulation vs. the bone marrow could dictate a lower level of expression of **aquaporin-1** on the mature red cell surface

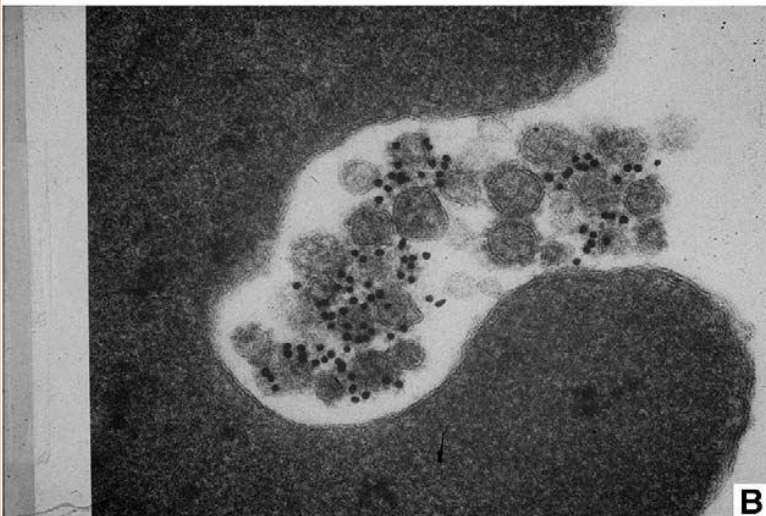
Adhesion molecules (eg. integrins): active in the highly adherent erythroblast/macrophage interactions in erythroblastic islands in the BM but useless to the non-adherent mature circulating RBCs

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Exosomes



(A) Exosomes in maturing sheep RETs. **18h of incubation** after surface labeling of sheep RETs with **MoAb against the transferrin receptor**. After incubation, the gold label is found in intracellular sacs (MVBs) but associated with the surface of the internal exosomes. The black arrow shows a sac beginning to fuse with the plasma membrane.



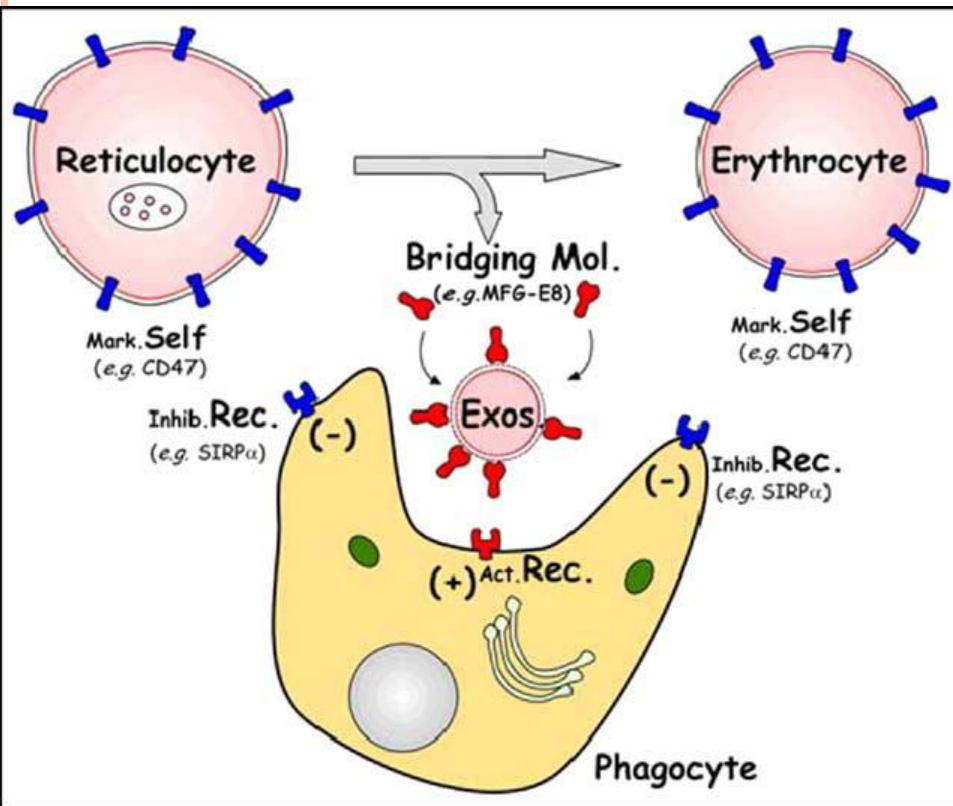
(B) Conditions as above but after **36 h of incubation**. Fusion has fully occurred and release of exosomes is apparent. All the gold label remains on the surface of the exosomes.

(Johnstone RM, Blood Cells Molecules & Diseases 34:214, 2005)

ΚΥΣΤΙΑΙΟΠΟΙΗΣΗ

Exosomes

Contrary to exosomes secreted by antigen presenting cells, elimination of vesicles released by RETs always has to occur **in a tolerance setting, preventing inflammatory reactions** and unwanted immune responses to self-antigens



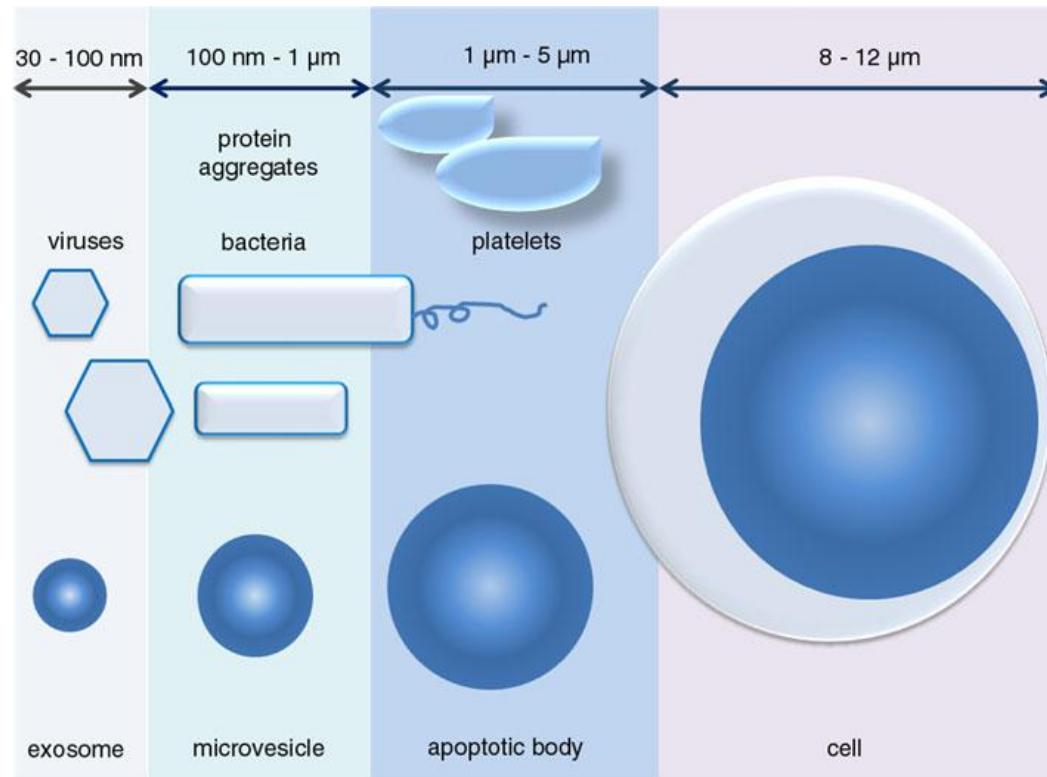
- (i) appearance of altered-self markers (“eat-me” signals, eg. PS) on the exosome surface
- (ii) Disappearance of molecules preventing engulfment (“don’t-eat me” Signals, eg. CD47).

(Blanc et al., Blood Cells Molecules and Diseases, 35:21, 2005)

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Microvesicles/Microparticles

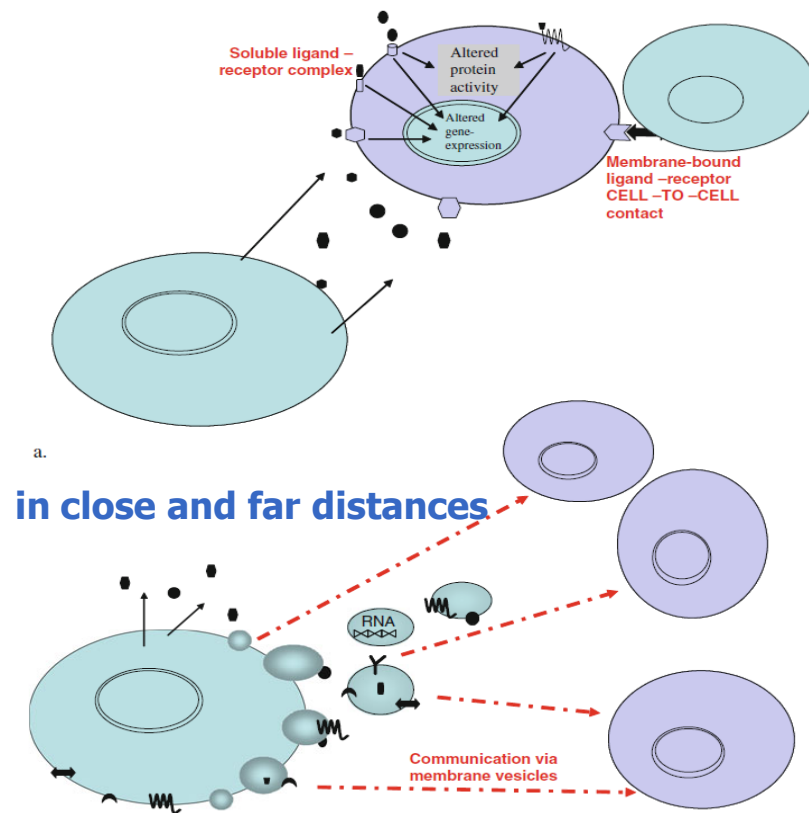
Μικρά και ετερογενή



(Gyorgy et al., Cell Mol Life Sci, 68:2667, 2011)

Καινούριος και αποτελεσματικός μηχανισμός διακυτταρικής επικοινωνίας /σηματοδότησης

