

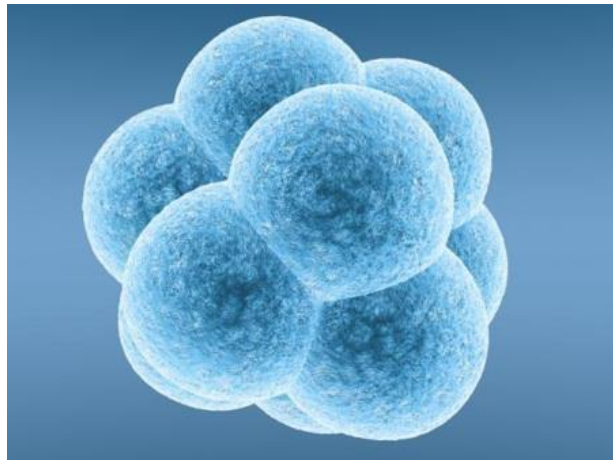


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

«Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών στην διατήρηση της πολυδυναμίας και στη διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων»



Όνοματεπώνυμο: Ασημάκη Κωνσταντίνα

Επιβλέπων καθηγητής: Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Ιωάννινα 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

«Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών στην διατήρηση της πολυδυναμίας και της
διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων»

Ονοματεπώνυμο: Ασημάκη Κωνσταντίνα

Επιβλέπων καθηγητής: Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Ιωάννινα 2018

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Όνοματεπώνυμο : Ασημάκη Κωνσταντίνα

Τίτλος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: «Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών στην διατήρηση της πολυδυναμίας και της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων»

Ημερομηνία παρουσίασης : 11/09//2018

Επιβλέπων καθηγητής : Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Εξεταστική Επιτροπή :

1. Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας
2. Αγγελίδης Χαράλαμπος – Καθηγητής Γενικής Βιολογίας
3. Γεωργάτος Σπυρίδων – Καθηγητής Βιολογίας

Η διαδικασία επικυρώνεται από:

-Την/ον διευθυντή του ΠΜΣ ΒΒΕ

-Την/ον Πρόεδρο του Τμήματος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας Κούκλη Παναγιώτη, που επέβλεψε αυτή τη διπλωματική εργασία, για την άριστη συνεργασία που είχαμε, την πολύτιμη καθοδήγησή του και την υπομονή του. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή υποστήριξή τους.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	- 5 -
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	- 10 -
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	- 13 -
4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΤΩΝ ESCs ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	- 17 -
4.1 Μονοπάτι TGFβ	- 20 -
4.2 Μονοπάτι PI3K/AKT	- 27 -
4.3 Μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK.....	- 33 -
4.4 Μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης.....	- 40 -
5. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΤΩΝ ESCs ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ	- 47 -
5.1 Μονοπάτι TGFβ	- 47 -
5.2 Μονοπάτι JAK/STAT3	- 52 -
5.3 Μονοπάτι PI(3)K/AKT	- 58 -
5.4 Μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης.....	- 60 -
6. ΔΙΚΤΥΟ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ OCT4, SOX2, NANOG (OSN)	- 66 -
6.1 NANOG	- 66 -
6.2 OCT4.....	- 69 -
6.2 SOX2.....	- 73 -
6.4 Ανατροφοδοτικός έλεγχος της πολυδυναμίας μέσω των επιγενετικών και μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων.....	- 75 -
7. ΕΠΑΓΩΜΕΝΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (iPSCs).....	- 79 -
8. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΗΜΕΡΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ	- 82 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 84 -
ABSTRACT.....	- 85 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	- 86 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 87 -

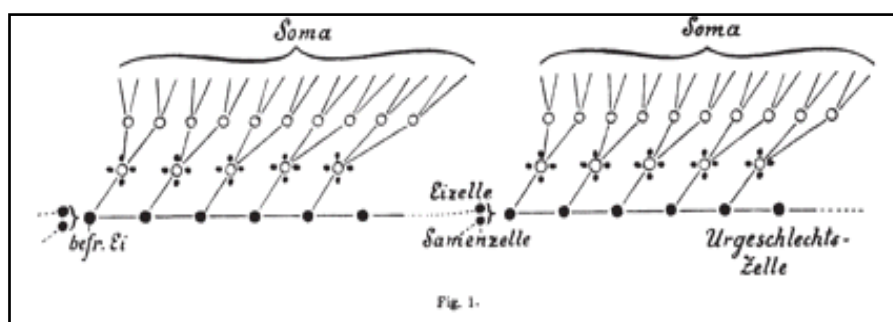
1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ικανότητα μερικών οργανισμών να αναπλάθουν ορισμένους ιστούς, ή και να αναγεννούν ολόκληρα τμήματα του σώματός τους, είναι γνωστή στον άνθρωπο εδώ και αιώνες, και έχει παρατηρηθεί σε ζώα όπως η μεξικάνικη σαλαμάνδρα και ο αστερίας. Μέχρι όμως τα μέσα του 20^{ου} αιώνα δεν ήταν αποδεδειγμένη η ύπαρξη των βλαστικών κυττάρων και του ρόλου τους σε διαδικασίες όπως η αναγέννηση των ιστών και η εμβρυογένεση. Μελέτες σε διάφορα ζωικά πρότυπα από τον 19^ο αιώνα μέχρι και σήμερα έχουν αποκαλύψει μερικά από τα κομμάτια αυτού του σύνθετου «παζλ». Στην επιστημονική κοινότητα σήμερα, ως **βλαστικά** χαρακτηρίζονται εκείνα τα κύτταρα τα οποία διέπονται από δυο βασικές ιδιότητες: την ικανότητα αυτό-ανανέωσης και την ικανότητα διαφοροποίησης προς κάποια αναπτυξιακή κατεύθυνση. Τα βλαστικά κύτταρα λοιπόν, είναι ικανά να διαιρεθούν με ταυτόχρονη διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινοτύπου στα θυγατρικά κύτταρα (αυτό-ανανέωση), συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της δεξαμενής βλαστικών κυττάρων. Επίσης, μέσω ελεγχόμενων διαδικασιών, μπορεί να οδηγηθούν σε διαφοροποίηση προς έναν ή περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ανάλογα με το αναπτυξιακό τους δυναμικό. Ιστορικά ο όρος εμφανίζεται αρκετά νωρίς με σημασία διαφορετική από τη σημερινή, αποτυπώνοντας όμως τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων.

Η πρώτη αναφορά του όρου αυτού έγινε από το Γερμανό βιολόγο Ernst Haeckel, ο οποίος ονομάτισε ως βλαστικό κύτταρο (Stammzelle) τόσο τον μονοκύτταρο αρχέγονο πρόγονο από τον οποίο εξελίχθηκαν όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί (1868), όσο και το γονιμοποιημένο ωάριο (1877) από το οποίο προκύπτουν όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού. Η επόμενη καταγεγραμμένη αναφορά του όρου εντοπίζεται το 1892, από τον Valentin Haecker, για την περιγραφή του πρόδρομου κυττάρου από το οποίο προέρχονται τα αρχέγονα γαμετικά και σωματικά κύτταρα, όπως αυτά περιγράφηκαν από τον August Weissmann στην θεωρία του περί συνεχίσεως του γαμετοπλάσματος¹. Ο όρος αυτός υιοθετήθηκε και από άλλους σύγχρονους του με παρόμοια σημασία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο Theodor Boveri ο οποίος θεώρησε ως βλαστικό κάθε κύτταρο που ανήκει στη γαμετική σειρά και

¹ Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία το γαμετικό πλάσμα, μια ουσία που μεταφέρει τις κληρονομήσιμες πληροφορίες, διαχωρίζεται πρώιμα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μόνο στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, κάτι που τα διαφοροποιεί από τα αρχέγονα σωματικά κύτταρα. (Winther, 2001)

βρίσκεται σε αναπτυξιακό στάδιο μεταξύ του ζυγωτού και του πλήρως διαφοροποιημένου γαμετικού κυττάρου (Vander, Sherman, Luciano, & Tsakopoulos, 2001)(Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). Μάλιστα δημιούργησε κάποιες από τις πρώιμες απεικονίσεις κυττάρων που –παρότι μη ακριβείς- αποτυπώνουν τις ιδιότητες της αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης στα πλαίσια της πρώιμης εμβρυογένεσης του εντερικού παράσιτου των αλόγων *Ascaris megalocephala* (Εικ. 1.1.) (Maehle, 2011).



Εικόνα 1.1. Αναπαράσταση της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης του εντερικού παράσιτου *Ascaris megalocephala* από τον **Theodor Boveri**. Οι μαύροι συμπαγείς κύκλοι κατά μήκος της οριζόντιας γραμμής αντιπροσωπεύουν τα «βλαστοκύτταρα» (Stammzellen). Ακολουθούν στην ίδια γραμμή οι διαιρέσεις αυτό-ανανέωσης που όμως καταλήγουν σε σχηματισμό των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων (Urgeschlechtszelle). Ταυτόχρονα απεικονίζεται με τους άδειους κύκλους η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων προς σωματικά κύτταρα με ενδιάμεσο μεταβατικό στάδιο. Παρότι η θεωρία αυτή είναι λανθασμένη απεικονίζει τις δυο βασικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων. Προσαρμοσμένη από (Maehle, 2011).

Μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, ο όρος βλαστικό κύτταρο εδραιώθηκε στα πεδία της Εμβρυολογίας και Κυτταρολογίας, με μικρές αποκλίσεις, εμπεριέχοντας όμως τις έννοιες της αυτό-ανανέωσης και της πολυδυναμίας. Ταυτόχρονα εμφανίστηκε και στο πεδίο της Αιματολογίας όταν χρησιμοποιήθηκε από τον Parrenheim και μετέπειτα από τον Alexander Maximow για να περιγράψει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από τα οποία πρότειναν ότι προκύπτουν όλα τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). Η θεωρία αυτή αποδείχθηκε μεταγενέστερα, τη δεκαετία του '60, από διάφορους ερευνητές με γνωστότερη δημοσίευση εκείνη των McCulloch και Till. Ήταν οι πρώτοι που διαπίστωσαν την ύπαρξη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια πειραμάτων σε ποντικούς

που είχαν εκτεθεί σε υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας. Παρατήρησαν στον σπλήνα των ποντικών αυτών, ύστερα από μεταμόσχευση μυελού των οστών, οζίδια κλωνικών κυτταρικών αποικιών στα οποία συνεντοπίζονταν διαφορετικοί τύποι κυττάρων του αίματος (McCulloch & Till, 1963).

Έκτοτε ακολούθησε πλήθος ερευνών που είτε επιβεβαίωσαν είτε κατέρριψαν, εν μέρει ή πλήρως, τις έως τότε υπάρχουσες θεωρίες και ταυτόχρονα δημιούργησαν άλλες που πλέον έχουν αποδειχθεί πειραματικά. Αυτό έγινε εφικτό, από την μέση του 20^{ου} αιώνα και μετά, λόγω των τεχνολογικών εξελίξεων που συνέβησαν καθώς και των νέων τεχνικών που εφευρέθηκαν. Σταδιακά κατέστη δυνατή η παρατήρηση αλλά και ο χειρισμός των βλαστικών κυττάρων. Ένα πολύ σημαντικό επίτευγμα ήταν η ταυτοποίηση και η καλλιέργεια εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που απομονώθηκαν από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης ποντικών. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τους Kauffman και Evans το 1981 (Evans & Kaufman, 1981). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1989, ο Sir Martin John Evans μαζί με τους Mario Capecchi και Oliver Smithies ανέπτυξαν την τεχνολογία της δημιουργίας knock-out ποντικών μέσω γονιδιακής στόχευσης με ομόλογο ανασυνδυασμό, σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, και τιμήθηκαν για αυτό το 2007 με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής (Capecchi, 1989)(Evans et al, 1987). Έτσι λοιπόν έγινε δυνατή η μελέτη της λειτουργίας χιλιάδων γονιδίων και η δημιουργία ζωικών μοντέλων ασθενειών.

Σύντομα όμως διαπιστώθηκε ότι τα βλαστικά κύτταρα, πέρα από τις δυνατότητες που παρέχουν στην μελέτη, διάγνωση και θεραπεία ασθενειών, είναι τα ίδια εμπλεκόμενα σε παθογενετικούς μηχανισμούς. Ενώ είχαν ήδη γίνει μελέτες σε όγκους, και συγκεκριμένα σε τερατοκαρκινώματα², στους οποίους είχε διαπιστωθεί η συνεισφορά βλαστικών κυττάρων, η πρώτη ένδειξη συσχέτισης τους με την καρκινογένεση επήλθε το 1997 όπου οι Bonnet και Dick απέδειξαν την ύπαρξη καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε ασθενείς με λευχαιμία (Bonnet & Dick, 1997). Έκτοτε, έχουν βρεθεί σπάνιοι πληθυσμοί βλαστικών καρκινικών κυττάρων σε διάφορες μορφές καρκίνου και έχει υποτεθεί ότι προέρχονται από συσσώρευση μεταλλάξεων σε φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα του ιστού. Μάλιστα έχει προταθεί ότι τα κύτταρα αυτά συντηρούν τον όγκο και διαμεσολαβούν τη μετάσταση σε άλλους ιστούς (stem cell theory of cancer) (Fabián, Vereb, & Szöllosi, 2013).

² Τα τερατοκαρκινώματα είναι όγκοι που αποτελούνται από πολυδύναμα κύτταρα εμβρυονικού καρκινώματος (embryonal carcinoma) και από διαφοροποιημένους ιστούς που εντοπίζονται και στα τερατώματα (Andrews, 2002).

Η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια απομόνωσης και διατήρησης σε καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων έγινε το 1998 από μια ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον James Thomson (Thomson et al., 2012). Ήταν η πρώτη φορά που ανθρώπινα βλαστοκύτταρα συντηρούνταν πολλαπλασιαζόμενα *in vitro* για μεγάλες χρονικές περιόδους και διαιρούνταν και προς τις τρεις βλαστικές στιβάδες. Έτσι τέθηκε η βάση ώστε να δημιουργηθούν και να μελετηθούν νέες σειρές βλαστικών κυττάρων, να διερευνηθεί η πιθανότητα δημιουργίας ανθρώπινων μοσχευμάτων και γενικότερα να διαμορφωθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η επόμενη μεγάλη ανακάλυψη ήρθε το 2006 από την ομάδα του Shinya Yamanaka η οποία κατάφερε την μετατροπή ινοβλαστών ποντικού σε κύτταρα που προσομοιάζουν στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, τα λεγόμενα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα (iPSC), παρεμβαίνοντας στην έκφραση τεσσάρων μόνο γονιδίων (*i.e.* Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Για αυτό το επίτευγμα τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ μόλις έξι χρόνια αργότερα, το οποίο μοιράστηκε με τον Sir John Gurdon ο οποίος είχε δείξει με πειράματά του σε βάτραχους την αναστρεψιμότητα της διαφοροποιημένης κατάστασης των κυττάρων (βλ. Gurdon, 1968). Το 2007 δημιουργήθηκαν και ανθρώπινα iPSC κύτταρα και η χρήση τους για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς ήταν άμεση. Μόλις ένα χρόνο αργότερα, στα πλαίσια του προγράμματος Stem Cell του Νοσοκομείου Παιδών της Βοστώνης, δημιουργήθηκαν δέκα κυτταρικές σειρές iPSC, ως μοντέλα για τη μελέτη ασθενειών του ανθρώπου όπως το Σύνδρομο Down και η μυϊκή δυστροφία (Vogel, 2008).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ιδιαίτερα οι κλάδοι της Μηχανικής των Ιστών και της Αναγεννητικής Ιατρικής και γίνονται πολλές προσπάθειες για την δημιουργία οργάνων και τη θεραπεία ασθενειών μέσω της ελεγχόμενης διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων. Ένα πρόσφατο επίτευγμα σε αυτόν τον τομέα είναι για παράδειγμα η δημιουργία λειτουργικών νεφρώνων από ESC (Bantounas et al., 2018). Ακόμη, πριν λίγα χρόνια, επετεύχθη η δημιουργία μοσχευμάτων δέρματος από γενετικώς επιδιορθωμένα βλαστικά κύτταρα για την αντικατάσταση του δέρματος ασθενούς που έπασχε από τη νόσο Epidermolysis Bullosa³ (Hirsch et al., 2017). Το πεδίο αυτό βρίσκεται υπό διεξοδική μελέτη με πλήθος αποτελεσμάτων να δημοσιεύονται συχνά.