Κλασικό vs. κυστιδιακό μονοπάτι σηματοδότησης



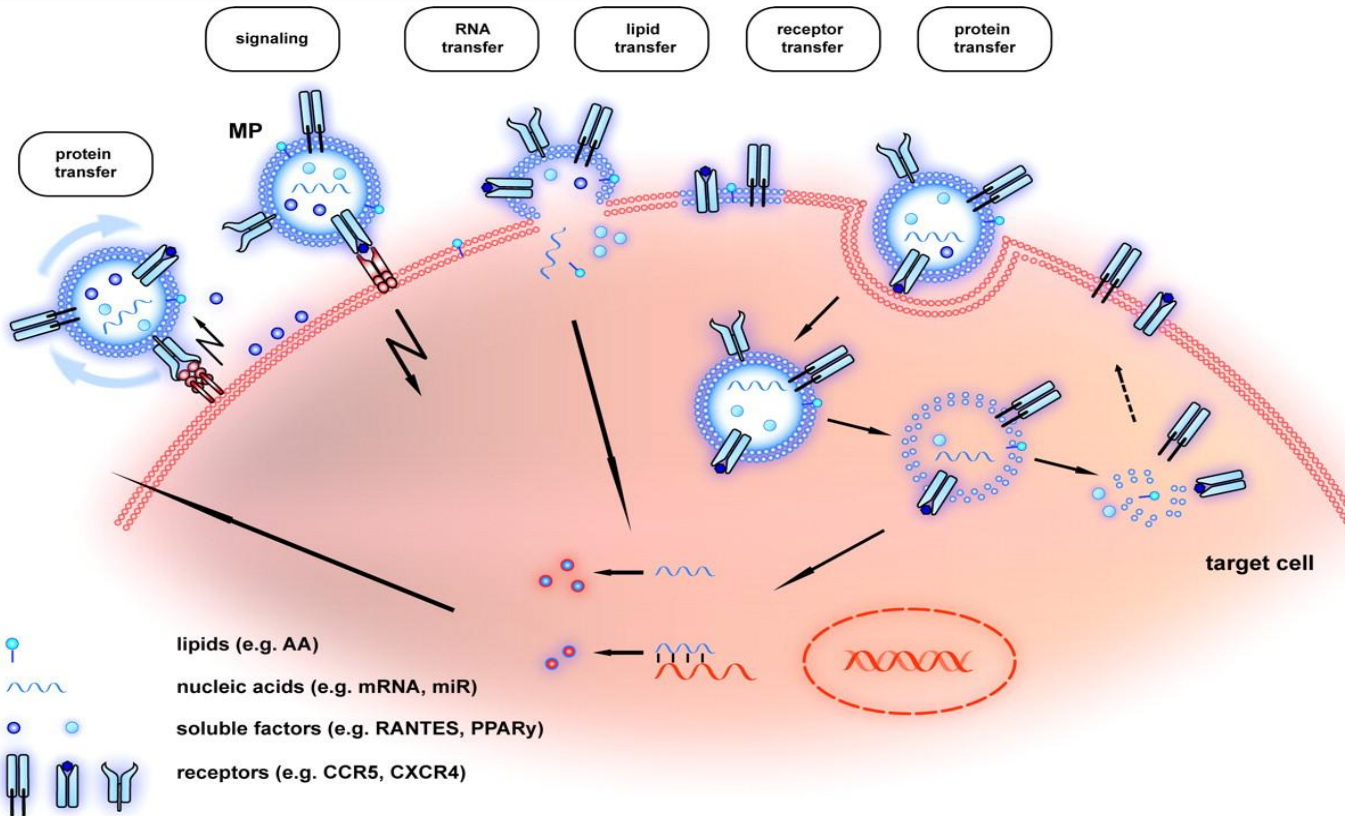
Direct contact between cells
By means of **soluble** substances

MPs: “πακέτα” συμπυκνωμένης πληροφορίας
(παρουσιάζουν πολλά σηματοδοτικά μόρια/μηνύματα ταυτόχρονα σε μεγάλη ποσότητα)

specific recognition of target cells

nucleic acid: epigenetic regulation of the recipient cell

Microvesicles/Microparticles



Stimulation via **receptor** interactions or direct **transfer** of their highly concentrated signalling components: proteins, lipids, RNA

*Mause S F , Weber C Circulation Research 2010;107:1047-1057
Copyright © American Heart Association*

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Microvesicles/Microparticles

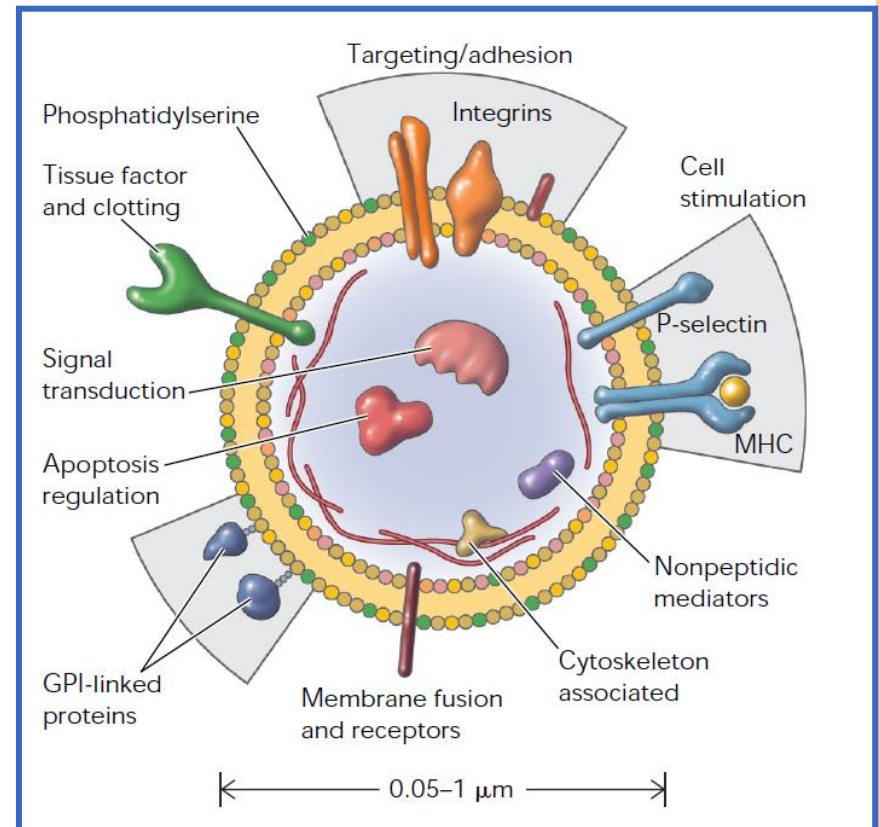
- ✓ Επιφανειακοί δείκτες γονικών κυττάρων (Cell-specific, R-MPs, P-MPs etc)
- ✓ Μembranικά και κυτταροπλασματικά συστατικά (ΟΧΙ ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ μεμβράνης, διαλογή),
- ✓ PS (Annexin-V), Tissue Factor

ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΝ:

φλεγμονή

πήξη

ανοσολογική απόκριση (Rh Ags...)



Hugel et al., PHYSIOLOGY 20:22, 2005

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Microvesicles/Microparticles

Τα επίπεδα **MPs στο αίμα υγιών ατόμων** είναι συνήθως χαμηλά.

Αυξημένα σε διάφορες **παθολογικές καταστάσεις** (κυρίως θρομβωτικές και φλεγμονώδεις)

Autoimmune diseases

(Systemic lupus erythromatosus, Rheumatoid arthritis, Type 1 DM etc)

Cardiovascular diseases

Hematologic diseases (PNH, SC...)

Cancer

Alzheimer's disease

Type 2 diabetes mellitus

End-stage renal disease

Preeclampsia

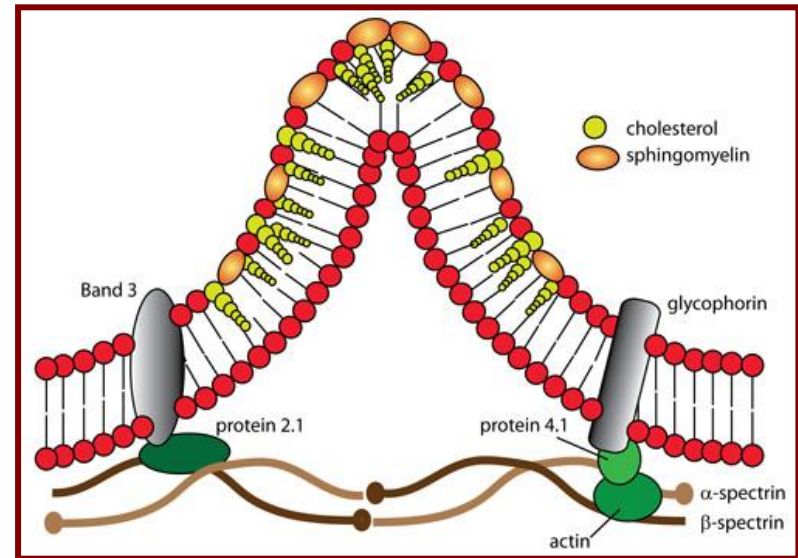
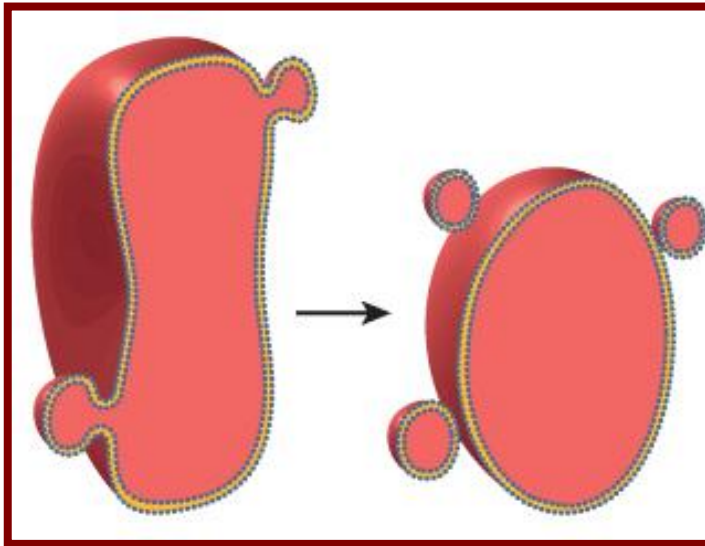
Sepsis

Βιοδείκτες (συντελεστές ή αποτέλεσμα/ένδειξη της επιδείνωσης της ασθένειας??)

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Microvesicles/Microparticles

ΚΑΘΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ: Συνεκτικότητα διπλοστοιβάδας-σκελετού, ακεραιότητα μεμβράνης, διατήρηση επιφάνειας



Απώλεια κυτταρικής επιφάνειας, Hb, ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης

Αναδιαμόρφωση κυτταρικής μεμβράνης

Aging, Ca⁺⁺, oxidative stress, mechanical stress...

ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Microvesicles/Microparticles

nano: >60 nm, micro: >150 nm (1 μ m)

Σύσταση:

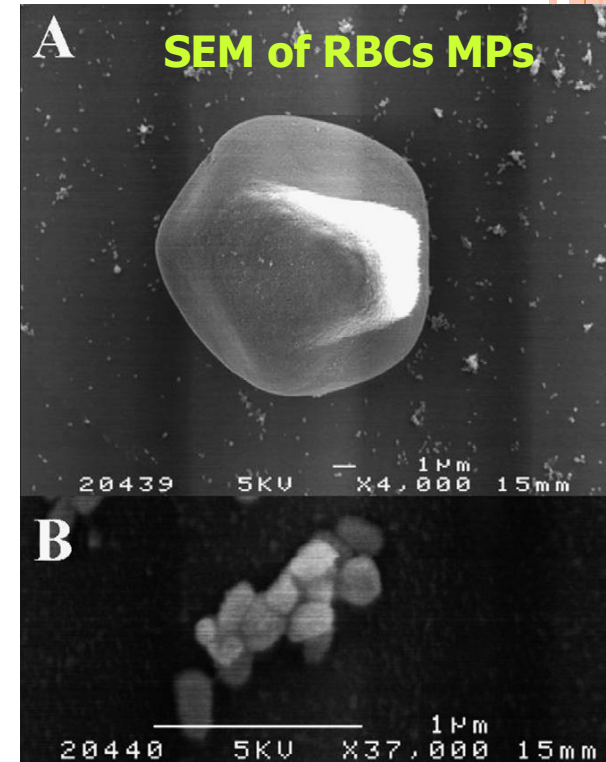
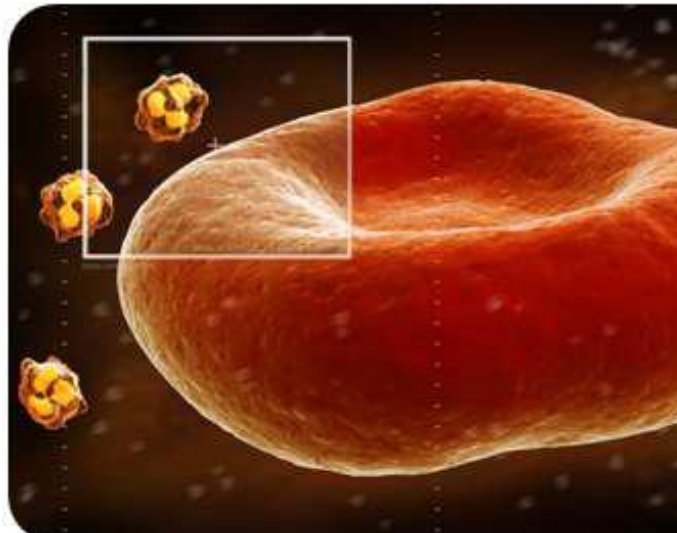
λιπίδια (PS)

πρωτεΐνες (όχι σκελετικές, Hb, Ags, λιπιδιακές σχεδίες)

Defected material

Death signals

*Angelo D'Alessandro, PhD
Thesis, UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO, 2013*



(Rubin et al. (2010) Talanta 82:1-8)

Γήρανση ερυθροκυττάρων

Εξωκυστιδιοποίηση μεμβράνης, σχηματισμός εξωκυστιδίων

Προοδευτικά με τη γήρανση των RBCs

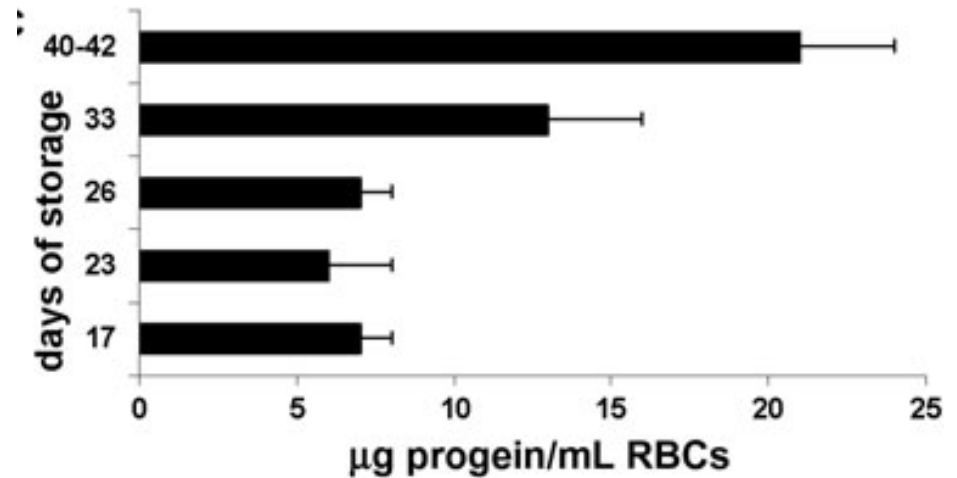
Αυξάνεται στο δεύτερο ήμισυ της ζωής του ερυθροκυττάρου

- Απώλεια μεμβράνης
- Προστατευτικός μηχανισμός έναντι πρόωρης απόσυρσης

Γήρανση ερυθροκυττάρων

pRBCs-MPs

MPs accumulation during the storage of RBCs concentrates



(Antonelou et al., TRANSFUSION 2010;50:376)



ΓΗΡΑΝΣΗ & ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ

Συσσώρευση προοδευτικών μεταβολικών και φυσικοχημικών αλλοιώσεων

- ❖ **Εξωκυστιδιοποίηση** μεμβράνης, σχηματισμός μεμβρανικών εξω-κυστιδίων
- ❖ **Τροποποιήσεις Hb** (eg. nonenzymatic glycation, HbA1c)
- ❖ Αντιοξειδωτική άμυνα (βλάβες)

Ηλικιακοί δείκτες RBC

- ❖ Κυτταρική ομοιόσταση
- ❖ Ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης
- ❖ **4.1b/4.1a** (deamidation of protein 4.1b to 4.1a)
- ❖ Κυτταρική **πυκνότητα/όγκος**
- ❖ Μείωση ενεργότητας ενζύμων (ATP)
- ❖ Φορτίο κυτταρικής επιφάνειας

ΓΗΡΑΝΣΗ & ΘΑΝΑΤΟΣ

Senescent signals ΚΑΙ Σηματοδότηση θανάτου RBC

Γρήγορες, **απότομες**, **μη-γραμμικές**, μη προοδευτικές δραστικές αλλαγές σε προ-υπάρχοντα μόρια, λίγο πριν την εκκαθάριση των κυττάρων

Απόληξη διαφορετικών σηματοδοτικών μηχανισμών

- ❖ Νεο-αντιγόνα γήρανσης (δείκτες αναγνώρισης)
- ❖ Απώλεια “markers of self”
- ❖ Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS?)
- ❖ Διαταραχή ομοιόστασης Ca^{++} και άλλων κατιόντων
- ❖ Αντιδράσεις ελεύθερων ριζών

ερυθροφαγοκυττάρωση

Γήρανση ερυθροκυττάρων

"RBC aging phenotype"

(the repertoire of age-dependent alterations), can be safely associated with:

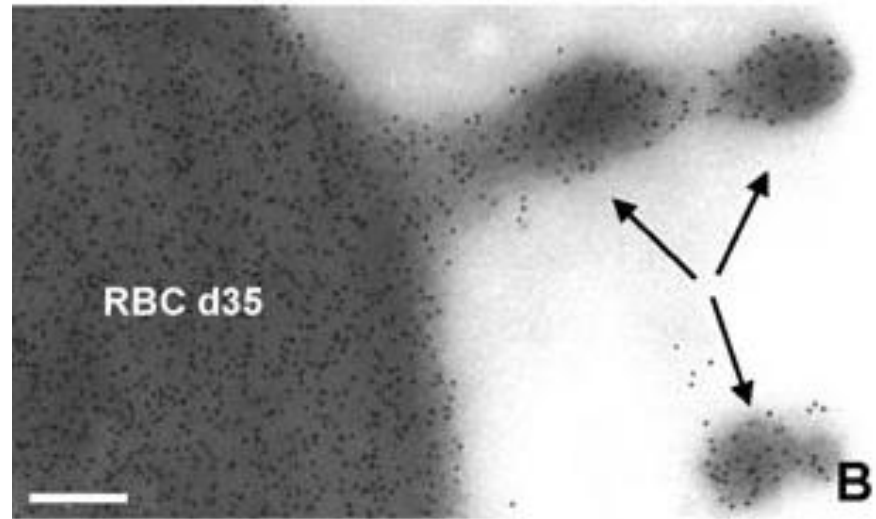
1. decline in **metabolic** activity
2. progressive cell **shape** transformation
3. **membrane** remodeling
4. **oxidative** injury
5. **Microvesiculation**
6. Exposure of surface **removal** markers

Γήρανση ερυθροκυττάρων

Κυστιδιοποίηση

RET maturation: 10-14% membrane loss

RBC maturation: 16-17%



In vivo: σε όλη τη διάρκεια της φυσιολογικής ωρίμανσης/γήρανσης RBCs, αλλά επιταχύνεται στα γηρασμένα κύτταρα

MPs: απομακρύνονται αποτελεσματικά /γρήγορα από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα

ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

“non-self” RBCs

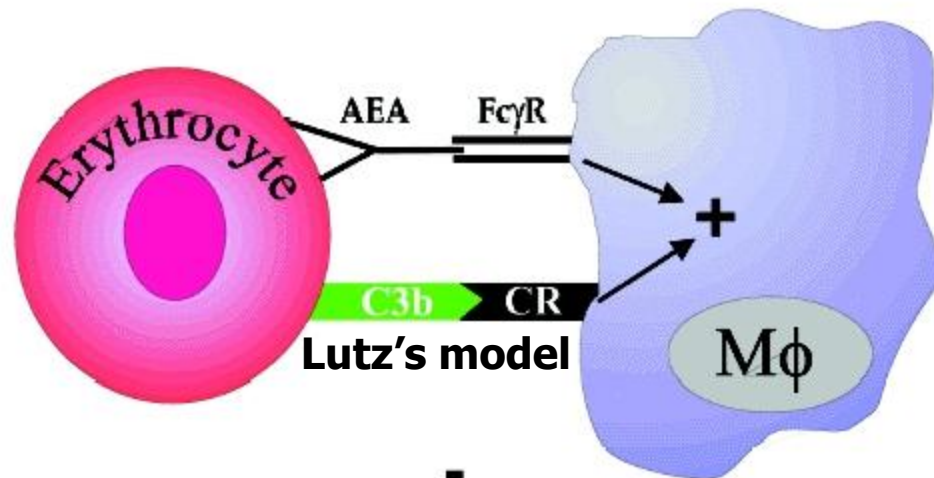
Kay M.
Low PS.
Lutz HU.



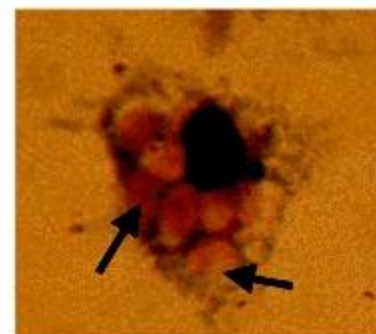
Αναγνώριση

Ερυθροφαγοκυττάρωση

Νέο-αντιγόνα γήρανσης

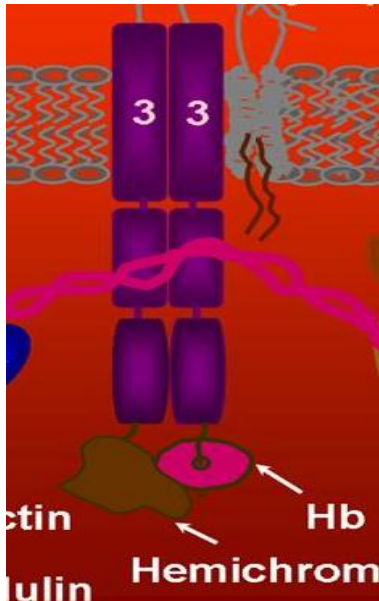


Erythrophagocytosis

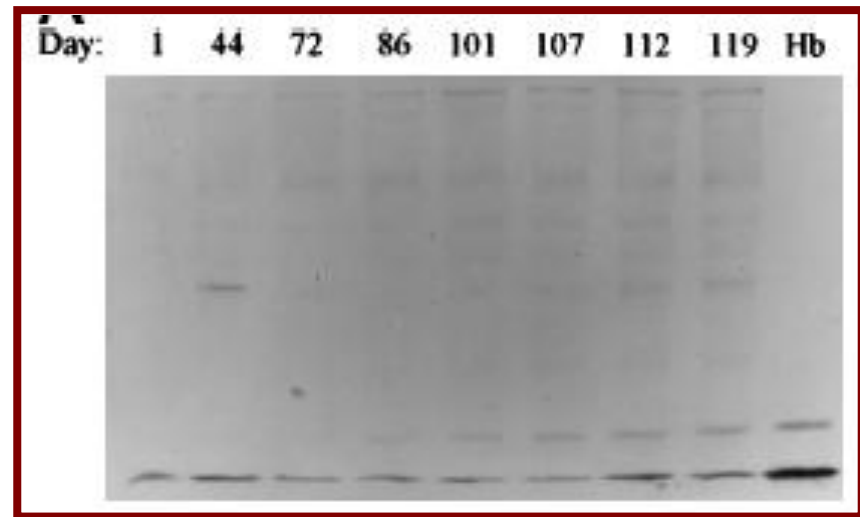


Band 3-based aging pathway

Πρόσδεση οξειδωμένης/αποδιαταγμένης Hb και IgGs στην EM κατά τη γήρανση



In vivo aging (dog's RBC *in vivo* biotinylation)