³ Η Epidermolysis Bullosa (Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση) είναι μια ομάδα συγγενών δερματικών παθήσεων, που οφείλεται σε κληρονομήσιμες γενετικές μεταλλάξεις και ως κύριο χαρακτηριστικό έχουν την εμφάνιση πομφολύγων ως απόκριση σε ήπιο μηχανικό τραυματισμό ή τριβή (Boeira et al., 2013).

Όσον αφορά τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και ανακεφαλαιώνοντας, τα δυο μεγαλύτερα επιτεύγματα που ώθησαν την διερεύνηση της φυσιολογίας τους ήταν αφενός η εδραίωσή τους σε κυτταροκαλλιέργειες και αφετέρου η δυνατότητα επεξεργασίας του γονοτύπου και της κατάστασής τους ως προς το αναπτυξιακό δυναμικό. Η ερευνητική τους μελέτη επικεντρώνεται κυρίως στην δυνατότητα διατήρησης της ικανότητας αυτό-ανανέωσης, στην ελεγχόμενη διαφοροποίηση προς έναν κυτταρικό τύπο καθώς και στην από-διαφοροποίηση κυττάρων για την απόκτηση χαρακτηριστικών που προσομοιάζουν σε αυτά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Μια απαραίτητη προϋπόθεση όμως για την κατανόηση αυτών των μηχανισμών, και συνεπώς για την παρέμβαση σε αυτούς, είναι η αποσαφήνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες διαδικασίες.

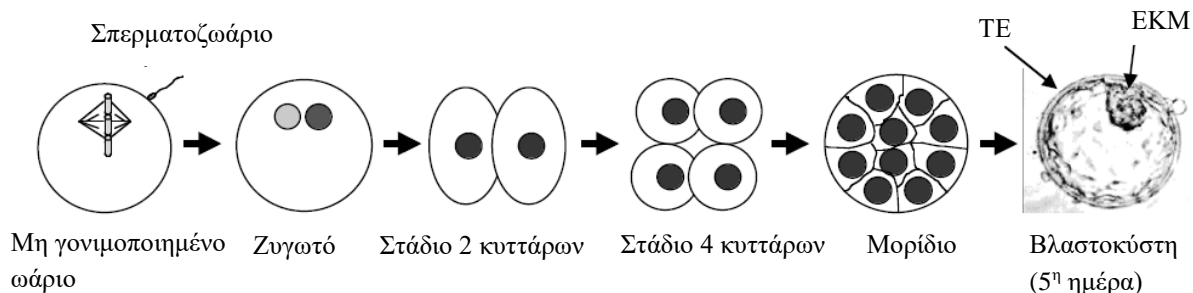
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στους οργανισμούς ενυπάρχουν διάφοροι τύποι βλαστικών κυττάρων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια καθώς και στην ενήλικη ζωή. Η βασική διαφορά όμως αυτών έγκειται στο αναπτυξιακό τους δυναμικό, στην ικανότητα τους δηλαδή να διαφοροποιούνται προς ένα ευρύ ή περιορισμένο σύνολο κυτταρικών τύπων. Το αναπτυξιακό δυναμικό ενός κυττάρου μπορεί να καθοριστεί πειραματικά έπειτα από λειτουργικές δοκιμασίες και διερεύνηση της μεταγραφικής, επιγενετικής και μεταβολικής κατάστασης στην οποία βρίσκεται. Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες που απαριθμούνται παρακάτω βάσει μειούμενου αναπτυξιακού δυναμικού:

1. **Ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα:** Τα ολοδύναμα κύτταρα (totipotent) έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και προς τις 3 κύριες βλαστικές στιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) καθώς και προς τους εξω-εμβρυικούς ιστούς όπως είναι ο πλακούντας. Το γονιμοποιημένο ωάριο καθώς και τα βλαστομερή μέχρι το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων αποτελούν ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα.
2. **Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα:** Ως πολυδύναμα (pluripotent) χαρακτηρίζονται εκείνα κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται προς όλες τις βλαστικές στιβάδες του πρώιμου εμβρύου και συνεπώς από αυτά προκύπτουν όλα τα εξειδικευμένα κύτταρα ενός οργανισμού. Σε αντίθεση με τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα δεν συνεισφέρουν σε εξω-εμβρυικούς ιστούς. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα καθώς και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs).
3. **Πλειοδύναμα βλαστικά κύτταρα:** Στην κατηγορία των πλειοδύναμων βλαστοκυττάρων (multipotent) ανήκουν κύτταρα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε περισσότερα του ενός είδη κυττάρων αλλά έχουν μικρότερο αναπτυξιακό δυναμικό από τα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται στους ανεπτυγμένους ιστούς (adult stem cells) (Bacakova et al., 2018).

Στην παρούσα εργασία εξετάζονται τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESC-embryonic stem cells) τα οποία είναι πολυδύναμα ως προς το αναπτυξιακό τους δυναμικό. Τα ESCs

απομονώνονται από την έσω κυτταρική μάζα, μια ομάδα 30-34 κυττάρων που περιβάλλονται μαζί με την βλαστική κοιλότητα από το τροφοεξώδερμα και οι δομές αυτές συνολικά αποτελούν την βλαστοκύστη. Η έσω κυτταρική μάζα αναπτύσσεται περίπου την 5^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση στον άνθρωπο (βλ. Εικ. 2.1) και ανάμεσα στην 3^η και 4^η ημέρα στον ποντικό.



Εικόνα 2.1. Η ανάπτυξη στο προεμφυτευτικό στάδιο στον άνθρωπο. Το ζυγωτό δημιουργείται κατά τη σύντηξη του ωαρίου με το σπερματοζωάριο. Η διαίρεση του ζυγωτού καλείται αυλάκωση, είναι μια σχετικά αργή διαδικασία που συμβαίνει με ημερήσιο ρυθμό και χωρίς να μεσολαβεί αύξηση των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται κύτταρα-απόγονοι που καλούνται βλαστομερίδια και συνολικά έχουν ίδιο όγκο με το ζυγωτό. Την 4^η περίπου μέρα τα βλαστομερίδια συντήκονται (μορίδιο) και την 5^η ημέρα σχηματίζεται η βλαστοκύστη. Η βλαστοκύστη αποτελείται από μια μάζα κυττάρων εσωτερικά που καλείται έσω κυτταρική μάζα (EKM), το τροφοεξώδερμα εξωτερικά (TE) καθώς και το βλαστοκόιλο, μια κοιλότητα που περιέχει υγρό. Τα κύτταρα της EKM μετά την εμφύτευση (6^η μέρα) διαφοροποιούνται προς τις 3 βλαστικές στιβάδες και δίνουν τους ιστούς του εμβρύου, ενώ από το TE θα προκύψει ο πλακούντας. Τα ESCs προκύπτουν από την απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων της EKM. Προσαρμοσμένη εικόνα από (Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research, 2005)

Τα περισσότερο μελετημένα ESCs είναι του ποντικού (**mESC**) καθώς η μελέτη ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (**hESC**) ενέχει τεχνικές, νομικές και ηθικές δυσκολίες ενώ παράλληλα ο ποντικός αποτελεί ένα ζωικό μοντέλο που προσομοιάζει στην ανθρώπινη φυσιολογία. Τα mESC και τα hESC παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους και μια εξ αυτών είναι ότι τα μεν βρίσκονται σε μια βασική κατάσταση πολυδυναμίας (naïve pluripotency state) και τα δε σε μια ενεργοποιημένη (primed pluripotency state). Στην πραγματικότητα υπάρχει ένα φάσμα καταστάσεων ανάμεσα στην βασική και την ενεργοποιημένη κατάσταση πολυδυναμίας στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα (formative pluripotency). Την τελευταία δεκαετία περίπου γίνονται προσπάθειες για να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας ώστε τα hESC -χωρίς να χρησιμοποιείται διαγονιδιακή τεχνολογία για την συνεχή παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας- να

«επιστρέψουν» στη βασική κατάσταση πολυδυναμίας. Παρότι οι προσπάθειες αυτές είναι επιτυχημένες, παρατηρούνται προβλήματα στην περαιτέρω χρήση αυτών των κυττάρων όπως είναι η αδυναμία διαφοροποίησής τους προς λειτουργικούς τύπους κυττάρων ή η πρόκληση καρυοτυπικών ανωμαλιών. Ταυτόχρονα δεν μπορεί να εξακριβωθεί εάν η κατάσταση πολυδυναμίας σε αυτά τα κύτταρα αντικατοπτρίζει την πραγματική in vivo κατάσταση (Mascetti & Pedersen, 2016)(Warrier et al., 2017)(Dodsworth, Flynn, & Cowley, 2015).

Κάποια βασικά χαρακτηριστικά στα οποία διαφέρουν τα κύτταρα των δυο καταστάσεων είναι η μορφολογία των αποικιών που σχηματίζουν, η απαίτηση σε αναπτυξιακούς παράγοντες καθώς και η κατάσταση απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X στα κύτταρα με καρυότυπο XX. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές από τις κύριες διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των hESC και των mESC:

Πίνακας 2.1. Χαρακτηριστικά κυττάρων που βρίσκονται στην βασική (mESC) και ενεργοποιημένη (hESC) κατάσταση πολυδυναμίας (Kumari, 2016).

Ιδιότητα	Βασική κατάσταση (mESC)	Ενεργοποιημένη κατάσταση (hESC)
Μορφολογία αποικιών	Συμπαγής σφαιρική	Επίπεδη, 2D
Κλωνογονικότητα	Υψηλή	Χαμηλή
Απαίτηση σε αυξητικούς παράγοντες	LIF	FGF2, ACTIVIN
Κυτταρική αναπνοή	Οξειδωτική φωσφορυλίωση, Γλυκόλυση	Γλυκόλυση
Χρωμόσωμα X	XaXa ¹	XaXi ²
Μεθυλίωση H3K27me³ DNA	Χαμηλή	Υψηλή

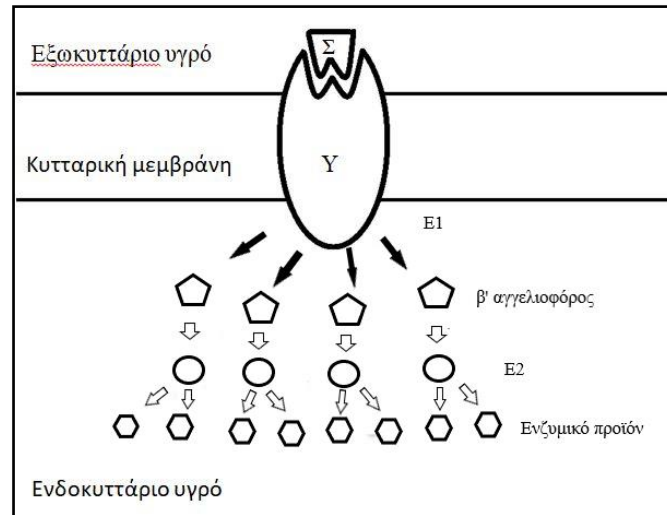
¹ Xa: Το X χρωμόσωμα είναι ενεργοποιημένο
² Xi: Το X χρωμόσωμα είναι απενεργοποιημένο
³ H3K27me3: Τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 στην ιστόνη H3 η οποία υποδηλώνει ανενεργή κατάσταση της χρωματίνης

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Κάθε κύτταρο προσλαμβάνει μηνύματα από το περιβάλλον του τα οποία επεξεργάζεται και αποκρίνεται σε αυτά μέσω μεταβολών των χημικών διεργασιών και λειτουργιών του. Τα μηνύματα αναγνωρίζονται συνήθως από το κύτταρο μέσω ειδικών υποδοχέων που εντοπίζονται στην μεμβράνη του. Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις υποδοχέων: οι υποδοχείς με λειτουργία ιοντικού διαύλου, οι συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G και οι καταλυτικοί που συνδέονται με ένζυμα ή έχουν ενδογενή ενζυμική δραστικότητα (π.χ. τυροσινικής κινάσης). Η πορεία του μηνύματος από την στιγμή που θα προσληφθεί από το κύτταρο μέχρι και την τελική επίδραση που επιφέρει στη λειτουργία του καλείται σηματοδοτικό μονοπάτι. Συνοπτικά ένα μονοπάτι έχει την εξής δομή (βλ. Εικ. 3.2):