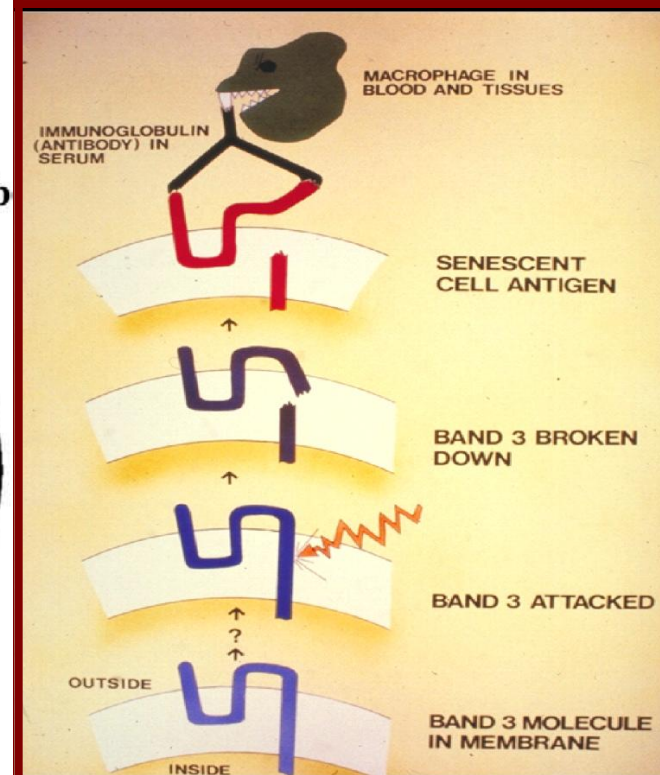
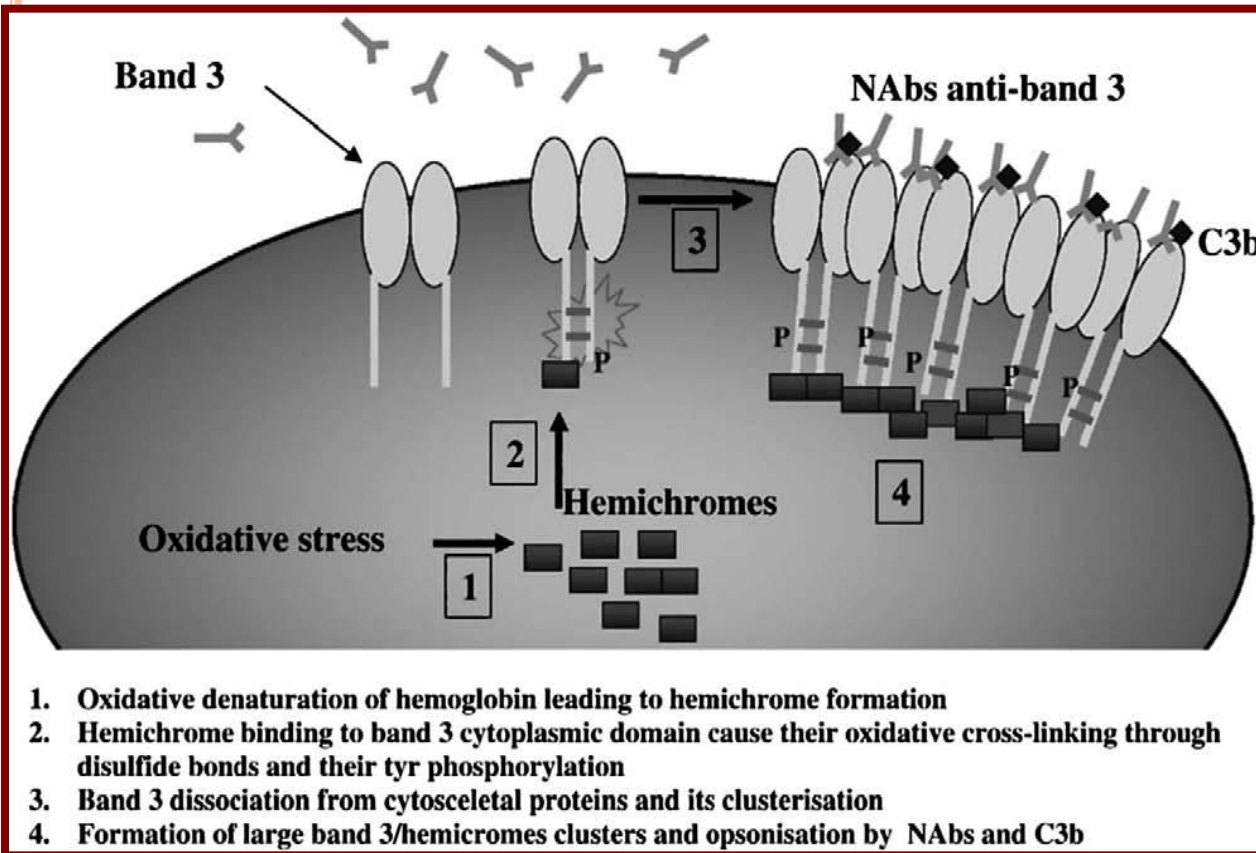
(Rettig et al., Blood, 1999, 93:376)

(Christian et al., Blood 1993, 11:3469)

□ **clustering** and/or **breakdown** of Band 3: the central step in the major **immunologically** mediated pathway, leading to the generation of a powerful **senescent signal**, a senescent-specific **neo-antigen**, *in vivo*

Band 3-based aging pathway

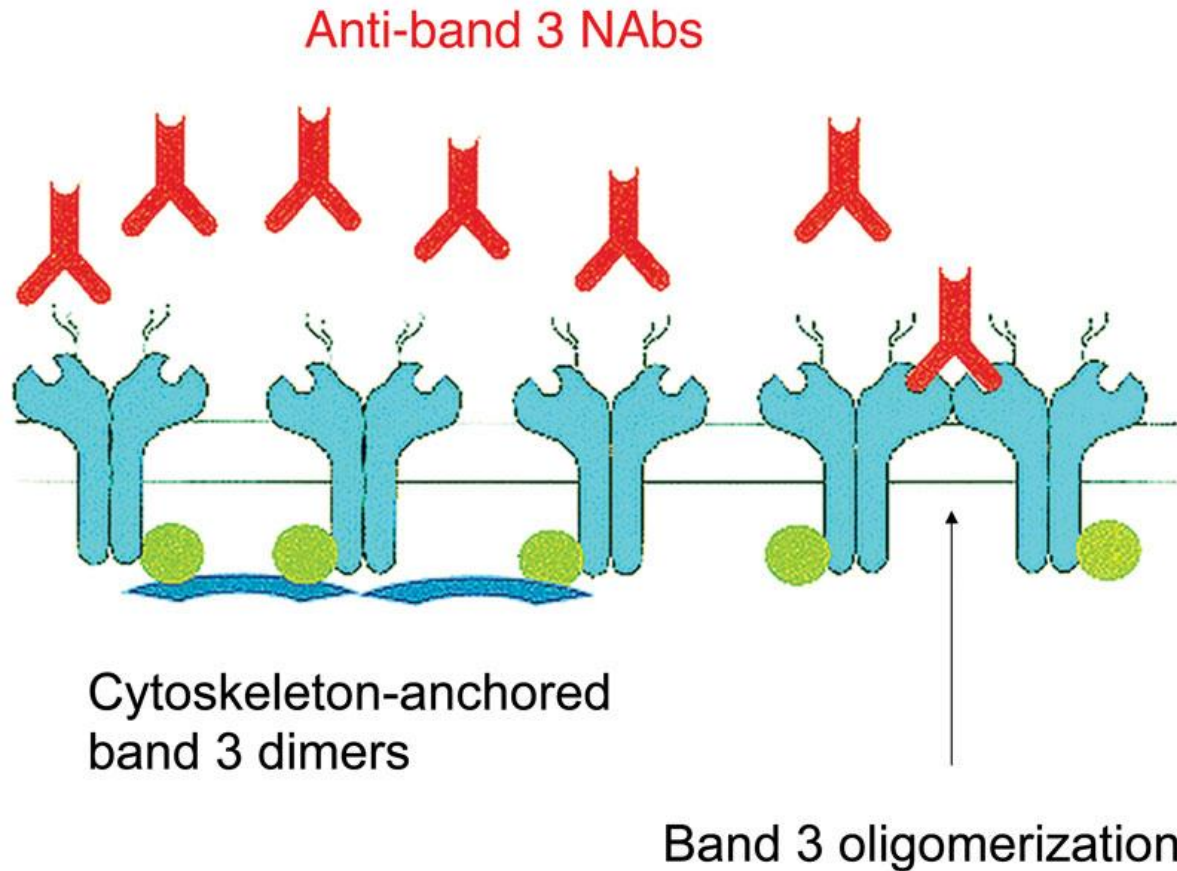
(Autoimmunity Rev. 2008;7:457)



Οψωνισμός γηρασμένων RBC, πιθανόν σε θέσεις **συσσωματωμάτων ζώνης-3** που σταθεροποιούνται από **αιμοχρώματα** → αναγνώριση/απομάκρυνση

(!) 100-500 IgGs/RBC→phagocytosis (Kupffer cells in the liver)

Band 3-based aging pathway



Band 3-based aging pathway

Upwards: free radical oxidation: important factor underlying the formation of the senescent signal.

Evidence:

RBC oxidation levels *in vivo* \Leftrightarrow *breakdown of Band 3*

\Leftrightarrow autologous IgG binding

Elevated membrane-bound modified Hb \Leftrightarrow high incidence of autologous IgG binding.