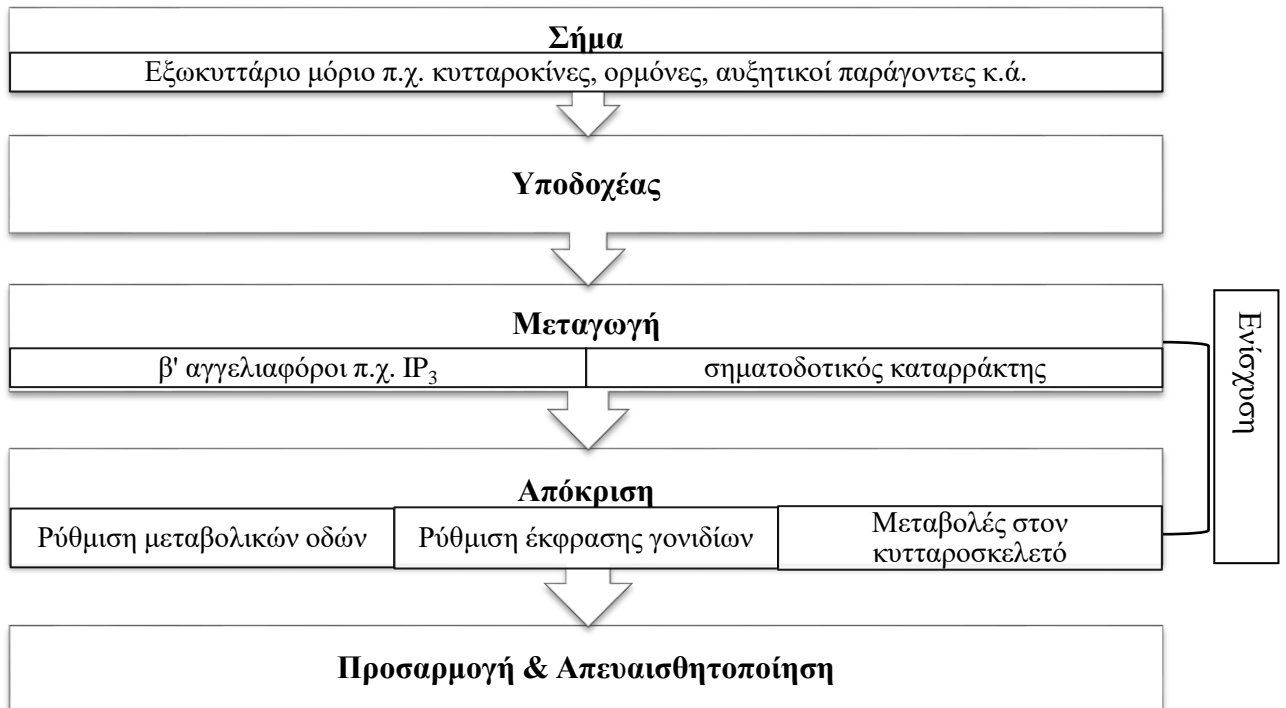
1. *Πρόσδεση μηνύματος (προσδέτη) στον υποδοχέα:* Μερικά μόρια (α' αγγελιοφόροι) είναι αρκετά μικρά και μη πολικά, όπως τα οιστρογόνα, ώστε διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και προσδένονται σε υποδοχείς στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πλειοψηφία όμως των μηνυμάτων είναι μεγάλα πολικά μόρια που προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς. Τα μόρια αυτά αναγνωρίζουν ειδικά, αλλά με αντιστρεπτό τρόπο, το εξωκυττάριο τμήμα ενός υποδοχέα του κυττάρου και με την πρόσδεσή τους σε αυτόν προκαλούν αλλαγές στη στερεοδιάταξή του, συμπεριλαμβανομένου του ενδοκυττάρου τμήματός του. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του υποδοχέα συμβαίνουν βιοχημικές μεταβολές που οδηγούν στην ενδοκυττάρια παραγωγή μικρών μορίων που αναφέρονται ως β' αγγελιοφόροι.
2. *Μεταγωγή σήματος μέσω των β' αγγελιοφόρων:* Έπειτα, ακολουθεί η μετατροπή του εξωκυττάρου σήματος σε ενδοκυττάρια σήματα μέσω ενός σηματοδοτικού καταρράκτη (μεταγωγή σήματος). Η μεταγωγή εκκινείται συνήθως από μη πρωτεϊνικές ουσίες που καλούνται β' αγγελιοφόροι ή δεύτερα μηνύματα και δρουν ως χημικοί μεσολαβητές μεταξύ της μεμβράνης και των βιοχημικών μηχανών του κυττάρου. Σε αυτά περιλαμβάνονται η cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη), η cGMP (κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη), τα ιόντα Ca^{2+} , η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και η διακυλογλυκερόλη (DAG). Τέτοια μόρια επιδρούν σε μια σειρά από πρωτεΐνες, ένζυμα και διαύλους ιόντων και ενεργοποιούν έναν καταρράκτη αντιδράσεων κατά τον οποίο το αρχικό εξωκυττάριο σήμα ενισχύεται (βλ. Εικ. 3.1).

Ένας τυπικός σηματοδοτικός καταρράκτης περιλαμβάνει την αλληπάλληλη ενεργοποίηση κινασών.



Εικόνα 3.1. Ενίσχυση του σήματος σε ένα σηματοδοτικό μονοπάτι. Στην παρούσα εικόνα απεικονίζεται η πρόσδεση ενός μορίου-σήματος (Σ) σε έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα (Y). Το μόριο που προσδέεται στον υποδοχέα ενεργοποιεί ένα ένζυμο ($E1$) το οποίο όμως έχει την ικανότητα να μετατρέψει σε προϊόντα πολλά μόρια υποστρώματος (β' αγγελιοφόρος) όσο παραμένει στην ενεργοποιημένη κατάσταση. Τα επόμενα ενζυμικά στάδια μιας σηματοδοτικής πορείας χαρακτηρίζονται επίσης από παραγωγή πολλών προϊόντων που προκύπτουν, καθώς ένα ένζυμο μετατρέπει περισσότερα από ένα μόριο-υπόστρωμα σε προϊόντα. Έτσι λοιπόν παρατηρείται η ενίσχυση ενός σήματος και με αυτό τον τρόπο εξηγείται η επίδραση των μηνυμάτων στα κύτταρα ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις.

3. **Τελική απόκριση του κυττάρου στο σήμα:** Στο τέλος του σηματοδοτικού καταρράκτη ενεργοποιείται συνήθως ένας μεταγραφικός παράγοντας που θα δράσει στον πυρήνα του κυττάρου τροποποιώντας την γονιδιακή μεταγραφή. Η τροποποίηση αυτή μεταφράζεται σε κυτταρική απόκριση και περιλαμβάνει τόσο άμεσες και σύντομες αλλαγές στην κυτταρική λειτουργία (έκκριση, χημειοταξία, μυϊκή συστολή, μεταβολή δυναμικού μεμβράνης) όσο και σε μακροπρόθεσμες μεταβολές (π.χ. διαφοροποίηση προς συγκεκριμένη αναπτυξιακή κατεύθυνση). Τέλος το κύτταρο μπορεί να προσαρμόζεται και να απευαισθητοποιείται στο ερέθισμα του συγκεκριμένου σήματος με την ρύθμιση των υποδοχέων μέσω ανατροφοδοτικών μηχανισμών.



Εικόνα 3.2. Δομή σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια ενός κυττάρου τυπικά έχουν τη δομή που απεικονίζεται στην εικόνα. Ένα εξωκυττάριο σήμα προσδίδεται σε έναν υποδοχέα του κυττάρου και η μεταγωγή του στο εσωτερικό γίνεται μέσω ενός σηματοδοτικού καταρράκτη που εκκινείται από την παραγωγή μικρών μορίων (β' αγγελιοφόροι). Το τελικό αποτέλεσμα στην απόκριση του κυττάρου καθορίζεται από τις αλλαγές στην γονιδιακή μεταγραφή.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό στις σηματοδοτικές πορείες είναι η εκτενής ενεργοποίηση ενζύμων, που καλούνται κινάσες, από τους β' αγγελιοφόρους. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων από το ATP (adenosine triphosphate), ένα μόριο υψηλής ενέργειας που είναι δότης φωσφορικών ομάδων, σε κάποιο υπόστρωμα. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών μεταβάλλει την ενεργότητά τους και συνεισφέρει στην μετάδοση του σήματος σε έναν σηματοδοτικό καταρράκτη. Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης δρα συνήθως ενεργοποιητικά αλλά μπορεί να δράσει και κατασταλτικά. Στον αντίποδα αυτής της ενζυμικής ενεργότητας εντοπίζονται οι φωσφατάσες οι οποίες καταλύουν την αφαίρεση των φωσφορικών ομάδων από τα υποστρώματα που τις φέρουν, αλλά η λειτουργία τους δεν είναι καλά μελετημένη.

Η μεταγωγή του σήματος σταματάει κυρίως με την μείωση, στην περιοχή του υποδοχέα, του χημικού μηνύματος που την εκκίνησε. Ακόμη, μπορεί να τροποποιηθεί η χημική συγγένεια

του υποδοχέα προς το μήνυμα ή να μειωθεί η ευαισθησία του κυττάρου προς αυτό με ενδοκύττωση και πρωτεόλυση του υποδοχέα. Η αδυναμία ενός κυττάρου να τερματίσει τη μεταγωγή ενός σήματος επιφέρει την απώλεια της ικανότητας να αποκρίνονται σε αυτό και πιθανά η μόνιμη ενεργοποίηση κάποιων μονοπατιών μπορεί να οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καρκίνο (Branden & Tooze, 1999) (Vander et al., 2001) (Berg JM, Tymoczko JL, 2002).

4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΤΩΝ ESCs ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Όπως κάθε βιολογική διεργασία, έτσι και η ανάπτυξη ενός εμβρύου είναι μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από πολύπλοκες και αλληλοεξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις στο μοριακό και στο κυτταρικό επίπεδο, μερικές εκ των οποίων έχουν χαρακτηριστεί. Οι ραγδαίες τεχνολογικές εξελίξεις έχουν συμβάλει σημαντικά στην μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση των εμπλεκόμενων μηχανισμών που οδηγούν στη δημιουργία ενός αυτόνομου οργανισμού από ένα μοναδικό κύτταρο -το ζυγωτό.

Κύριο πεδίο έρευνας προς αυτή την κατεύθυνση είναι η διαλεύκανση των σηματοδοτικών μονοπατιών που χαρακτηρίζουν τα ESCs. Βασικό εργαλείο στην προσπάθεια αυτή ήταν η εδραίωση τους σε καλλιέργειες. Στο τέλος της δεκαετίας του '90 η καλλιέργεια απαιτούσε την παρουσία τροφικών κυττάρων και συγκεκριμένα μιτωτικά ανενεργών ινοβλαστών ποντικών (MEFs). Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν απαραίτητους παράγοντες ώστε τα ESCs να αναπτύσσονται στην καλλιέργεια χωρίς να διαφοροποιούνται. Τα κύτταρα αυτά όμως καθιστούν την πειραματική διαδικασία πιο δύσκολη και χρονοβόρα ενώ μπορεί να εισάγουν ταυτόχρονα ανεπιθύμητους παράγοντες που οδηγούν τα κύτταρα σε διαφοροποίηση ή και απόπτωση. Σταδιακά όμως, εισήχθησαν συστήματα στα οποία δεν απαιτείται η παρουσία τροφικών κυττάρων αλλά χρησιμοποιούνται υλικά προσκόλλησης των ESCs όπως η λαμινίνη και το Matrigel μαζί με διάφορα θρεπτικά μέσα εμπλουτισμένα σε αναπτυξιακούς παράγοντες, χημειοκίνες και ορό. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο ορός εμβρύου μόσχου, μέσο στο οποίο πρώτα έχουν αναπτυχθεί MEF (mouse embryonic fibroblasts) και το knock-out serum replacement (KOSR) με ταυτόχρονη παροχή του παράγοντα Fgf2 του οποίου η δράση θα αναλυθεί παρακάτω (Κεφ. 4.1).

Η σύσταση καλλιεργητικών μέσων όπως ο ορός δεν είναι καθορισμένη και το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ζωική προέλευσή τους δημιουργεί προβλήματα στην καλλιέργεια και στην ανάπτυξη διάφορων εφαρμογών των ESCs. Αφενός, λόγω της ακαθόριστης σύστασης των υλικών, εισέρχεται ο παράγοντας της διακύμανσης και συνεπώς διαβάλλεται η αναπαραγωγικότητα των πειραμάτων. Για αυτό τον λόγο μια κατασκευαστική κλιμάκωση (scale-up) που θα προϋπέθετε και μαζική καλλιέργεια κυττάρων κρίνεται προς το παρόν αδύνατη. Αφετέρου, σε μια πιθανή θεραπευτική εφαρμογή των κυττάρων αυτών ελλοχεύει ο κίνδυνος της μετάδοσης παθογόνων, που μπορεί να υπάρχουν στα καλλιεργητικά μέσα, προς

τον δέκτη των κυττάρων. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η μελέτη των παραγόντων που συνεισφέρουν στη διατήρηση της πολυδυναμίας για την δημιουργία χημικά καθορισμένων καλλιεργητικών μέσων. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται εφικτή και η ελεγχόμενη μελέτη της επίδρασης μεμονωμένων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στα κύτταρα (Furue et al., 2010). Σε αυτό το πλαίσιο έχουν διαμορφωθεί πειραματικά πρωτοκόλλα που δεν είναι απαραίτητη η χρήση ορού. Για παράδειγμα τα mESCs μπορούν να διατηρηθούν σε καλλιέργεια LIF/2i, όπου παρέχεται ο LIF και δυο αναστολείς (MEKi/GSK3i) που στοχεύουν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν προς τη διαφοροποίηση. Αντίστοιχα πρωτόκολλα αναπτύσσονται και για τα hESCs όπου γίνονται προσπάθειες ώστε οι καλλιέργειες είτε να περιέχουν ανθρώπινους ινοβλάστες (xeno-free) είτε να έχουν χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο με αυξητικούς παράγοντες και αναστολείς και όχι ορό (serum-free) (D. Zhang et al., 2016).

Οι Prowse *et al*, το 2005, έκαναν μια πρωτογενή ανάλυση κατά την οποία αναγνωρίστηκαν 102 διαλυτοί παράγοντες που υπήρχαν σε μέσο στο οποίο αναπτύχθηκαν ανθρώπινοι ινοβλάστες (Prowse et al., 2005). Τα μόρια τα οποία εντοπίστηκαν βρίσκονται ακόμα υπό μελέτη για να εξακριβωθεί η δράση τους στα hESCs και σημαντικότερα για να διαλευκανθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εκκινούν και συνεισφέρουν στη διατήρηση της πολυδυναμίας. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια λοιπόν, και κυρίως τα ερεθίσματα που τα πυροδοτούν, βρίσκονται υπό διεξοδική μελέτη τα τελευταία χρόνια. Υπάρχουν ακόμη όμως κάποια προβλήματα τα οποία δυσχεραίνουν τη μελέτη αυτή, καθώς και τη διαμόρφωση συμπερασμάτων που να έχουν γενικευμένη ισχύ, και σε αυτά περιλαμβάνονται:

1. Διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα. Κάθε εργαστήριο βελτιστοποιεί και διαμορφώνει τα πρωτόκολλα που ακολουθεί για την καλλιέργεια των ESCs. Μικρές ή και μεγαλύτερες παρεκκλίσεις μεταξύ των διάφορων ερευνητικών ομάδων στο σχεδιασμό των πειραμάτων οδηγεί σε εξαγωγή συμπερασμάτων τα οποία εξαρτώνται άμεσα από αυτόν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μελέτη της επίδρασης στην πολυδυναμία ενός συγκεκριμένου παράγοντα, σε καλλιέργειες που περιλαμβάνονται τροφικά κύτταρα και σε άλλες που απουσιάζουν. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο τύπων κυττάρων μεταβάλλουν τα σήματα που δέχονται τα ESCs έτσι ώστε μεταβάλλεται και γενικότερα η βιοχημεία τους. Συνεπώς είναι λανθασμένη η αναγωγή των συμπερασμάτων σε καθολικό κανόνα και ταυτόχρονα, με αυτό τον τρόπο, εξηγούνται πιθανές ασυμφωνίες μεταξύ όμοιων ερευνών που υπάρχουν στη βιβλιογραφία.