Downwards: senescence neoantigen appearance

Binding of both autologous **IgGs** and probably **C3** fraction of the complement to the membrane

erythrophagocytosis

Band 3-based aging pathway

Similar processes seem to be responsible for premature RBCs clearance in:

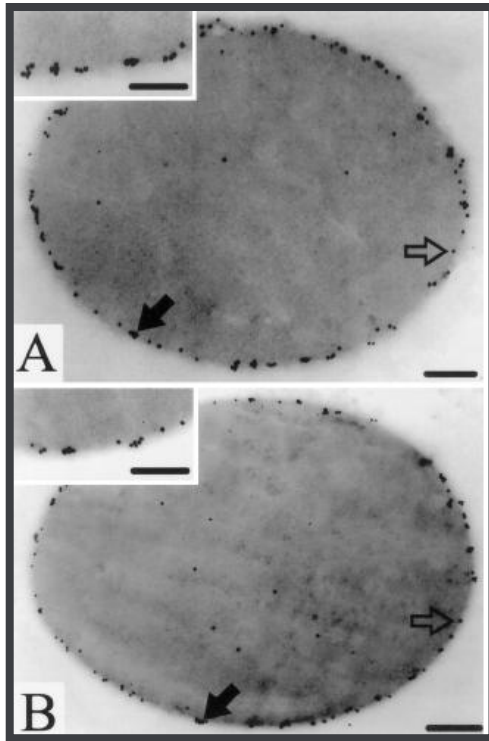
haemoglobinopathies

Membrane protein deficiencies

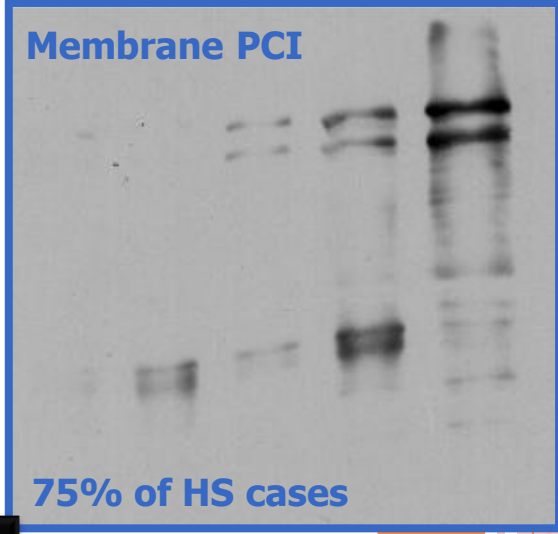
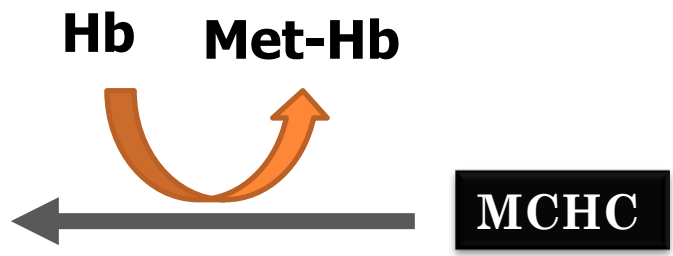
Down's syndrome

Alzheimer's disease etc

• παλλιδίνη (b4.2)	90%
• actin (b5)	40%
• G3PD (b6)	40%
• band 8	65%
• Hb*	>85%
• IgG's	80%



RBCs aging defect in HS



(Rocha et al., BCMD, 2008)

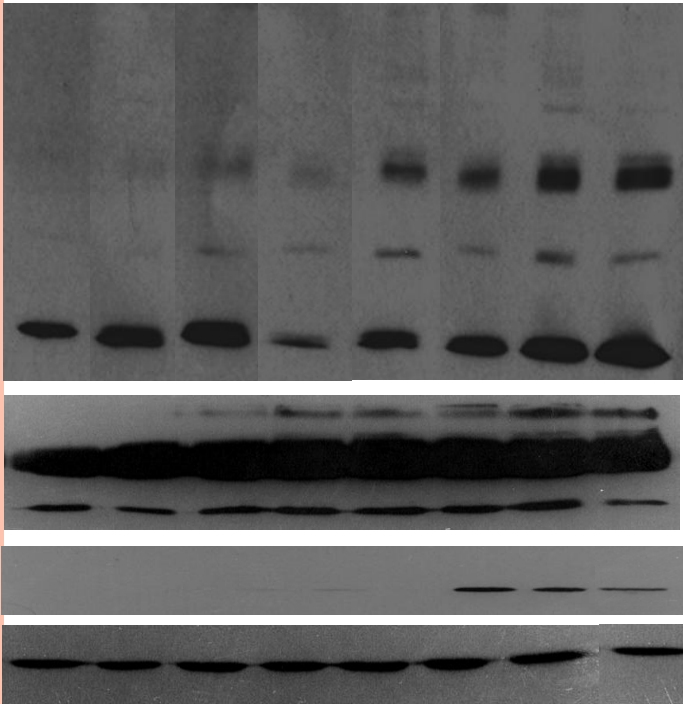
(Margitis et al., BCMD 38:210, 2007)

(Reinhardt et al., 2001; BCMD 27:399)

Band 3-based aging pathway

Membrane remodeling during storage of pRBCs

C 4 10 17 22 30 35 43

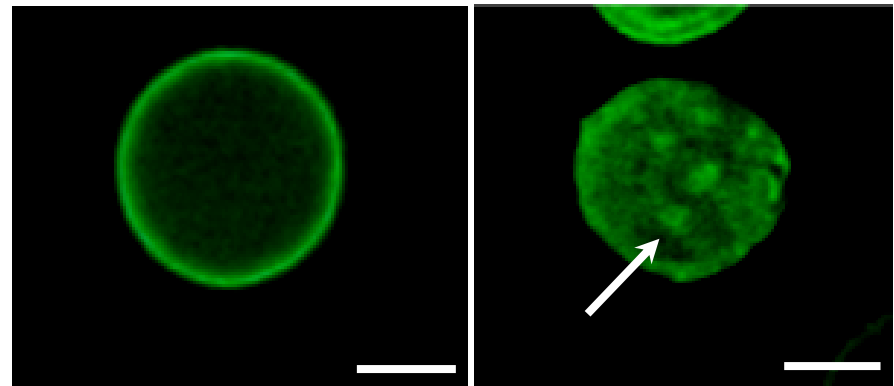


Hb

Band III

IgGs

Loading control



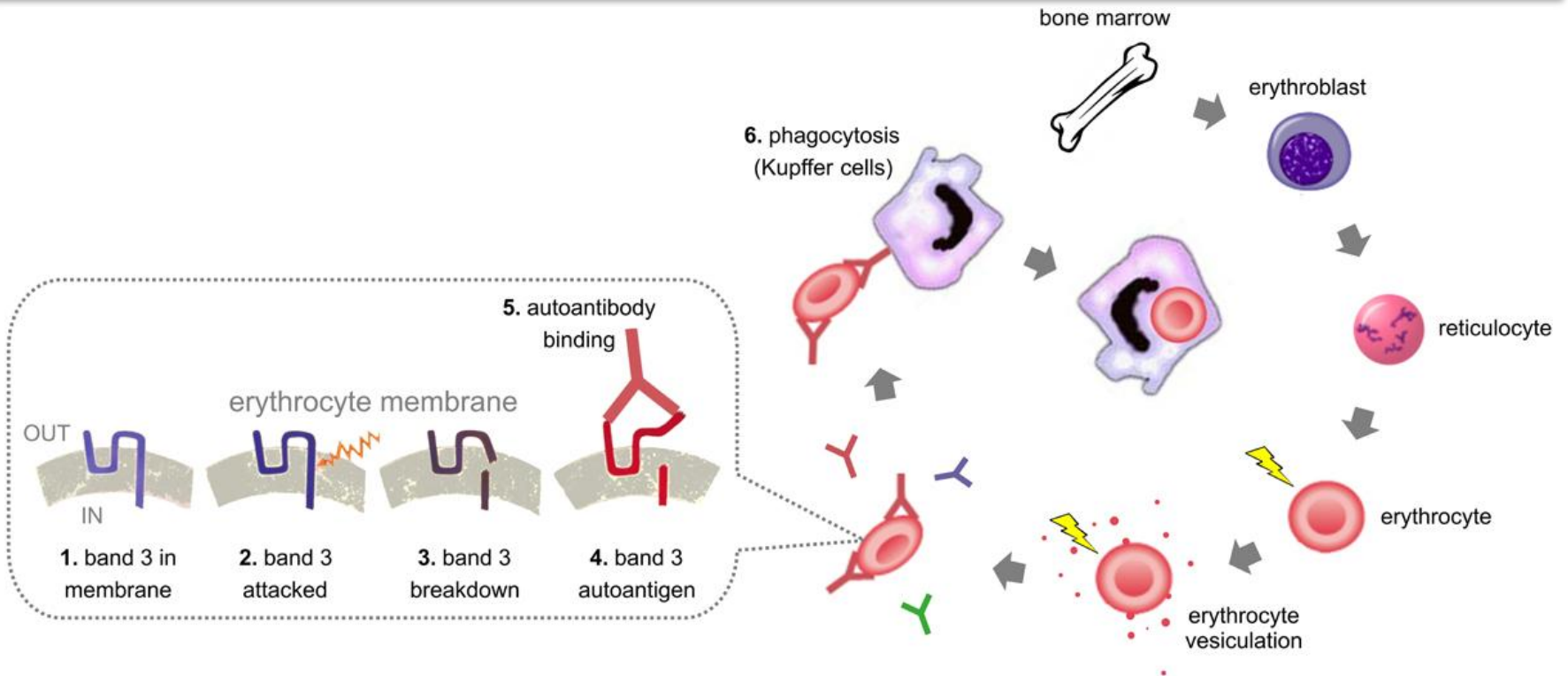
(Kriebardis et al., Blood Cells Mol. Dis., 2006, 36:279)

(Kriebardis et al., J Cell Mol Med., 2007, 11:148)

(Kriebardis et al., Transfusion, 2007, 47:1212)



Band 3-based aging pathway



(Bosman GJCGM. Front Physiol. 18/12/2013)

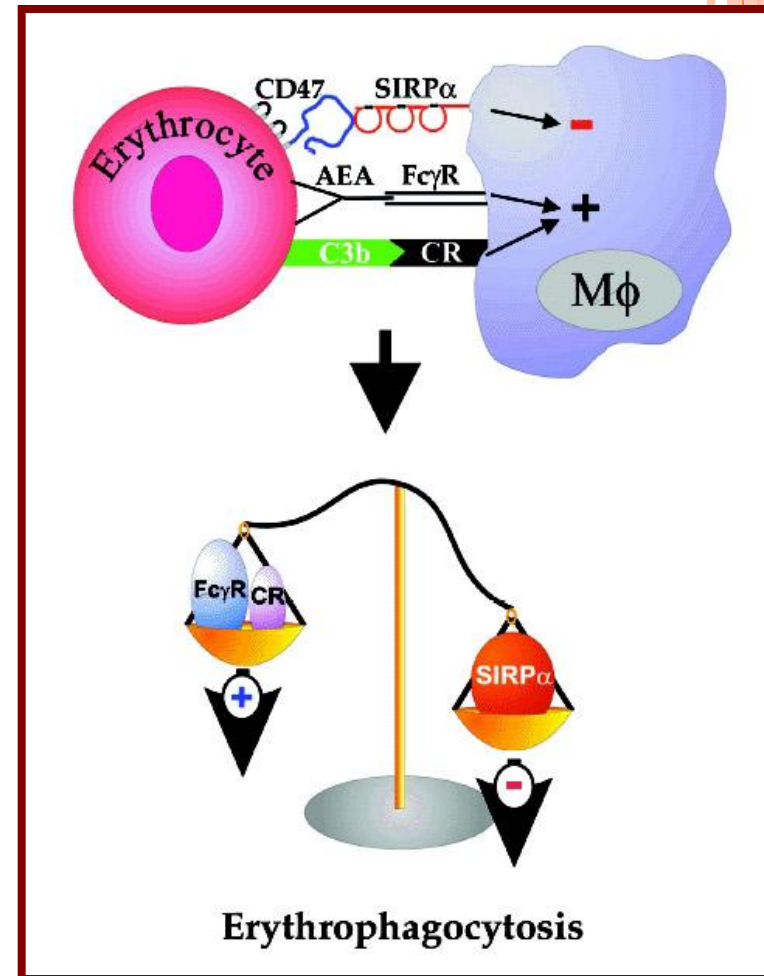
CD47-"don't eat me" signal

(-) CD47

marker of self--- "don't eat me signals"