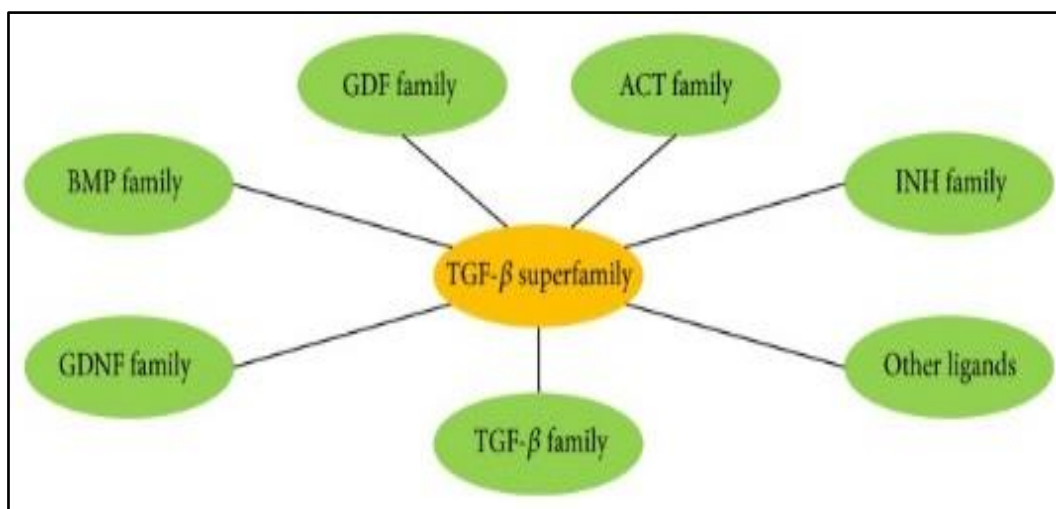
2. Τεχνολογικοί περιορισμοί. Παρότι οι τεχνολογικές εξελίξεις τον τελευταίο μισό αιώνα είναι ραγδαίες, υπάρχουν ακόμη εγγενείς περιορισμοί στις δυνατότητες των οργάνων που χρησιμοποιούνται στις διάφορες τεχνικές. Είναι απαραίτητο λοιπόν να λαμβάνεται υπόψιν η διακριτική ικανότητα⁴ και η ευαισθησία⁵ ενός οργάνου κατά τη μέτρηση παραμέτρων.
3. Μη συνδυαστική μελέτη των μονοπατιών. Τα διάφορα κυτταρικά μονοπάτια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συν-ρυθμίζονται. Η μεμονωμένη μελέτη ενός μονοπατιού οδηγεί στη εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν σε τμήμα και όχι στην πραγματική και πλήρη εικόνα των κυτταρικών διεργασιών.
4. Επίπεδο ενεργοποίησης των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι κάποιοι παράγοντες που συμμετέχουν σε μονοπάτια προκαλούν διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις ανάλογα με το επίπεδο ενεργοποίησής τους. Είναι λοιπόν απαραίτητο να λαμβάνεται υπόψιν και ο βαθμός στον οποίο ενεργοποιείται ένα μονοπάτι (Dalton, 2014).

⁴ Διακριτική ικανότητα είναι η ελάχιστη μείωση ή αύξηση του μετρούμενου μεγέθους που μπορεί να αναγνωρισθεί από το όργανο μέτρησης.

⁵ Ευαισθησία είναι ο λόγος της μεταβολής της ένδειξης του οργάνου προς τη μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους και σχετίζεται με την διακριτική ικανότητα του οργάνου.

4.1 Μονοπάτι TGFβ

Ένας από τους πρώτους παράγοντες στο μέσο MEF που ταυτοποιήθηκε ως παράγοντας διατήρησης της πολυδυναμίας σε αμφότερα τα mESC και hESC ήταν η **activin A**, ένα από τα τουλάχιστον 42 μέλη της υπερικογένειας των παραγόντων TGFβ (transforming growth factor β) στον άνθρωπο. Τα μέλη αυτής της υπερικογένειας, όπως οι οικογένειες Activin και BMP (Εικ.), μπορεί να έχουν χαμηλή ομολογία αλληλουχίας μεταξύ τους αλλά φέρουν έξι υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Τα κατάλοιπα αυτά εξυπηρετούν τη δημιουργία ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών που δίνουν ιδιαίτερη διαμόρφωση (θηλιά κυστεΐνης) στα μόρια αυτά, αλλά και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών καθώς καθίστανται ενεργά κυρίως ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή (Galat, 2011) (Poniatowski, Wojdasiewicz, Gasik, & Szukiewicz, 2015).



Εικόνα 2.1.1. Μέλη της υπερικογένειας των παραγόντων TGF-β. TGF-β: transforming growth factor beta; GDF: growth and differentiation factor; ACT: activin; INH: inhibin; GDNF: glial-derived neurotrophic factors; BMPs: bone morphogenetic proteins. Στους λοιπούς προσδέτες περιλαμβάνονται πρωτεΐνες όπως η AMH (φυλετική διαφοροποίηση/ωοθυλακιογένεση), η Lefty (αριστερή-δεξιά ασυμμετρία) και Nodal (Poniatowski et al., 2015).

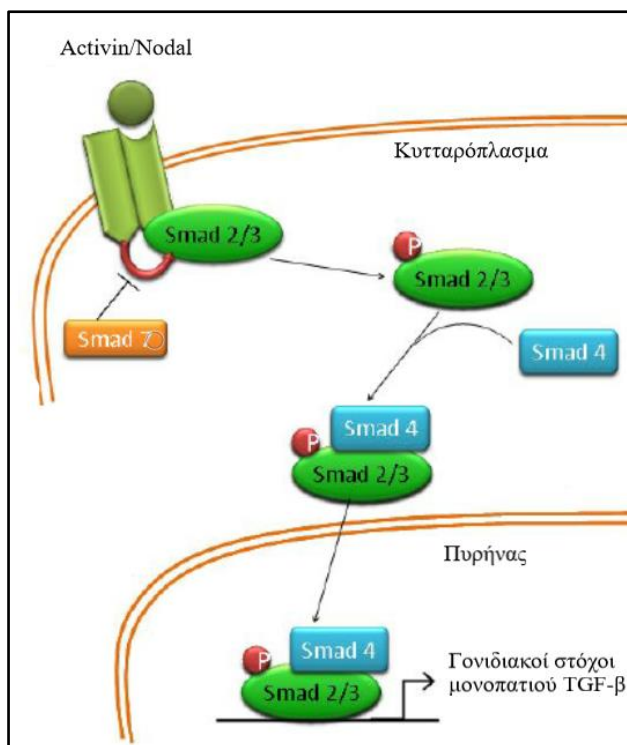
Οι παράγοντες αυτοί δρουν με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο και συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών. Σε κυτταρικό επίπεδο συμμετέχουν στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης καθώς και της

επιβίωσης. Η επίδρασή τους σε επίπεδο οργανισμού είναι εξίσου σημαντική καθώς δρουν, για παράδειγμα, ως μορφογόνα με συνεισφορά σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, συμμετέχουν στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων, στην αγγειογένεση και στην ανάπλαση των ιστών (Dalton, 2014)(Poniatowski et al., 2015).

Ένα τυπικό μονοπάτι των προσδετών που ανήκουν στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τη διαδοχική ενεργοποίηση διαμεμβρανικών υποδοχέων που οδηγεί στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών **Smad**. Έπειτα οι Smad μετατοπίζονται στον πυρήνα και δρουν ως μεταγραφικοί συμπαράγοντες ρυθμίζοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του κυττάρου (βλ. Εικ. 4.1.2) (Dalton, 2014). Οι πρωτεΐνες Smad είναι τα κύρια μόρια μετάδοσης του σήματος που εκκινείται από τα μέλη της οικογένειας TGFβ και στον άνθρωπο υπάρχουν 8 διαφορετικές Smads οι οποίες διακρίνονται σε 3 ομάδες, ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους:

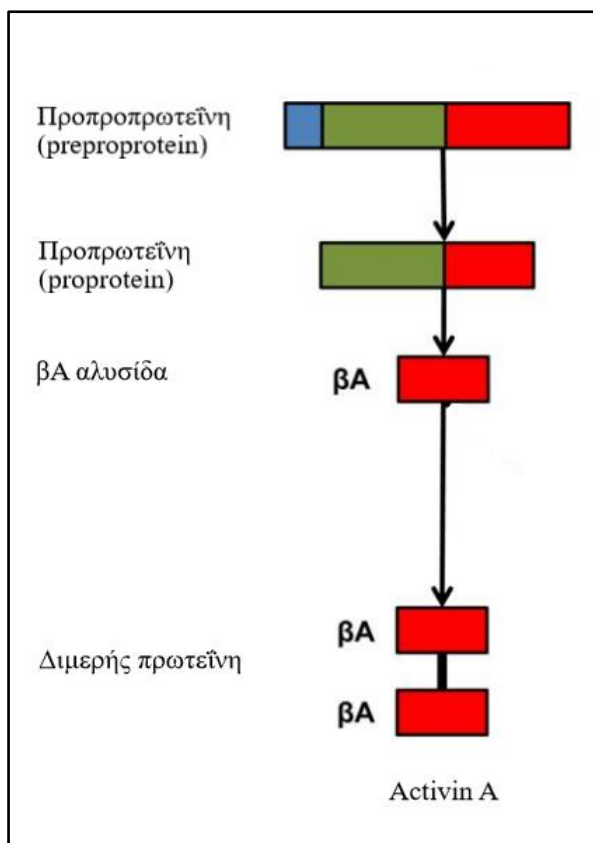
1. Οι **R-Smads** (receptor-regulated) στις οποίες περιλαμβάνονται οι Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 και Smad8/9. Οι Smad2/3 είναι υποστρώματα των υποδοχέων που αναγνωρίζουν παράγοντες που ανήκουν στις οικογένειες TGFβ, activin και Nodal. Οι Smad1/5/8 είναι υποστρώματα των υποδοχέων που αναγνωρίζουν μέλη των οικογενειών AMH και BMP (βλ. Κεφ.5.1).
2. Η **co-Smad** (common-mediator) Smad4, η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι TGFβ, αλληλεπιδρά με όλες τις R-Smad και επιτρέπει τη μεταφορά τους στον πυρήνα.
3. Οι **I-Smads** (inhibitory) στις οποίες ανήκουν οι Smad6 και Smad7 και δρουν αναστέλλοντας τη δράση των άλλων Smads αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα που τις φωσφορυλιώνει, ενώ η Smad 6 αποτρέπει επιπλέον την αλληλεπίδραση των ενεργών R-Smad με την Smad4 (Miyazawa, Shinozaki, Hara, Furuya, & Miyazono, 2002).

Στα ανθρώπινα ESCs το μονοπάτι TGFβ, όπως προαναφέρθηκε, έχει βρεθεί ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις πρωτεΐνες activin A και Nodal. Η παρουσία τους σε καλλιεργητικό μέσο αποτρέπει την έξοδο των hESCs από την κατάσταση της πολυδυναμίας. Παράλληλα παρατεταμένη έκθεση τους στην activin A οδηγεί σε διαφοροποίηση σε οριστικό ενδόδερμα. Η διατήρηση της αυτό-ανανέωσης των hESCs οφείλεται στην επαγωγή παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την πολυδυναμία όπως ο Oct4, Nanog, Wnt3, Fgf2 καθώς και στην καταστολή του BMP7 (Loomans et al., 2014). Οι παράγοντες αυτοί είναι απαραίτητοι για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης και θα συζητηθούν εκτενέστερα στο Κεφάλαιο 6.



Εικόνα 4.1.2. Σχηματική αναπαράσταση μονοπατιού TGFβ. Ένας προσδέτης που ανήκει στην υπεροικογένεια TGFβ (π.χ. Activin A) προσδένεται και ενεργοποιεί υποδοχείς που φέρουν περιοχές με ενεργότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης. Έπειτα μέσω φωσφορύλιωσης ενεργοποιούνται οι R-Smad (Smad 2/3) και έπειτα από την πρόσδεση της Co-Smad (Smad4) μετατοπίζονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του κυττάρου. Προσαρμοσμένη από (Soncin & Ward, 2011).

Η Activin A είναι ένα διμερές των δυο δομικά όμοιων υπομονάδων που καλούνται αλυσίδες β_A οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Αρχικά συντίθεται στα κύτταρα ως ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο το οποίο φέρει, εκτός της ώριμης αλληλουχίας που αποτελεί το εκκρινόμενο ενεργό μόριο, μια αμινοτελική αλληλουχία σήματος και μια προ-περιοχή οι οποίες αποκόπτονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο από πρωτεάσες. Το ώριμο μόριο εκκρίνεται ως διμερές των δυο υπομονάδων β_A οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικού δεσμού και μέσω αυτής της διαδικασίας ωρίμανσης συντίθεται η πλειονότητα των μελών της υπεροικογένειας TGFβ (Refaat, 2014).



Εικόνα 4.1.3. Παραγωγή της activin A. Η πρωτεΐνη activin A εκφράζεται ως ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο το οποίο αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές. Στο αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται η αλληλουχία σήματος και στο καρβοξυτελικό άκρο η αλληλουχία που θα σχηματίσει το ώριμο μόριο. Ενδιάμεσα παρεμβάλλεται μια προ-περιοχή. Εξ αυτών, η αμινοτελική περιοχή και η προ-περιοχή αποκόπτονται μέσω πρωτεόλυσης και από τον διμερισμό των δυο ώριμων β αλυσίδων προκύπτει η activin A. Προσαρμοσμένο από (Refaat, 2014)

Όπως και σε όλα τα μέλη της υπερικογένειας TGFβ, η δράση της activin A διαμεσολαβείτε από διαμεμβρανικούς υποδοχείς που φέρουν υψηλά συντηρημένες περιοχές με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης και διακρίνονται σε τύπου I και τύπου II. Οι υποδοχείς αυτοί περιλαμβάνουν μια αμινοτελική εξωκυτταρική περιοχή την οποία αναγνωρίζει ο προσδέτης, μια περιοχή που διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη, και μια καρβοξυτελική περιοχή που φέρει την ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Συγκεκριμένα, η activin A αναγνωρίζει και προσδένεται στον υποδοχέα ACVRII του οποίου η ενεργότητα κινάσης είναι μόνιμα ενεργή και οδηγείται σε αυτοφωσφορυλίωση. Η ενεργοποίηση του οδηγεί στην επιστράτευση του υποδοχέα ACVRI τον οποίο φωσφορυλιώνει σε μια διατηρημένη περιοχή πλούσια σε γλυκίνη-σερίνη SGSGSG, η οποία πρόσκειται στην

εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Ο ενεργός πλέον ACVRI, μέσω της δράσης του ως κινάση, φωσφορυλλιώνει και ενεργοποιεί ένα διμερές δυο δομικά παρόμοιων πρωτεϊνών που εντοπίζεται ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα (Pauklin & Vallier, 2015).

Το διμερές αυτό αποτελείται από τις R-Smad, Smad2 και Smad3, οι οποίες όταν φωσφορυλλιωθούν σε κατάλοιπα σερίνης σχηματίζουν ένα τριμερές με την Smad4, εισέρχονται στο κύτταρο, και αναγνωρίζουν ειδικές περιοχές του DNA που καλούνται SBE (Smad-binding elements). Η πρόσδεση αυτή είναι σχετικά αδύναμη και μη ειδική και διαμορφώνεται με τη συμμετοχή άλλων μορίων που προσδένονται στο DNA τα οποία αναφέρονται συνοπτικά στην εργασία των Miyazawa et al., 2002. Με αυτό τον τρόπο μεταβάλουν τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία (Park, 2011) (Oshimori & Fuchs, 2012). Η φωσφορυλίωση αυτή συμβαίνει μόνον όσο οι υποδοχείς της actinin παραμένουν ενεργοποιημένοι, δηλαδή παρουσία του σήματος. Όταν απενεργοποιηθούν οι υποδοχείς οδηγούνται σε αποφωσφορυλίωση, διαχωρισμό της Smad4 από τις Smad2/3 και εξαγωγή από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Συνεπώς η ενεργότητα των Smad εξαρτάται άμεσα από την κατάσταση ενεργοποίησης των υποδοχέων, ενώ είναι πιθανή, με μικρή συνεισφορά, και η πρωτεασομική αποδόμηση κάποιων Smad ύστερα από ουβικιτινύλιωση στον πυρήνα.

Οι πρωτεΐνες Smad έχουν μήκος ~500 αμινοξέων και αποτελούνται από δυο σφαιρικές περιοχές ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλεται μια συνδετική αλληλουχία. Η αμινοτελική MH1 (Mad homology) περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη σε όλες τις R-Smad και την co-Smad ενώ η καρβοξυτελική MH2 είναι υψηλά συντηρημένη σε όλες τις Smad. Αντίθετα, η ενδιάμεση συνδετική περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε προλίνη, διαφέρει αρκετά ανάμεσα στις διάφορες Smad. Αποτελεί ένα εύκαμπτο τμήμα του μορίου το οποίο περιλαμβάνει θέση πρόσδεσης για λιγάσες ουβικιτίνης Smurf (Smad ubiquitination-related factor), θέσεις φωσφορυλίωσης για διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες και, στην περίπτωση της Smad4, ένα σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES) (Massagué, Seoane, & Wotton, 2005).

Η MH1 περιοχή φέρει σηματοδοτική αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού NLS (nuclear localization signal) που επιτρέπει τη μεταφορά τους στον πυρήνα (Zwijnsen, Verschueren, & Huylebreeck, 2003). Παράλληλα είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA των γονιδίων στα οποία οι Smad δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες Η MH2 περιοχή αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα τύπου I και φωσφορυλιώνεται στο μοτίβο SSXS (Ser-Ser-Val/Met-Ser). Η ίδια περιοχή είναι απαραίτητη για τον ολιγομερισμό των R-

Smad και την αναγνώριση της Smad4, ενώ μέσω αυτής οι Smad αλληλεπιδρούν με πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες και κυτταροπλασματικούς προσαρμογείς. Έχει βρεθεί ότι οι Smad3/4 προσδένονται στο DNA στην παλινδρομική αλληλουχία των οκτώ νουκλεοτιδίων GTCTAGAC. Η πρόσδεση μπορεί να γίνει σε καθένα από τα δυο μισά της αλληλουχίας αυτής μέσω του μοτίβου β-φουρκέτα που αποτελείται από 11 αμινοξέα και εντοπίζεται στην περιοχή MH1. Η Smad2 δεν δύναται να προσδεθεί στο DNA λόγω στερικής παρεμπόδισης. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν κέντρα οργάνωσης των Smad τα οποία διευκολύνουν την αλληλεπίδραση τους με άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα η μη ενεργοποιημένη Smad2 εντοπίζεται προσδεσμένη στην κυτταροπλασματική πρωτεΐνη SARA (Smad anchor for receptor activation) η οποία προσδέεται και στον υποδοχέα τύπου I, διαμεσολαβώντας έτσι τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Moustakas, Souchelnytskyi, & Heldin, 2001).

Η δράση των Smad ρυθμίζεται συνδυαστικά χωρικά και χρονικά μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν την σταθερότητα, τον εντοπισμό και την ενεργότητά τους, καθώς και μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης (Gaarenstroom & Hill, 2014). Το σύμπλοκο Smad2/3 μπορεί να μεταβάλλει τη μεταγραφική ενεργότητα γονιδιακών τόπων με την προσέλευση σε αυτούς αρνητικών ή θετικών ρυθμιστών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών CBP/p300 και η αποακετυλάση των ιστονών HDAC1-6. Οι R-Smad προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου *Nanog*⁶ και επάγουν την έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος αποτρέπει την διαφοροποίηση προς νευροεξώδερμα. Αυτός είναι ο σημαντικότερος γονιδιακός στόχος τους όσον αφορά τη διατήρηση της πολυδυναμίας αν και ρυθμίζουν τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων όπως για παράδειγμα, συνεργιστικά με τις πρωτεΐνες Oct4 και Nanog, καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου *SIP1* (Smad-interacting protein 1) που προάγει τη διαφοροποίηση προς νευροεξώδερμα (Oshimori & Fuchs, 2012). Έχει βρεθεί ότι η Smad2 έχει μεγαλύτερο δυναμικό στη μεταγωγή του σήματος στο μονοπάτι TGFβ από την Smad3 (Liu et al., 2016).

Η δράση της activin A ρυθμίζεται με διάφορους μηχανισμούς οι οποίοι περιλαμβάνουν εξωκυττάριους ανταγωνιστές για την πρόσδεση στους υποδοχείς, ενδοκυττάρια πρωτεΐνες (Smad6/7), miRNAs, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην «ανακύκλωση» των υποδοχέων καθώς και συν-ρυθμιστές της μεταγραφής. Ένας σημαντικός εξωκυττάριος ανταγωνιστής είναι η

⁶ Ο Nanog μαζί με τους παράγοντες Oct4 και Sox2 αποτελούν το βασικό μεταγραφικό δίκτυο παραγόντων που είναι ενεργό στα κύτταρα σε κατάσταση πολυδυναμίας και θα αναπτυχθεί στο Κεφ.6 καθότι είναι κοινό για όλα τα μονοπάτια που θα αναλυθούν.

πρωτεΐνη follistatin με την οποία συμπλοκοποιείται στην ίδια περιοχή που προσδένεται η activin A με τον υποδοχέα, σχεδόν με μη αναστρέψιμο τρόπο. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη Inhibin A, καθώς φέρει παρόμοια αλυσίδα β_A με την activin A στο μόριο της, είναι ικανή να προσδένεται στους ίδιους υποδοχείς και να αποτρέπει τη σύνδεσή της. Ταυτόχρονα οι ανασταλτικές Smad6/7 προσδένονται στους υποδοχείς τύπου I και αποτρέπουν την ενεργοποίηση των ρυθμιστικών Smad2/3. Τέλος, ένα πολύ σημαντικό στοιχείο στην απόκριση του πολυδύναμου κυττάρου στην activin A, είναι ο παράγοντας FoxH1 που προσδένεται με τις Smad και το DNA και συμμετέχει στη μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας (Pauklin & Vallier, 2015).

Το μονοπάτι TGFβ, όπως αυτό περιγράφηκε, έχει παρατηρηθεί σε ESC ανθρώπου και ποντικού με την συμμετοχή όμως στα mESCs όσον αφορά στη διατήρηση της πολυδυναμίας να είναι υπό διερεύνηση και να υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η ίδια σηματοδοτική πορεία με συμμετοχή των ίδιων Smad εκκινείται όπως προαναφέρθηκε και μέσω της πρωτεΐνης **Nodal**. Η πρόσδεση του παράγοντα αυτού σε ένα κύτταρο γίνεται μέσω του υποδοχέα ACVRII όπως συμβαίνει και με την activin A με τη διαφορά ότι συμμετέχει και ο συν-υποδοχέας CRIPTO1. Μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. p53, Mixer, FoxH1) το σύμπλοκο Smad που ενεργοποιεί προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων και επάγει τη μεταγραφή τους. Σε αυτά τα γονίδια συμπεριλαμβάνεται ένας καταστολέα του μονοπατιού που ονομάζεται Lefty αλλά και το ίδιο το γονίδιο Nodal, ρυθμίζοντας έτσι και έναν θετικό κύκλο ανατροφοδότησης (Schier, 2003). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης των δυο «αντιμαχόμενων» πρωτεϊνών ρυθμίζονται από οικογένειες microRNA, και συγκεκριμένα στον άνθρωπο από την οικογένεια miR-302 (Barroso-delJesus et al., 2011). Στους εξωκυττάρους ρυθμιστές του Nodal συμπεριλαμβάνονται, εκτός από την πρωτεΐνη Lefty, οι πρωτεΐνες Cerberus και κάποιες BMPs (Schier, 2003).

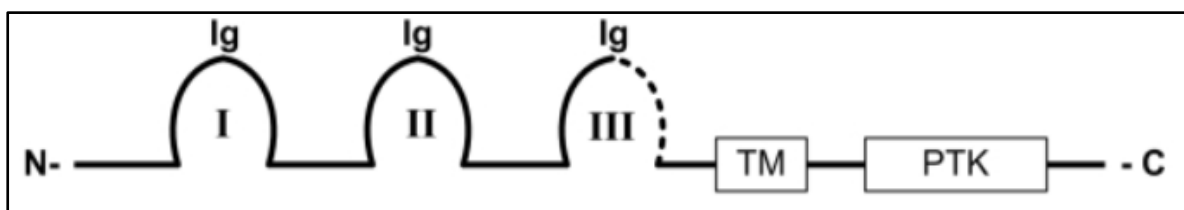
Τόσο η activin A όσο και η Nodal είναι ικανές να διατηρούν την έκφραση δεικτών πολυδυναμίας με παρόμοιους μηχανισμούς, οι οποίοι όμως είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους (Vallier, 2005). Μια μελέτη του 2015 καταδεικνύει την επίδραση τους στην επιγενετική κατάσταση των κυττάρων. Είναι γνωστό ότι τα πολυδύναμα κύτταρα φέρουν στο DNA τους πολλές περιοχές με ενεργοποιητικές μεθυλιώσεις H3K4me3 και αυτές μειώνονται όσο το κύτταρο οδηγείται προς τη διαφοροποίηση. Βρέθηκε λοιπόν ότι οι Smad2/3, οι τελεστές του μονοπατιού Activin/Nodal, σε συνεργασία με τον Nanog προσελκύουν παράγοντες του συμπλόκου COMPASS που διατηρεί τις μεθυλιώσεις αυτές σε γονίδια σημαντικών ρυθμιστών της ανάπτυξης (Bertero et al., 2015). Συνεπώς η ενεργοποίηση του μονοπατιού TGFβ και κατ'

επέκταση των Smad συμβάλλει στη διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινοτύπου με διάφορους μηχανισμούς.

4.2 Μονοπάτι PI3K/AKT

Ο αυξητικός παράγοντας FGF-2 (fibroblast growth factor 2) ο οποίος είναι γνωστός και ως bFGF (basic FGF) είναι ένα πολυπεπίδιο το οποίο εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως η εμβρυονική ανάπτυξη, η μορφογένεση, η επιβίωση των βλαστικών κυττάρων και η ιστική ανάπλαση. Μαζί με τον παράγοντα activin A (ή τον Nodal) χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες hESCs καθώς είναι δυο παράγοντες που απαιτούνται και αρκούν για την αυτό-ανανέωση αυτών των κυττάρων. Μάλιστα υπάρχει η πιθανότητα να υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών καθώς παρουσία και των δυο παραγόντων οδηγεί σε ιδιαίτερα υψηλή έκφραση δεικτών πολυδυναμίας στα κύτταρα. Ταυτόχρονα η παρουσία μόνον ενός εκ των δυο σε κυτταροκαλλιέργεια hESCs επιτρέπει τη διατήρηση της πολυδυναμίας για λίγες μόνο κυτταρικές διαιρέσεις (passages) (Vallier, 2005). Παρότι έχει παρατηρηθεί η διατήρηση των hESCs και παρουσία μόνον της activin A, εικάζεται ότι αυτό συμβαίνει λόγω επαγωγής της έκφρασης του FGF2, ο οποίος έπειτα δρα με αυτοκρινή τρόπο (Dalton, 2014).

Οι FGFs εκτελούν τις βιολογικές τους δράσεις με δέσμευση, διμερισμό και ενεργοποίηση υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας που ονομάζονται FGFR. Αυτοί οι υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων RTK, δηλαδή στους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί FGFRs, οι FGFR1-4, που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης FGF και έχει βρεθεί ότι και οι τέσσερις εκφράζονται στα Oct4 θετικά hESCs και αναστολή αυτών οδηγεί σε ταχεία διαφοροποίησή τους. Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος υπάρχουν διάφορες ισομορφές που ξεπερνούν τις 48 σε σύνολο. Όλες περιλαμβάνουν τρεις εξωκυττάριας περιοχές τύπου-ανοσοσφαιρίνης (Ig-like I, II, III), μια διαμεμβρανική περιοχή και δυο ενδοκυττάριας περιοχές με δράση τυροσινικής κινάσης (TK1, TK2) (Εικ. 4.2.1).



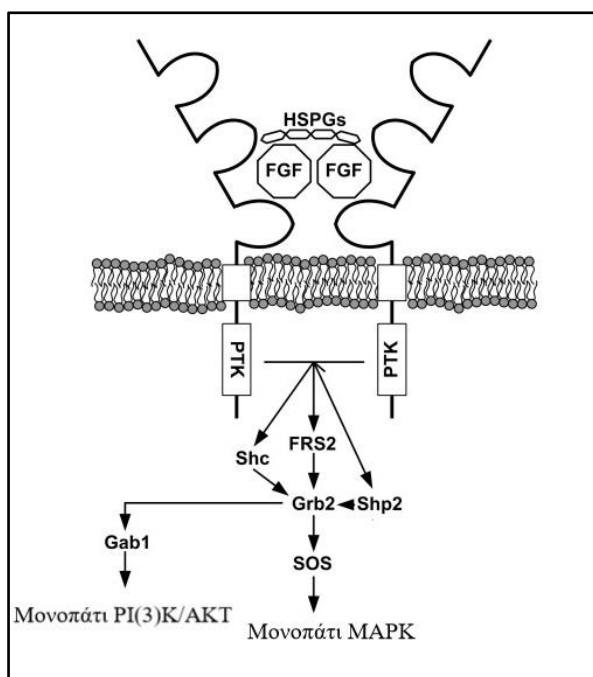
Εικόνα 4.2.1. Δομή υποδοχέα FGFR. Ο FGFR φέρει μια διαμεμβρανική περιοχή (TM) και εκατέρωθεν αυτής μια περιοχή με δράση τυροσινικής κινάσης (PTK) προς το καρβοξυτελικό άκρο και τρεις περιοχές τύπου-ανοσοσφαιρίνης (IgI-III) προς το αμινοτελικό άκρο. Η τρίτη περιοχή IgIII θεωρείται ότι προσδίδει ειδικότητα προς το υπόστρωμα. Προσαρμοσμένη από (Coutu & Galipeau, 2011).