Πρόσδεση σε μακροφάγα (**SIRPα**)

παρεμπόδιση ενεργοποίησης (**CD47-SIRPα signalling**)



CD47*-"eat me" signal

CD47 also acts as an "eat me" signal !!!

a subset of **old erythrocytes** present in whole blood bind to and are phagocytosed via **CD47-SIRP α** interactions

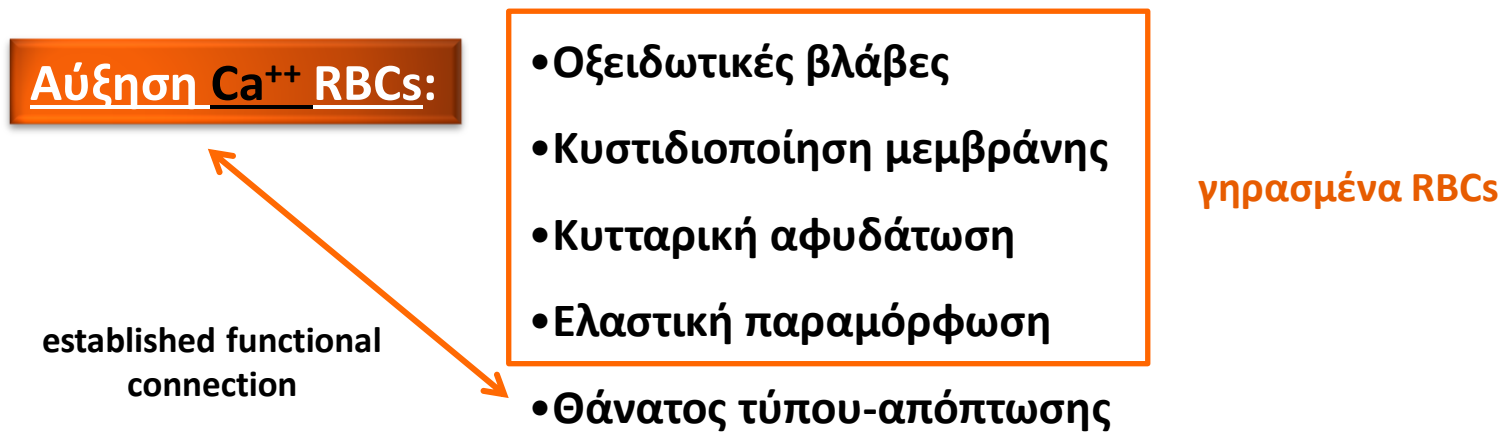
experimental ageing of erythrocytes induces a **conformational change in CD47** that switches it from an **inhibitory** signal into an **activating** one

more complex role for CD47-SIRP α interactions in erythrocyte phagocytosis, with CD47 acting as a **molecular switch** for controlling erythrocyte phagocytosis

(Burger et al., BLOOD 2012)

Διαταραχή ομοιόστασης Ca⁺⁺

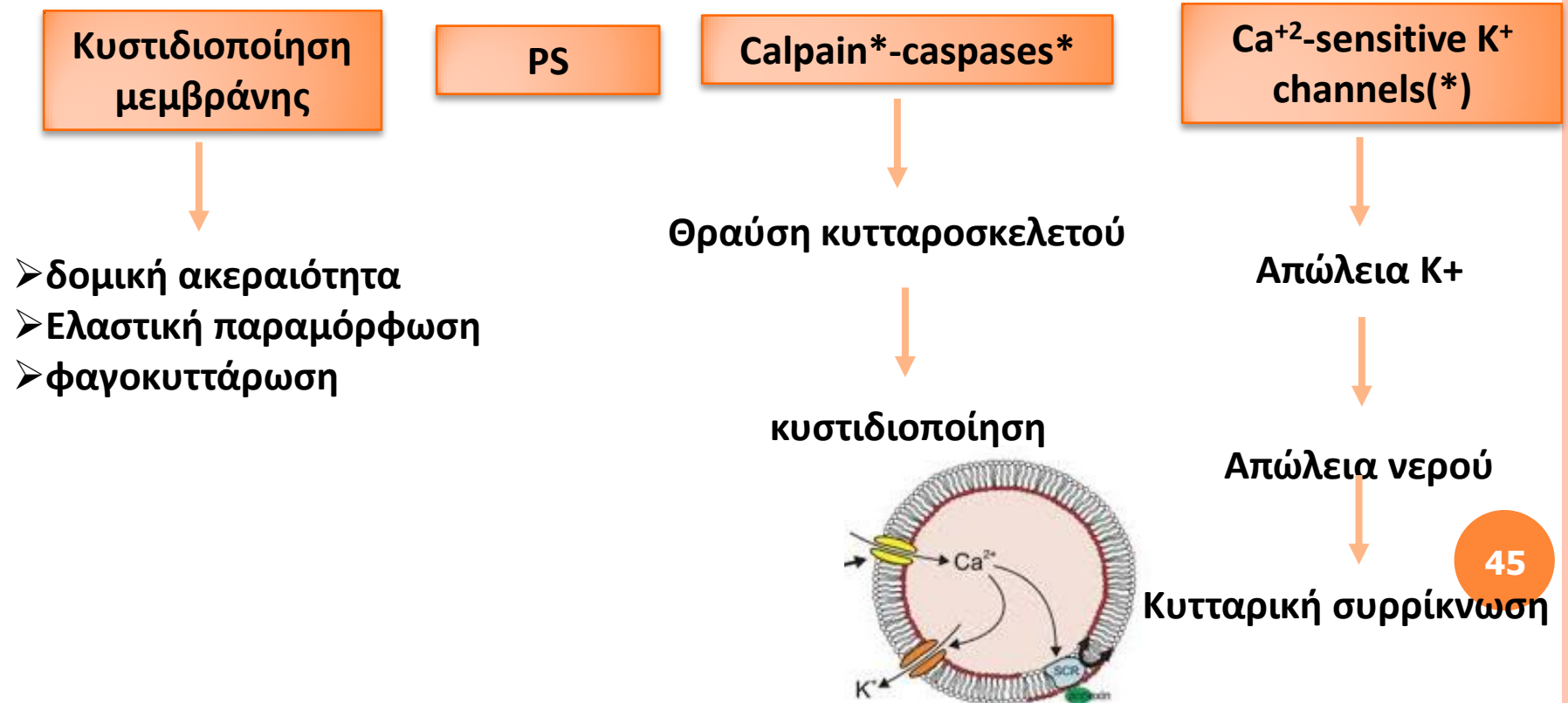
in vivo and in vitro aging of RBCs: related to intracellular increases of Ca⁺⁺



ERYPTOSIS

Florian Lang: κατηγορία μηχανισμών που ενεργοποιούνται στα RBCs ως απάντηση σε διαφορετικά είδη **κυτταρικού stress** (οξειδωτικό, οσμωτικό κλπ) και οι οποίοι μοιάζουν στην κλασική **απόπτωση**

Eryptosis is a form of stress-induced programmed cell death that is characterized by **cell membrane scrambling** and **cell shrinkage**



ERYPTOSIS

Επιταχυνόμενη eryptosis: sepsis,
αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
ελονοσία
Δρεπανοκυτταρική αναιμία
β-Μεσογειακή αναιμία
G6PD-deficiency
Σιδηροπενική αναιμία



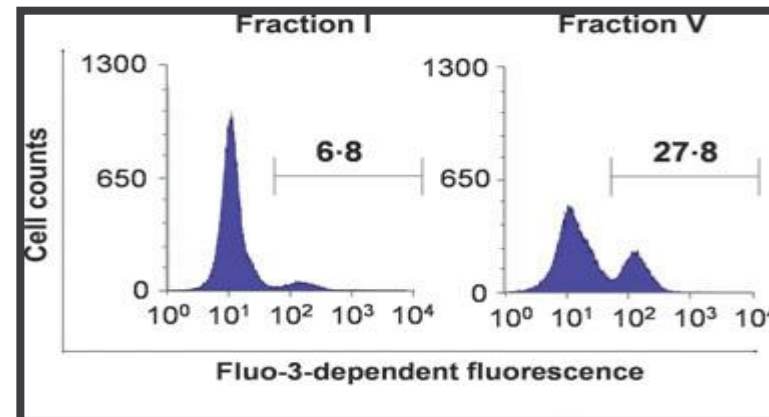
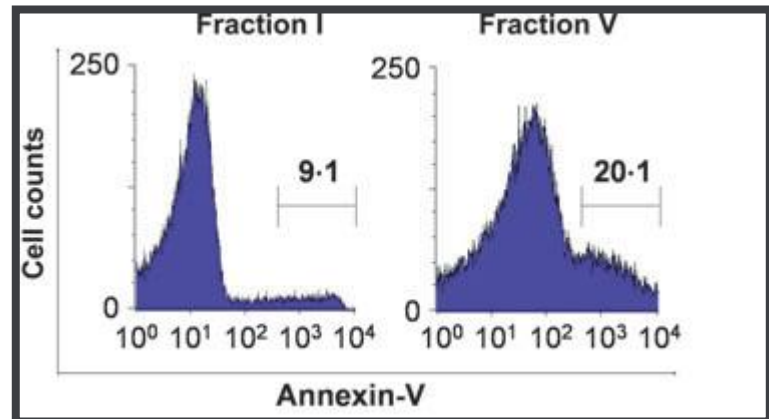
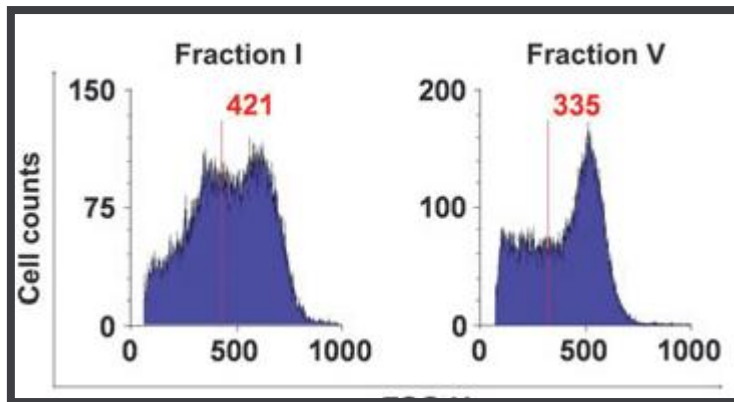
Επιλογή παθολογικών/στρεσσαρισμένων RBCs για αποφυγή αιμόλυσης:
εναλλακτικό μονοπάτι κυτταρικής εκκθάρισης??

Probably part of another **aging-related pathway** either as a **triggering factor** for aging
or as its **consequence**.

ERYPTOSIS

Eryptosis: may accelerate senescence

susceptibility to eryptosis increases with the age of the erythrocytes, and this effect is at least partially due to enhanced sensitivity to oxidative stress.