Ο Fgf2 προσδένεται με όλους τους υποδοχείς αλλά έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς την ισομορφή FGFR1c. Η μεταξύ τους πρόσδεση σταθεροποιείται μέσω πρωτεογλυκανών ηπαρίνης/θειικής ηπαράνης (HSPG) που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποτρέπουν την διάχυση προς την εξωκυττάρια ουσία και ρυθμίζουν την ειδικότητα και τη συγγένεια. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στη διαμόρφωση κατά το σχηματισμό του συμπλοκου FGF-HS-FGFR οδηγούν στο διμερισμό με ένα συμμετρικό σύμπλοκο (Εικ. 4.2.2) και την ενεργοποίηση της ενεργότητας των τυροσινικών κινασών με trans-αυτοφωσφορυλίωση. Για την πλήρη ενεργοποίηση της κινάσης στον υποδοχέα FGFR1 απαιτείται η διαδοχική φωσφορυλίωση έξι καταλοίπων τυροσίνης (Ornitz & Itoh, 2015) Με αυτό τον τρόπο πυροδοτούνται ενδοκυττάρια, ανάμεσα σε άλλα, τα μονοπάτια PI(3)K/AKT και MAPK τα οποία συμμετέχουν στην πολυδυναμία και αναλύονται παρακάτω.

Αρχικά, με την ενεργοποίηση των υποδοχέων, φωσφορυλιώνεται η πρωτεΐνη-προσαρμογέας FRS2a (FGFR Substrate 2a) η οποία είναι μόνιμα προσδεδεμένη μέσω μιας περιοχής PTB (phosphotyrosine-binding) στην θέση πρόσδεσής της στον FGFR που βρίσκεται πλησίον της μεμβράνης. Η FRS2a φέρει έξι σημεία φωσφορυλίωσης στο καρβοξυτελικό της άκρο και μέσω αυτών είναι εφικτές οι διαφορετικές αποκρίσεις του κυττάρου στην πρόσδεση του FGF στον υποδοχέα. Η ενεργοποιημένη FRS2a προσδένει την πρωτεΐνη-προσαρμογέα Grb2 (growth factor receptor-bound) καθώς και την φωσφατάση τυροσίνης Shp2. Και οι δυο αυτές πρωτεΐνες περιέχουν μια περιοχή SH2⁷ (Src homology) που επιτρέπει τον ελλιμενισμό

⁷ Η διαφορά μεταξύ των περιοχών PTB και SH2 έγκειται στη δυνατότητα των πρωτεϊνών που φέρουν την πρώτη να προσδένονται συνεχώς (constitutively) στα κατάλοιπα-στόχους τυροσίνης ανεξαρτήτως της κατάστασης φωσφορυλίωσης αυτών.

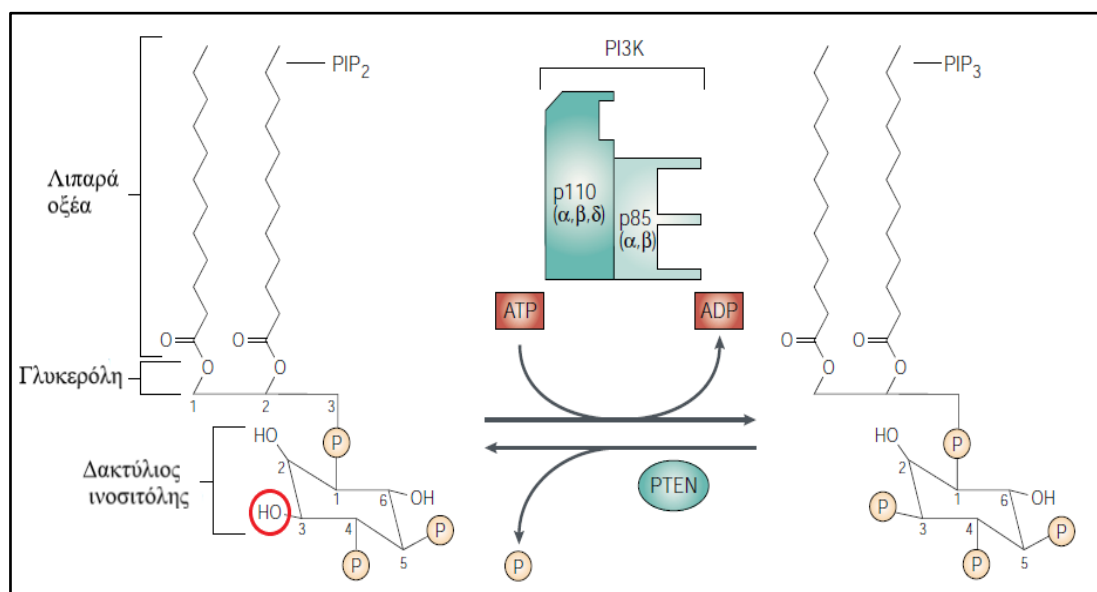
τους σε πρωτεΐνες με φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης. Η Grb2, παράπλευρα της περιοχής SH2, φέρει και δυο περιοχές SH3 οι οποίες εξυπηρετούν την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και τη δημιουργία συμπλόκων. Η αμινοτελική περιοχή SH3 μπορεί να προσδένεται σε πεπτίδια πλούσια σε προλίνη όπως ο παράγοντας Sos που θα συζητηθεί στο μονοπάτι MAPK (βλ. Κεφ. 4.3). Η καρβοξυτελική SH3 περιοχή αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο μοτίβο αμινοξέων και προσδένει την πρωτεΐνη Gab1 (GRB-associated-binding protein) (Ornitz & Itoh, 2015) (Gotoh, 2008).



Εικόνα 4.2.2. Σηματοδοτική πορεία που πυροδοτεί ο παράγοντας FGF. Αρχικά ο FGF προσδένεται στον FGFR και η πρόσδεση ισχυροποιείται μέσω των πρωτεογλυκανών HSPG. Επακολουθεί διμερισμός δύο όμοιων συμπλόκων FGF-HSPG-FGFR και ενεργοποίηση της ενεργότητας κινάσης. Έπειτα δημιουργείται το σύμπλοκο FRS2α-Grb2-Shp2 που μέσω της Grb2 ενεργοποιεί τις Gab1 και Sos και κατ' επέκταση τα μονοπάτια PI(3)K/AKT και MAPK αντίστοιχα. Προσαρμοσμένη από (Coutu & Galipeau, 2011).

Η τεταρτοταγής δομή του συμπλόκου FRS2α-Grb2-Gab1 επάγει την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης που φέρει η Gab1 και την ενεργοποιεί. Η πρωτεΐνη αυτή φέρει μια περιοχή με ομολογία πλεκστρίνης (PH-pleckstrin homology domain), μια περιοχή πλούσια σε προλίνη καθώς και σημεία φωσφορυλίωσης τυροσίνης που δρουν ως σημεία ελλιμενισμού της κινάσης λιπιδίων PI-3 (Phosphatidylinositol-3) μέσω της επικράτειας SH2 την οποία φέρει. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται το μονοπάτι **PI(3)K/AKT**.

Οι PI(3)K αποτελούν μία οικογένεια ενδοκυτταρικών ενζύμων μεταγωγής σήματος και τα μέλη της χωρίζονται σε τρεις κλάσεις. Στην κλάση I ανήκουν εκείνες οι οποίες είναι ικανές να φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα της θέσης 3 του δακτυλίου ινοσιτόλης των φωσφατιδυλοϊνοσιτολών. Στο μονοπάτι αυτό διενεργείται φωσφορυλίωση της PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), που βρίσκεται προσδεμένη στη μεμβράνη, προς παραγωγή PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) (Εικ. 4.2.3). Αυτή η τροποποίηση δίνει τη δυνατότητα να προσδεθεί στην PIP₃ η κινάση AKT, η οποία είναι γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB), μέσω μιας επικράτειας PH (Ding et al., 2010).



Εικόνα 4.2.3. Δομή των φωσφολιπιδίων PIP₂ και PIP₃ και ενζυμική αλληλομετατροπή. Οι φωσφορικές φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες αποτελούνται από μια μεμβρανοπροσδεμένη ομάδα φωσφατιδικού οξέος στην οποία συνδέεται ένα μόριο γλυκερόλης η οποία ακολουθείται από το δακτύλιο της ινοσιτόλης που εντοπίζεται προς την κυτταροπλασματική πλευρά. Η PI(3)K φωσφορυλιώνει την PIP₂ στη θέση D3 προς σχηματισμό του δεύτερου αγγελιοφόρου PIP₃. Η φωσφορυλίωση στη θέση αυτή είναι απαραίτητη για δέσμευση πρωτεϊνών που φέρουν περιοχή ομολογίας πλέγματος πλεκστρίνης, όπως η AKT. Η αποφωσφορυλίωση της PIP₃ για την αναγέννηση της PIP₂ επιτυγχάνεται με την 3-φωσφατάση PTEN (Phosphatase and tensin homolog). Προσαρμοσμένη από (Vivanco & Sawyers, 2002).

Στο φωσφολιπίδιο PIP₃ προσδένονται ακόμα, μέσω της περιοχής PH, η πρωτεϊνική κινάση PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1) και η υπομονάδα Sin1 του συμπλόκου mTORC2. Η πρόσδεση αυτή δρα ενεργοποιητικά και ακολουθεί φωσφορυλίωση της AKT στο αμινοξύ S473 από τον mTOR (mammalian target of rapamycin) του συμπλόκου mTORC2 που απαιτείται για την πλήρη ενεργοποίηση της ενεργότητας της AKT. Η φωσφορυλίωση στην S473 θέση προετοιμάζει την AKT για περαιτέρω φωσφορυλίωση στην θέση T308 από την

PDK1 (Yuan & Guan, 2015). Η AKT είναι ικανή πλέον να φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα.

Σημαντικοί στόχοι της AKT στο κυτταρόπλασμα είναι οι πρωτεΐνες GSK3, mTOR και IKK. Μέσω της αναστολής της δράσης του παράγοντα GSK3 ενεργοποιείται το μονοπάτι WNT/ β -catenin το οποίο συνεισφέρει στην πολυδυναμία και αναλύεται στο Κεφ. 4.4 (Hemmings & Restuccia, 2012). Η Akt ενεργοποιεί ταυτόχρονα την PI3K κινάση σερίνης/θρεονίνης mTOR καθώς απενεργοποιεί έναν καταστολέα ενός ενεργοποιητή αυτής. Συγκεκριμένα καταστέλλει την πρωτεΐνη TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) η οποία καταστέλλει την GTPάση Rheb η οποία συμβάλλει στην ενεργοποίηση του mTOR (Foster, Yellen, Xu, & Saqcena, 2011). Μέσω της ενεργοποίησης του mTOR εγκαθιδρύεται ένα cross-talk μεταξύ των μονοπατιών PI(3)K/AKT και TGF β . Για την ακρίβεια διατηρείται σε ισορροπία η ενεργοποίηση του συμπλόκου Smad2/3, που δρα καθοδικά της activin A, με τέτοιο τρόπο ώστε να μην οδηγείται το κύτταρο σε διαφοροποίηση προς οριστικό ενδόδερμα. Ειδικότερα, το σύμπλοκο mTORC2 που ενεργοποιείται από το μονοπάτι PI(3)K/AKT φωσφορυλιώνει το ενεργοποιημένο σύμπλοκο Smad2/3 στα κατάλοιπα T220/T179 επιστρατεύοντας τη λιγάση ουβικιτίνης Nedd4L⁸ και οδηγώντας το σε αποδόμηση. Ένα ακόμη στοιχείο που δυνητικά ενισχύει τον ρόλο του FGF στην ισορροπία αυτή είναι η ταχεία διαφοροποίηση που παρατηρείται στα hESCs παρουσία αναστολέων των υποδοχέων FGFR. Έτσι το μονοπάτι TGF β διατηρείται σε ένα επίπεδο ενεργοποίησης που υποστηρίζει την πολυδυναμία αλλά ταυτόχρονα δεν οδηγεί σε διαφοροποίηση (Dvorak et al., 2005) (Yu et al., 2015).

Ακόμα η ενεργοποίηση του mTOR του συμπλόκου mTORC1 προστατεύει την πολυδυναμία καθώς η ενεργότητα του συμπλόκου αυτού είναι απαραίτητη και επάγει την έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας Oct4, Sox2 και NANOG. Η ενεργότητα των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 διατηρείται σε ένα συγκεκριμένο κατώφλι μέσω του πρωτεϊνικού αναστολέα DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) καθώς αυξημένα επίπεδα συνεπάγονται τη διαφοροποιημένη κατάσταση των κυττάρων (Fernandez-Alonso, Bustos, Williams, & Findlay, 2017). Ένας σημαντικός στόχος της AKT στον πυρήνα είναι η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη FOXO1 την οποία αναστέλλει με φωσφορυλίωση και την

⁸ Η λιγάση ουβικιτίνης προσθέτει μόρια ουβικιτίνης σε ένα πολυπεπίδιο το οποίο σημαίνεται με αυτό τον τρόπο για αποδόμηση από το πρωτεάσωμα.

ωθεί σε έξοδο προς το κυτταρόπλασμα, προάγοντας έτσι την κυτταρική επιβίωση (Ornitz & Itoh, 2015).

Ο mTOR στο κύτταρο δρα ως ένας αισθητήρας των θρεπτικών και ενεργειακών επιπέδων των κυττάρων και ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Καθότι η κυτταρική διαίρεση είναι μια ενεργοβόρα διαδικασία με υψηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, το κύτταρο εισέρχεται σε μια παρατεταμένη G1 φάση όταν αυτά δεν επαρκούν. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή έχει ο mTOR ο οποίος απουσία των κατάλληλων συνθηκών αποτρέπει την είσοδο του κυττάρου στη φάση S. Τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έναν ιδίομορφο κυτταρικό κύκλο κατά τον οποίο παρατηρείται μειωμένη φάση G, ενώ το κύτταρο βρίσκεται κυρίως στη φάση S. Συνεπώς η ενεργοποίηση του mTOR είναι πιθανό να συνεισφέρει στην πολυδυναμία μέσω αυτής της λειτουργίας του και σημαντικοί παράγοντες είναι οι κυκλίνες A και E και η κινάση CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2) (Hindley & Philpott, 2013)(Foster et al., 2011).

Το μονοπάτι αυτό είναι αυστηρά ρυθμιζόμενο μέσω παραγόντων που αποφωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν την κινάση AKT καθώς και μέσω ενζύμων που αποφωσφορυλιώνουν την PIP₃ σε PIP₂. Συγκεκριμένα η φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης PP2A (protein phosphatase 2) καταλύει την απόσπαση μιας φωσφορικής ομάδας από το κατάλοιπο T308 της AKT και η PHLPP1/2 (PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase) καταλύει την αποφωσφορυλίωση του αμινοξέος S473. Ακόμη, η φωσφατάση PTEN (Phosphatase and tensin homolog) καταλύει την μετατροπή της PIP₃ σε PIP₂ με υδρόλυση της φωσφορικής ομάδας που εντοπίζεται στη θέση D3 του δακτυλίου ινοσιτόλης (Hemmings & Restuccia, 2012).