(Ghashghaenia et al., Brit J Haematol 2012)

Erythrocyte Ca²⁺ levels

PS

Δείκτης «non-self»

- activation of **caspases** and **calpains**
- osmotic shock
- ligation of CD47, GpC
- activation of cation channels
- increase in **Ca⁺⁺**
- stimulation of sphingomyelinase
- activation of scramblase

⇒ Εξωτερίκευση PS



- Αναγνώριση από μακροφάγα
- Συγκόλληση σε ενδοθήλια αγγείων

Phospholipid transport proteins: APLT, flippases, floppases, scramblases

PS

Erythrocytic procaspase 3 is *in vitro* activated under oxidative stress ⇒
Band 3 modifications
PS exposure
erythrophagocytosis

In vitro aged RBCs: lower aminophospholipid translocase activity and higher levels of externalized PS, in comparison with younger ones

in vivo physiological role in RBCs aging/clearance???

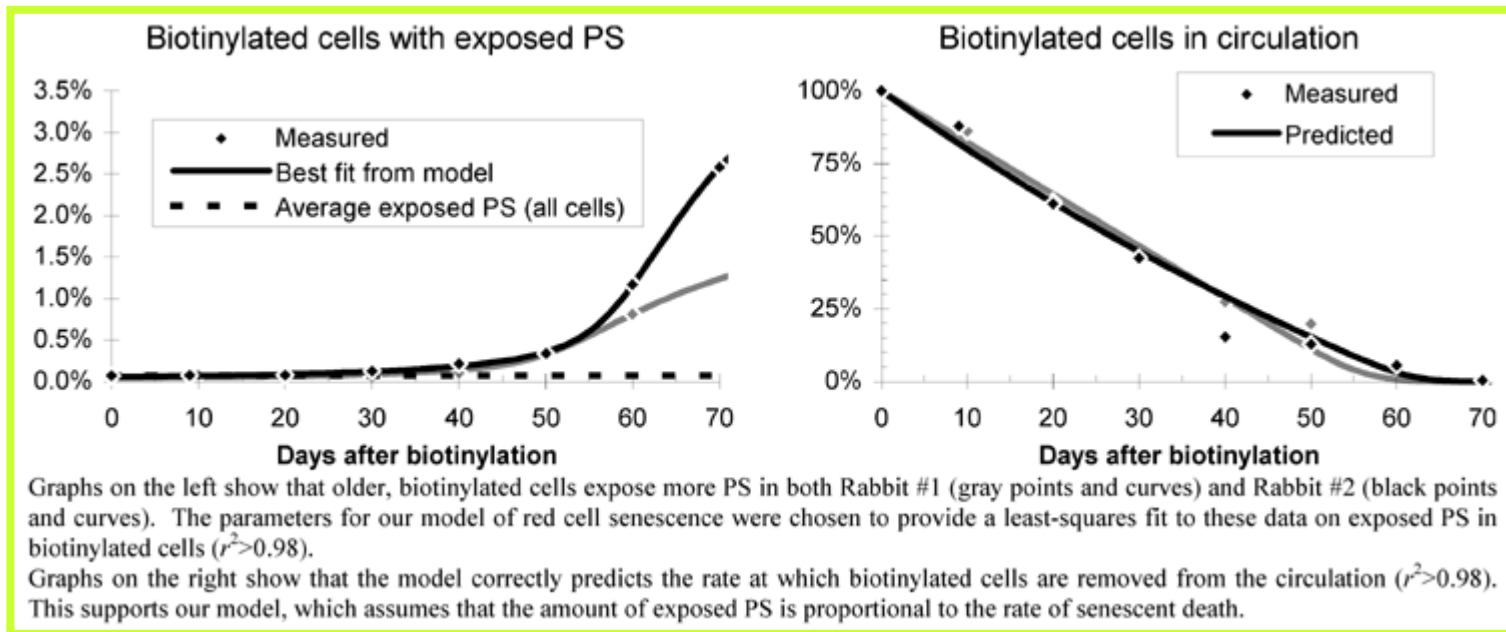
Most RBC-derived vesicles
RBCs in a number of haematologic diseases PS exposure

PS exposure in aged or damaged RBCs could induce their phagocytosis in order to prevent haemolysis

PS

In vivo βιοτινυλίωση RBCs κουνελιού

- ✓ Τα γηρασμένα RBCs εκθέτουν περισσότερο PS στην επιφάνειά τους
- ✓ Η έκθεση PS είναι αντίστοιχη του ρυθμού απομάκρυνσης των RBCs από την κυκλοφορία



(Boas et al., PNAS 95:3077, 1998)

However, *in vivo PS exposure in healthy individuals senescent RBCs* is still a matter of debate, mainly because of the skepticism against the techniques used to isolate old RBCs

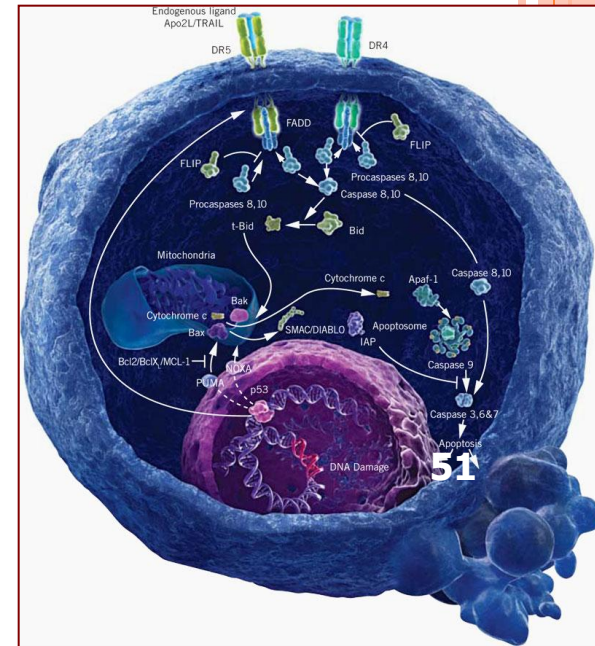
PS

Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εμπύρηνων κυττάρων (PCD, apoptosis)

- Κυτταρική συρρίκνωση
- Blebbing κυτταρικής μεμβράνης
- Εξωτερίκευση PS
- Συμπύκνωση πυρήνα
- Αποπόλωση μιτοχονδρίων
- Θραύση DNA



Γηρασμένα RBCs

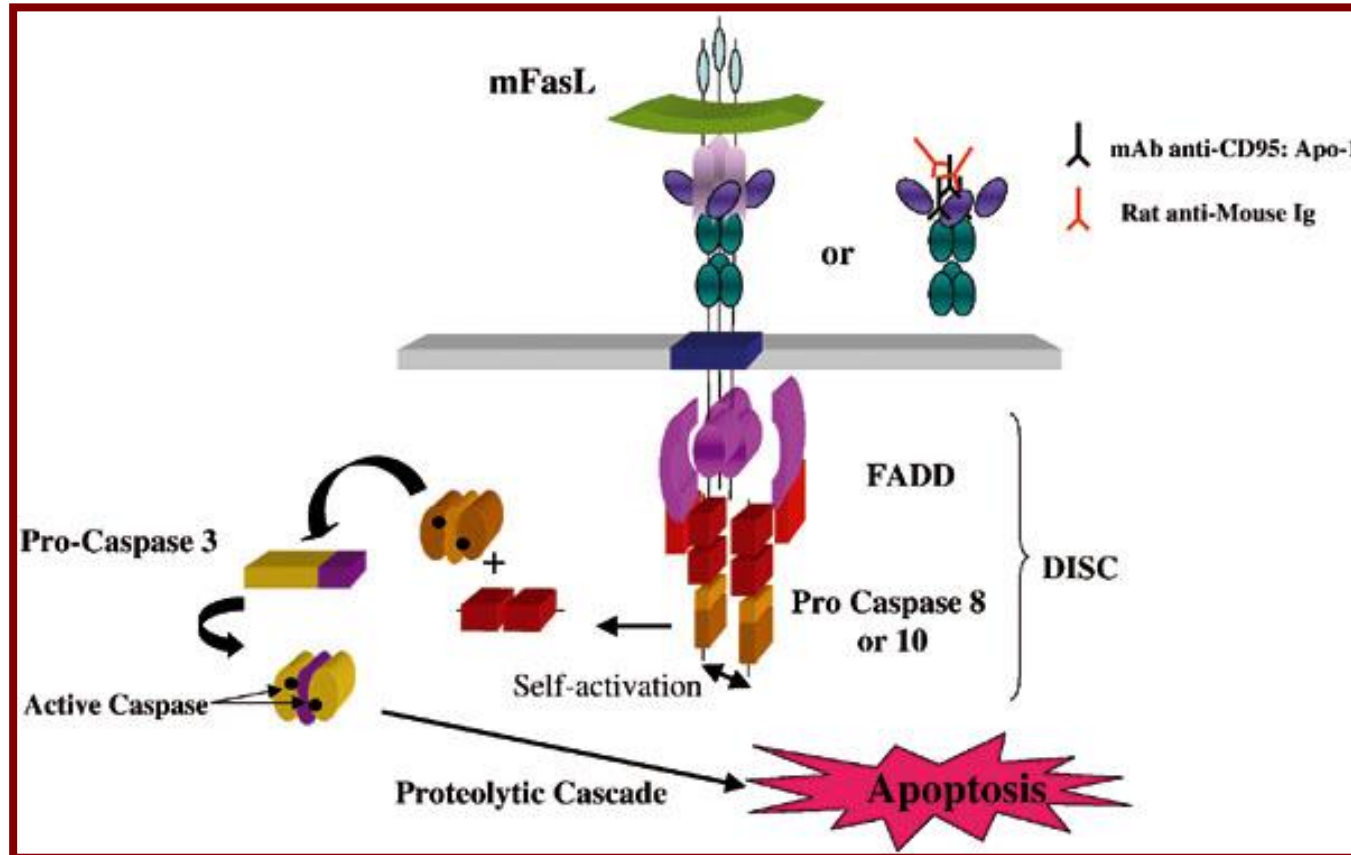


PS

1. Εξαρτώμενος από Ca^{++} θάνατος RBCs (eryptosis)