Μέσω πειραμάτων παρακολούθησης γεγονότων φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης αλλά και σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης, η οποία είναι και η πιο συχνή, αναδείχθηκαν διάφορα πεπτίδια τα οποία φωσφορυλιώνονται ως απόκριση στον παράγοντα FGF2. Ένα μεγάλο μέρος αυτών ανήκει σε πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στα μονοπάτια PI3K/AKT, MAPK καθώς και Wnt (Zoumaro-Djajoon et al., 2011). Απενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί σε μείωση της έκφρασης δεικτών πολυδυναμίας όπως τα γονίδια *Nanog*, *Oct4* και *Sox2*. Συνεπώς ο FGF2 συνεισφέρει στη διατήρηση της πολυδυναμίας συμμετέχοντας σε αυτά τα τρία μονοπάτια. Είναι όμως ιδιαίτερης σημασίας η παρατήρηση ότι το αναπτυξιακό δυναμικό του κυττάρου εξαρτάται άμεσα από το βαθμό ενεργοποίησης του μονοπατιού καθώς σε πολύ χαμηλά επίπεδα το κύτταρο οδηγείται σε διαφοροποίηση (Chen, Li, & Wang, 2012).

4.3 Μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK

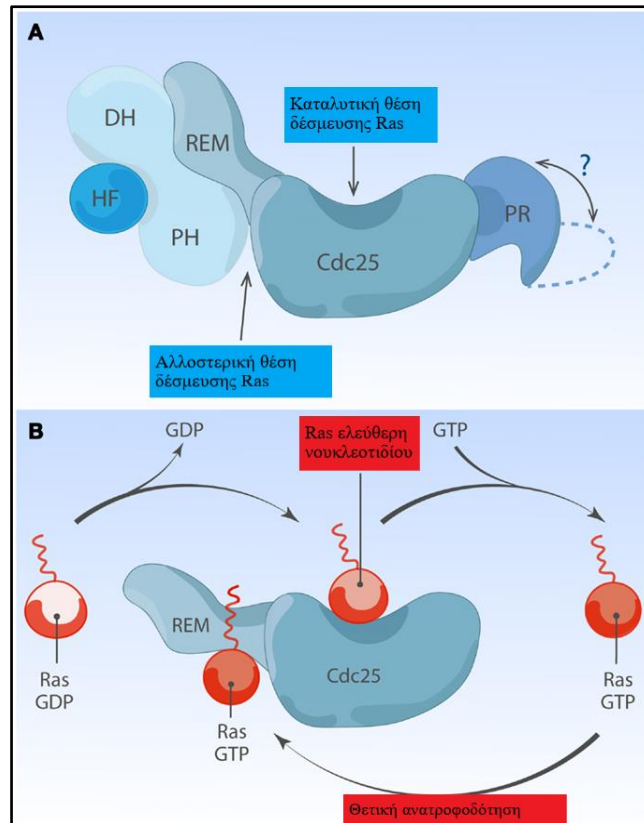
Ο FGF2, όπως προαναφέρθηκε, πυροδοτεί εκτός από το PI3K μονοπάτι και το μονοπάτι των MAPK (mitogen-activated protein kinase) κινασών (Εικ. 4.3.4). Οι MAPK είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών, ειδικών για τα κατάλοιπα σερίνη και θρεονίνη (Ser/Thr-Pro), με συμμετοχή σε ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορα εξωκυττάρια ερεθίσματα όπως αναπτυξιακούς παράγοντες, ορμόνες, κυτοκίνες και στρες. Είναι σημαντικοί ρυθμιστές διάφορων κυτταρικών διεργασιών όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η προσκόλληση, η επιβίωση, η διαφοροποίηση και συμμετέχουν στη νευρική λειτουργία και την ανοσολογική απόκριση. Το μονοπάτι αυτό πυροδοτείται από διάφορους αναπτυξιακούς παράγοντες όπως ο IGF. Έχει διάφορα υποστρώματα στο κύτταρο και ένα μεγάλο μέρος αυτών εντοπίζεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Παρατηρείται υπερενεργοποίησή του σε ένα μεγάλο εύρος καρκίνων. Αυτοί περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA, συν-ενεργοποιητές και συγκαταστολείς, στοιχεία συμπλόκων που τροποποιούν τη χρωματίνη και ιστόνες.

Τα μονοπάτια MAPK είναι υψηλά συντηρημένα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και η πρώτη κινάση MAPK η οποία αναγνωρίστηκε ήταν η Erk1 στα θηλαστικά. Όλα τα μονοπάτια δομούνται από τρεις κινάσες όπου η μια φωσφορυλιώνει την άλλη. Συγκεκριμένα μια MAPK φωσφορυλιώνεται σε δυο κατάλοιπα (Tyr/Thr-Pro) από μια κινάση των MAPK (MKK) η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνεται από μια κινάση των κινασών των MAPK (MKKK). Το μονοπάτι που εκκινείται από αναπτυξιακούς παράγοντες, όπως ο FGF2, περιλαμβάνει τις ERK1/2, MKK1/2 και Raf αντίστοιχα. Στα μονοπάτια που εκκινούνται από μορφογενετικούς παράγοντες και ερεθίσματα στρες συμμετέχουν άλλες κινάσες (Yang, Sharrocks, & Whitmarsh, 2013).

Αρχικά, η πρόσδεση του FGF2 όπως περιγράφηκε στο Κεφ. 4.2 οδηγεί σε διμερισμό του υποδοχέα FGFR που ενεργοποιεί τη δράση τυροσινικής κινάσης που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του. Έπειτα συγκροτείται και ενεργοποιείται το σύμπλοκο Frs2α-Grb2-Shp2 το οποίο μέσω της Grb2 πυροδοτεί μεταξύ άλλων το μονοπάτι MAPK. Η Grb2 μέσω της αμινοτελικής περιοχής SH3 αναγνωρίζει περιοχές του καρβοξυτελικού άκρου των πρωτεϊνών Sos (son of sevenless) οι οποίες είναι πλούσιες σε προλίνη. Στον άνθρωπο εντοπίζονται οι δυο ομόλογες Sos1 και Sos2. Η προσέλκυση της πρωτεΐνης Sos στην

μεμβράνη, όπου βρίσκεται προσδεδεμένη η Grb2, καθιστά εφικτή την αλληλεπίδραση με τα υποστρώματά της. Οι πρωτεΐνες Sos ανήκουν στους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης ή GEFs (guanine nucleotide exchange factors) και ενεργοποιούν ένζυμα που καλούνται GTPάσες. Ειδικότερα, καταλύουν την αποδέσμευση από τις GTPάσες μιας διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) και την δέσμευση μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) καθότι είναι πιο άφθονη σε σχέση με την GDP, καθιστώντας τα με αυτό τον τρόπο ενζυμικά ενεργά.

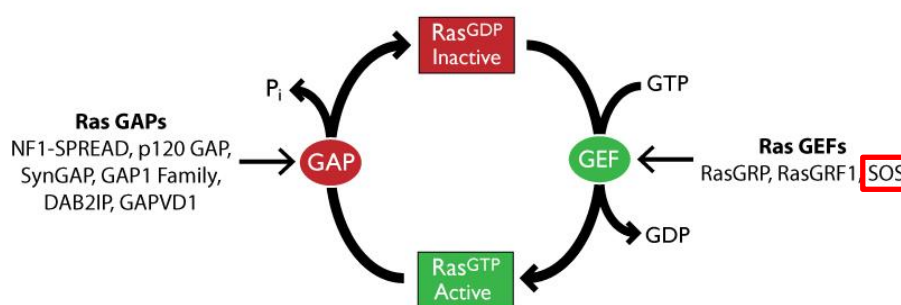
Οι παράγοντες Sos είναι διπλής ειδικότητας καθώς αναγνωρίζουν μέλη των οικογενειών GTPασών Ras και Rac και περιλαμβάνουν, όπως οι περισσότεροι GEFs, πολλές περιοχές που εξυπηρετούν διάφορες λειτουργίες. Στο αμινοτελικό άκρο φέρουν μια περιοχή ομολογίας ιστόνης που συμβάλλει στην αυτοαναστολή (HF) η οποία ακολουθείται από μια περιοχή DH-PH (Dbl/Pleckstrin homology) ειδική για τις Rac, μια περιοχή REM (Ras exchange motif), μια περιοχή ομολογίας CDC25 (CDC25-HD) ειδική για τις Ras και ένα καρβοξυτελικό άκρο πλούσιο σε προλίνη (Εικ 4.3.1) (Bos, Rehmann, & Wittinghofer, 2007) (Jun, Rubio, & Roose, 2013).



Εικόνα 4.3.1. Δομή και λειτουργία του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Sos. A) Μοντέλο της ανενεργής μορφής του παράγοντα Sos ο οποίος φέρει τις έξι διακριτές περιοχές HF (Histone-like fold), DH (Dbl homology), PH (Pleckstrin homology), REM (Ras exchanging motif), Cdc25 (Cdc25 homology domain) και PR (proline rich region). Φέρει μια καταλυτική θέση πρόσδεσης της Ras και μια αλλοστερική στην οποία όταν προσδεθεί Ras-GTP η καταλυτική ενεργότητα αυξάνεται κατά 10 φορές σχηματίζοντας έτσι έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης. B) Ras-GDP προσδένεται στην καταλυτική θέση πρόσδεσης που εντοπίζεται στην περιοχή Cdc25 με ταυτόχρονη απομάκρυνση του νουκλεοτιδίου GDP. Στην Ras που απελευθερώνεται προστίθεται το νουκλεοτίδιο GTP το οποίο υπάρχει σε αφθονία σε σχέση με το GDP. Η ενεργότητα του Sos αυξάνεται με την πρόσδεση Ras-GTP στην αλλοστερική θέση πρόσδεσης εγκαθιδρύοντας έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης. Προσαρμοσμένη από (Jun et al., 2013)

Μέσω της δράσης του παράγοντα Sos λοιπόν προκύπτει η ενεργοποιημένη μορφή της Ras (H-,K-,N-Ras), Ras-GTP η οποία μπορεί να προσδέσει υποστρώματα. Η Ras είναι μια μικρή GTPάση η οποία είναι προσδεδεμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ύστερα από προσθήκη πρενυλο-ομάδων που τις «αγκυρώνουν» σε αυτή. Δρα σαν δυαδικός μοριακός διακόπτης στην μεταγωγή σήματος και εντοπίζεται σε δύο καταστάσεις. Στην ανενεργή κατάσταση είναι προσδεδεμένος σε GDP και δεν μπορεί να προσδεθεί σε υποστρώματα ενώ

στην ενεργή είναι προσδεμένος με GTP και έχει τη δυνατότητα να προσδεθεί με υποστρώματα. Οι δυο καταστάσεις εναλλάσσονται με την δράση των GEFs και GAPs (GTP-ase activating protein). Η ενδογενής δραστηριότητα GTPάσης των Ras επιταχύνεται μέσω των GAPs καθώς και αυτές καταλύουν την υδρόλυση μιας φωσφορικής ομάδας από τις Ras-GTP προς παραγωγή της Ras-GDP, δηλαδή της ανενεργής μορφής (Εικ. 4.3.2) (Bos et al., 2007). Η Ras επιστρατεύει και ενεργοποιεί πρωτεΐνες-τελεστές και στην συγκεκριμένη περίπτωση ενεργοποιεί την MKKK Raf.



Εικόνα 4.3.2. Ο κύκλος της GTPάσης Ras. Η Ras στην ανενεργή της μορφή (inactive) είναι προσδεμένη με το νουκλεοτίδιο GDP. Ένας παράγοντας GEF, όπως η πρωτεΐνη Sos, διευκολύνει την απομάκρυνση του GDP και την ενσωμάτωση του GDP μετατρέποντας την GTPάση στην ενεργή (active) της μορφή ως Ras-GTP. Η Ras επιστρέφει στην ανενεργή κατάσταση μέσω παραγόντων GAP οι οποίοι απομακρύνουν μια φωσφορική ομάδα μέσω υδρόλυσης. Η κατάσταση στην οποία βρίσκονται οι Ras εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στις ενεργότητες των GEF και GAP (Cytoskeleton News).

Η οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης Raf αποτελείται από τις τρεις ισομορφές A-Raf, B-Raf και C-Raf (Raf-1). Η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρείται στον B-Raf και έπειτα ακολουθούν κατά σειρά ο C-Raf και ο A-Raf. Οι ισομορφές αυτές φέρουν τρεις διατηρημένες κοινές περιοχές CR1-3 και περιέχουν αρκετές ρυθμιστικές θέσεις φωσφορυλίωσης. Η περιοχή CR1 είναι η περιοχή πρόσδεσης στην Ras και η περιοχή CR2 περιέχει το κατάλοιπο S259 το οποίο μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την AKT ή την PKA με αποτέλεσμα την αρνητική ρύθμιση. Οι δυο περιοχές μαζί αποτελούν τη ρυθμιστική επικράτεια των Raf. Ενώ η CR3 περιοχή φέρει την δραστηριότητα κινάσης που ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης και τυροσίνης S338, Y340 και Y341 (Εικ. 4.3.3). Οι Raf εντοπίζονται προσδεμένες στη μεμβράνη και βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση όντας φωσφορυλιωμένες στα αμινοξέα S259 και S621 και προσδεμένες με μια σαπερονίνη που τις διατηρεί σε ανενεργή διάταξη (Sridhar, Hedley, & Siu, 2005).