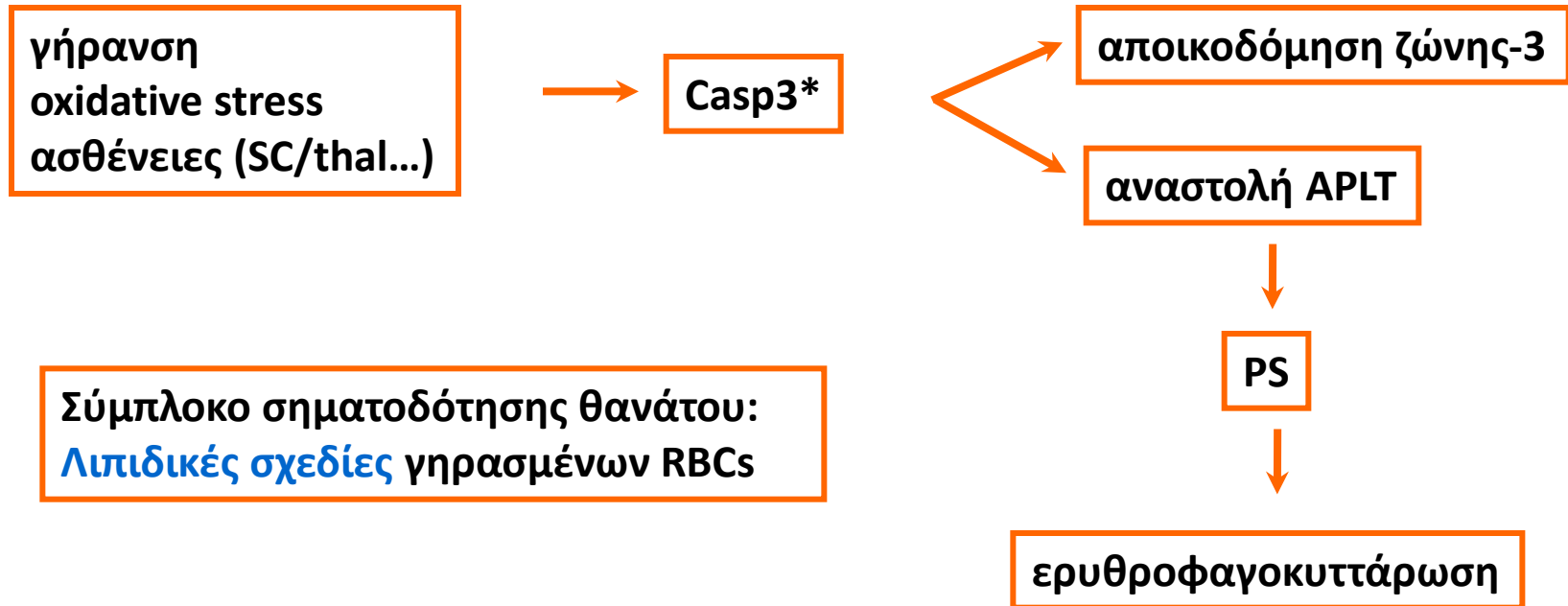
2. Μεμβρανικό μονοπάτι απόπτωσης

ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ



ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΣΠΑΣΩΝ

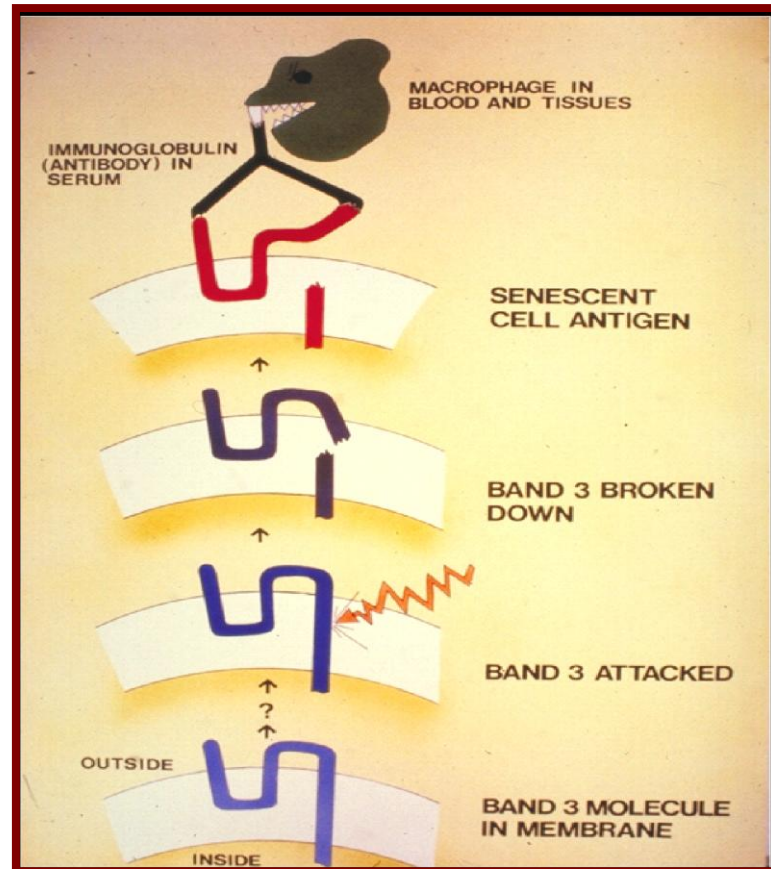
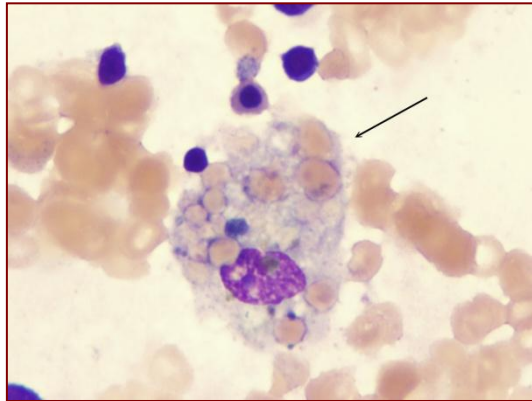
Ώριμα RBC's (PLT):Fas/FasL/FADD/pro-Casp8/pro-Casp3



Σύμπλοκο σηματοδότησης θανάτου:
Λιπιδικές σχεδίες γηρασμένων RBCs

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΣΠΑΣΩΝ

και σηματοδοτικό μονοπάτι Ζώνης-3



ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

(-) self-signals (CD47)

(-) CD47-SIRPa signaling

Hb/band 3
νεοαντιγόνα γήρανσης

IgG's/C3b

Fc/CR1

Ca⁺⁺ influx/calpain

scramblase*
channels

PS

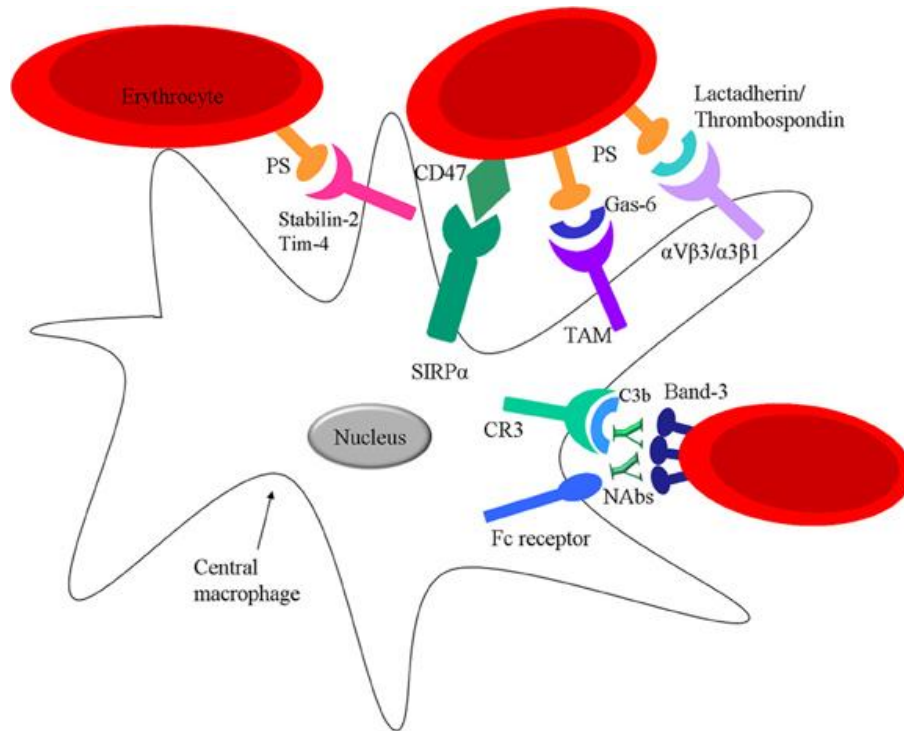
phagocytosis

Fas/FasL/casp*

APLT

Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος

ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ



*(de Back et al., Frontiers in Physiology
30/01/2014)*

RBC can interact with spleen macrophages via direct receptor ligand pairing or via bridging molecules.

Ageing RBC express PS on their surface which can directly bind to Stabilin-2 or Tim-4 on the macrophage or via opsonins such as Gas-6, lactadherin or thrombospondin-1.

RBC express CR1 on their surface which can bind C3b opsonized particles and further facilitate interaction with spleen macrophages via CR1 and CR3.

Nabs can bind Band-3 on the surface of RBC targeting the cell for clearance via Fc receptors on the spleen macrophages.

Moreover, RBC express CD47 which binds SIRP α on macrophages.

ΣΥΝΟΨΗ-1

- ✓ **Προοδευτικές** μεταβολικές και φυσιολογικές αλλαγές που σχετίζονται με τη διαδικασία της **γήρανσης** στα RBCs: **κυστιδιοποίηση** μεμβράνης, μείωση **μεγέθους** και **γλυκοζυλίωσης**, αύξηση κυτταρικής **πυκνότητας**, αλλαγές στη **μεμβράνη** και στον **κυτταροσκελετό**, επιδεκτικότητα σε **οξειδωτικό στρες** κλπ.
- ✓ Προς το τέλος της ζωής τους εκφράζουν **απότομες αλλαγές** που σχετίζονται με την **κυτταρική απόσυρση**: νεοαντιγόνα γήρανσης, απώλεια δεικτών “self”, PS exposure...
- ✓ Αναγνωρίζονται και απομακρύνονται από **μακροφάγα** του ΔΕΘ συστήματος, κυρίως από τα Kupffer κύτταρα του ήπατος και το σπλήνα (5 εκατομμύρια **RBCs per second** each day are endocytosed by RES macrophages). **ΕΡΥΘΡΟΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ –ΑΠΩΛΕΙΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ «ΕΑΥΤΟΥ»-ΑΠΟΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**
- ✓ Membrane and cytosolic proteins of RBCs are continuously stressed by **oxygen radical attacks**
- ✓ Lack of protein synthesis : a multitude of alterations **accumulate** towards the end of the RBC life span

ΣΥΝΟΨΗ-2

Οι ομοιότητες ανάμεσα στην ερυθροκυτταρική **γήρανση** και στην **απόπτωση** είναι παραπάνω από επιφανειακές

Η **ερυθρόπτωση (eryptosis)** πιθανά συνιστά ένα παράλληλο μονοπάτι **κυτταρικής απόσυρσης** σε καταστάσεις **στρες** που δεν περιλαμβάνει **IgGs** αλλά επιτείνεται στα γηρασμένα κύτταρα (ΟΧΙ ΤΕΚΜΗΡΙΩΜΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ in vivo) **-ΑΠΟΦΥΓΗ ΑΙΜΟΛΥΣΗΣ**

Η **σχετική συμβολή** καθενός από τους προτεινόμενους (και σε κάποιες περιπτώσεις υποθετικούς) μηχανισμούς στη **γήρανση** και **απομάκρυνση** των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία είναι άγνωστη.

Πιθανά **ΟΛΟΙ** να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο σε αυτή τη σύνθετη και αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία

Τα διαθέσιμα **σύγχρονα μοντέλα οργάνωσης** της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης προτείνουν τη συμμετοχή και **άλλων μορίων ή/και μηχανισμών** στη διαδικασία της **γήρανσης**

Οι μελέτες της ερυθροκυτταρικής γήρανσης αναδεικνύουν με τον καλύτερο τρόπο τη δυναμική φύση των RBCs

Η **έρευνα** στο πεδίο χρειάζεται περισσότερο **προηγμένες τεχνικές προσεγγίσεις** που θα βοηθήσουν στην **κατανόηση** των **μηχανισμών** που διέπουν τη **ζωή** και το **θάνατο** των ερυθροκυττάρων **in vivo, in vitro και ex vivo.**