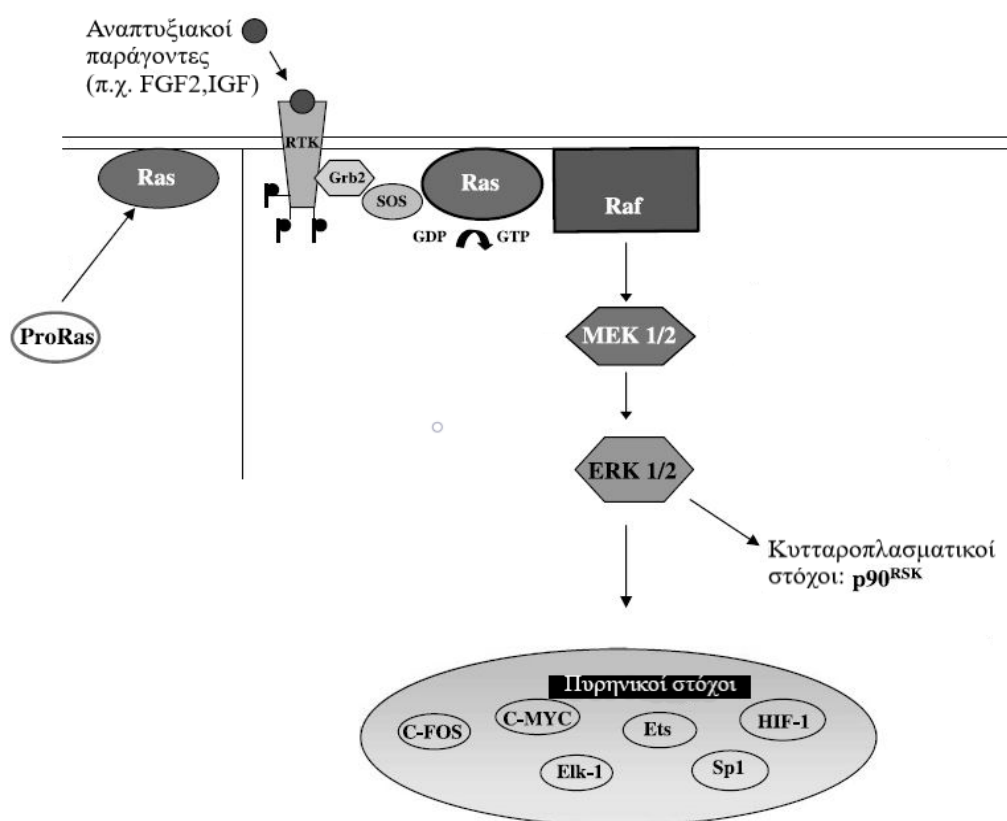


Εικόνα 4.3.3. Δομή της πρωτεϊνικής κινάσης Raf-1. Όπως και οι 3 ισομορφές των RAF, έτσι και ο Raf-1 (C-Raf) φέρει τρεις διακριτές περιοχές. Η CR1 περιοχή που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο φέρει μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (CRD) και την περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα Ras (RBD). Η ενδιάμεση CR2 περιοχή αποτελεί σημείο ρύθμισης του μορίου καθώς μπορεί να φωσφορυλιωθεί ανασταλτικά στο κατάλοιπο S259 από τις πρωτεΐνες AKT και PKA. Η περιοχή κινάσης (kinase domain) εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο στην περιοχή CR3 και ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση των καταλοίπων S338 και Y340/341. Προσαρμοσμένη από (Leicht et al., 2007)

Η ενεργοποιημένη Raf δρα ως κινάση των κινασών MAPK, και συγκεκριμένα των κινασών MEK1 και MEK2 οι οποίες έχουν ομολογία αλληλουχίας κατά 80%. Η ενεργότητα των κινασών θρεονίνης/τυροσίνης MEK αυξάνεται περισσότερο από 7.000 φορές όταν φωσφορυλιωθούν από την Raf. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται σε διαδοχικά κατάλοιπα σερίνης στον δακτύλιο ενεργοποίησης (MEK1 S218/222 και MEK2 S222/226). Στην ανενεργή τους μορφή είναι εντοπισμένες στο κυτταρόπλασμα και προσδεδεμένες στην ανενεργή MAPK ERK. Στο αμινοτελικό της άκρο διακρίνονται μια αλληλουχία πυρηνικής εξαγωγής, μια ανασταλτική περιοχή και η περιοχή πρόσδεσης της ERK. Παράλληλα στο μόριο υπάρχει και μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνη η οποία ενισχύει την σύνδεση MEK-ERK έπειτα από φωσφορυλίωση. Στο καρβοξυτελικό άκρο διατηρείται ένα μοτίβο KDD (Lys-Asp-Asp) που προσδίδει τη ενεργότητα κινάσης με διπλή ειδικότητα για αμινοξέα θρεονίνης και τυροσίνης που διαμεσολαβεί την καθοδική ενεργοποίηση του ERK (Gentry, Samatar, & Der, 2013).

Οι κινάσες ERK1/2 αποτελούν μέλη της οικογένειας των κινασών MAPK και είναι ισομορφές με ομολογία αλληλουχίας κατά 86%. Ενεργοποιούνται ύστερα από δυο φωσφορυλιώσεις από την MEK1/2 στα κατάλοιπα T183 και Y185 του συντηρημένου μοτίβου Thr-Glu-Tyr των ERK1/2. Στην αλληλουχία τους φέρουν επίσης δυο περιοχές που καλούνται DRS (D-recruitment site) και FRS (F-recruitment site) οι οποίες επιστρατεύουν τις αντίστοιχες περιοχές πρόσδεσης, D και F, των υποστρωμάτων τους. Οι ERK1/2 είναι κινάσες που κατευθύνονται από κατάλοιπα προλίνης και φωσφορυλιώνουν υποστρώματα τα οποία φέρουν την αλληλουχία Pro-X-Ser/Thr-Pro sequence (Gentry et al., 2013).

Η φωσφορυλίωση των ERK οδηγεί σε μια αλλαγή στερεοδιάταξης η οποία επάγει των διμερισμό τους και επιτρέπει την πρόσδεση υποστρώματος, ATP και άλλων πρωτεϊνών. Δυο σημαντικές κατηγορίες αυτών των πρωτεϊνών είναι εκείνες που υποβοηθούν την είσοδο στον πυρήνα, όπως η πρωτεΐνη πυρηνικής μεταφοράς Imp7, και εκείνες οι οποίες αποτρέπουν την αποφωσφορυλίωση τους από τις φωσφατάσες DUSPs (Dual-specificity phosphatases), όπως η Mxi2. Η διμερής μορφή των ERK είναι ικανή να εισέρχεται στον πυρήνα και να αλληλεπιδρά με τα πυρηνικά της υποστρώματα μεταβάλλοντας την γονιδιακή μεταγραφή, ενώ σημαντικές πρωτεΐνες στόχοι εντοπίζονται και στο κυτταρόπλασμα (Gentry et al., 2013) (Yang et al., 2013).

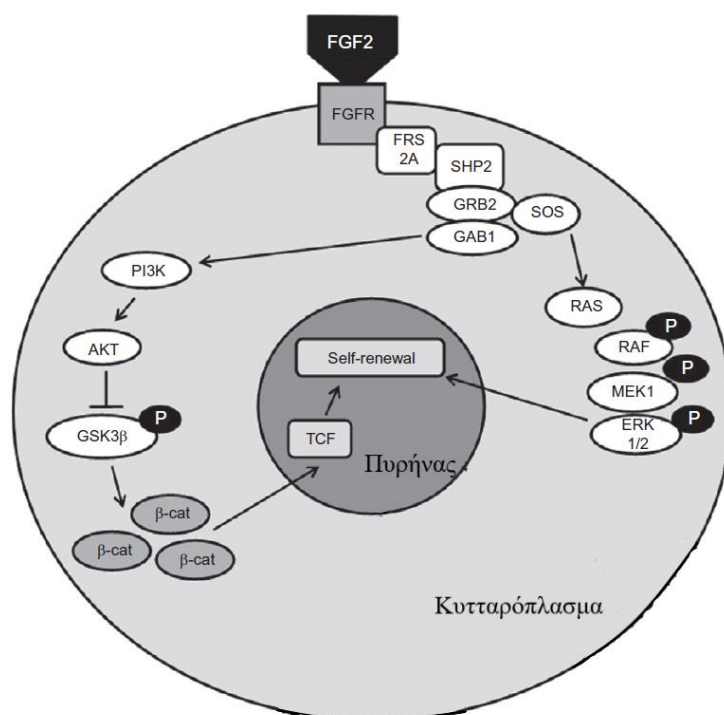


Εικόνα 4.3.4. Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK και οι πρωτεΐνες στόχοι της κινάσης ERK στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Προσαρμοσμένη από (Sridhar et al., 2005).

Στο κυτταρόπλασμα, οι ERK ενεργοποιούν τη ριβοσωμική κινάση s6 (RSK ή p90^{sk}) που εισέρχεται στον πυρήνα και ρυθμίζει αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες με ρόλους στην κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική κινητικότητα. Οι σημαντικότεροι στόχοι του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK στον πυρήνα είναι οι πρωτεΐνες c-Fos, c-Myc, Elk1 και SP1. Η ERK ενεργοποιεί με φωσφορυλίωση στον πυρήνα την πρωτεΐνη

Elk η οποία ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων ETS (E26 transformation-specific) και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια TCF (ternary complex factors). Δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής του πρωτο-ογκογονιδίου *c-Fos*, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην έκφραση πρωτεϊνών κυτταρικής ανάπτυξης.

Η πρωτεΐνη c-Fos διατηρείται στην ενεργή της μορφή όταν είναι φωσφορυλιωμένη ταυτόχρονα σε δυο κατάλοιπα σερίνης από τις κινάσες ERK1/2 και RSK (Whitmarsh, 2007)(Gentry et al., 2013). Το γονίδιο *Myc* είναι επίσης ένα πρωτοογκογονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από τις ERK και οι οποίοι σχετίζονται με τη διατήρηση της πολυδυναμίας και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (βλ. Κεφ. 5.2). Τέλος, η SP-1 (specificity protein 1) πρωτεΐνη είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας δακτυλίου ψευδαργύρου που προσδένεται σε μοτίβα πλούσια σε γουανίνη και κυτοσίνη και ο οποίος όταν ενεργοποιηθεί από την ERK προσδένεται μαζί με συμπαράγοντες στον υποκινητή του παράγοντα πολυδυναμίας Nanog και επάγει τη μεταγραφή του (Saunders, Faiola, & Wang, 2013). Η σημασία του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK καταδεικνύεται και στα αποτελέσματα πειραμάτων σε ERK2 knockdown hESCs όπου παρατηρείται μεταβολή της τυπικής μορφολογίας των ESCs καθώς και μείωση των δεικτών πολυδυναμίας όπως οι Nanog, TRA1-60, TRA1-80 και SSEA4 (Ma, Chen, & Chen, 2016).



Εικόνα 4.3.5. Τα μονοπάτια PI3K/AKT και Ras/Raf/MEK/ERK πυροδοτούνται από τον παράγοντα FGF2. Προσαρμοσμένη από (Suwinska & Ciemerych, 2011).

4.4 Μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης

Τόσο στα mESCs όσο και στα hESCs έχει βρεθεί ότι το μονοπάτι Wnt (Εικ. 4.4.1) συνεισφέρει στην αυτο-ανανέωση και τη διατήρηση της πολυδυναμίας καθώς μέσω μιας πρωτεΐνης που καλείται β -κατενίνη και η οποία μπορεί να δράσει στον πυρήνα ως μεταγραφικός παράγοντας, επάγει την έκφραση γονιδίων με ρόλο στην πολυδυναμία. Ανάμεσα στις διάφορες διαδικασίες που ρυθμίζει περιλαμβάνονται η διαφοροποίηση, η κινητικότητα και η πολικότητα των κυττάρων καθώς και η οργανογένεση κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Παρότι υπάρχουν μερικά αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη συνεισφορά του μονοπατιού στα hESCs, σε μια έρευνα του 2016, βρέθηκε ότι ο ρόλος του στην πολυδυναμία περιορίζεται περισσότερο στην μετάβαση από τη βασική κατάσταση πολυδυναμίας (naïve) στην ενεργοποιημένη (primed) και στη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης με αυτοκρινή τρόπο. Αντίθετα, η έκφραση του παράγοντα Wnt μειώνεται αρκετά σε primed hESCs και η προσθήκη του σε μια καλλιέργεια φαίνεται να συνεισφέρει στη δέσμευση προς συγκεκριμένες αναπτυξιακές κατευθύνσεις.(Z. Xu et al., 2016).

Οι πρωτεΐνες Wnt αποτελούν μια οικογένεια εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών μεταγωγής σήματος με συμβολή σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Στα θηλαστικά υπάρχουν 19 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν τις εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες Wnt οι οποίες συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια. Εκτός από το **κανονικό μονοπάτι β -κατενίνης** το οποίο αναπτύσσεται σε αυτό το υποκεφάλαιο, υπάρχουν και δυο μη κανονικά μονοπάτια τα οποία είναι γνωστά ως μονοπάτια Planar Cell Polarity (PCP) και Wnt/Calcium (Komiyama & Habas, 2008). Οι Wnt υφίστανται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο πριν εκκριθούν με σημαντικότερες την παλμιτοποίηση και τη γλυκοζυλίωση. Από αναλύσεις και μοντελοποίηση της αλληλουχίας τους προκύπτει ότι έχουν σφαιρική δομή και η αλληλουχία τους, παρότι δεν φέρει οργανωμένες περιοχές, χαρακτηρίζεται από την παρουσία 23-25 υψηλά συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης. Κάποια από αυτά τα κατάλοιπα συμμετέχουν στην δημιουργία ενδό- και δια-μοριακών δισουλφιδικών δεσμών που συμμετέχουν στην αναδίπλωση και στο ολιγομερισμό του μορίου, αντίστοιχα (Coudreuse & Korswagen, 2007).

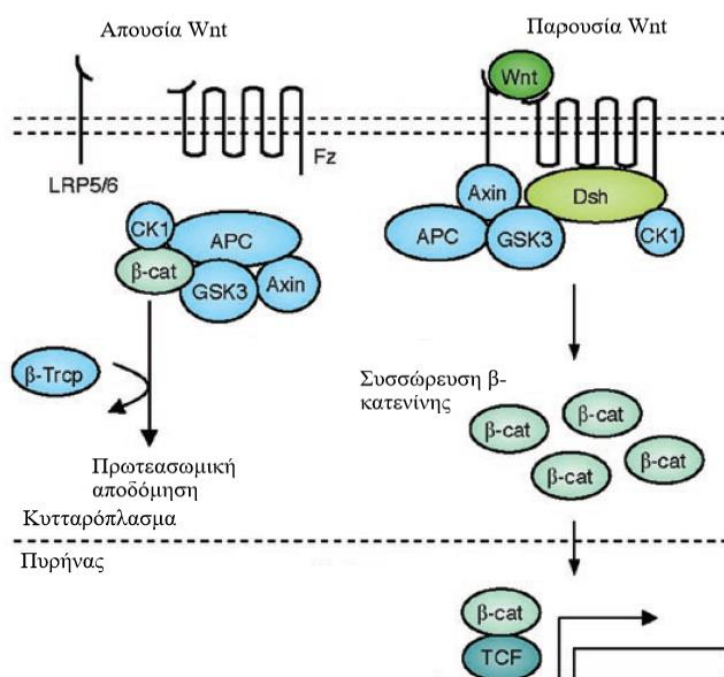
Μετά την έκκριση στην εξωκυττάρια μήτρα, οι Wnt μπορούν να προσδεθούν στους υποδοχείς τους και η διάχυσή τους περιορίζεται από τις πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής μεμβράνης HSPGs (βλ. Κεφ. 4.2) οι οποίες τις σταθεροποιούν και ρυθμίζουν την ικανότητά

τους για σηματοδότηση. Αναγνωρίζουν τους υποδοχείς Frizzled μέσω ενός λιπιδικού τμήματος καθώς και τον LRP5/6 (lipoprotein receptor-related proteins 5/6) που δρα ως συν-υποδοχέας (Willert & Nusse, 2012). Το όνομα των υποδοχέων Frizzled προέκυψε από το ομώνυμο γονίδιο *frizzled* του είδους *Drosophila melanogaster* το οποίο σχετίζεται με την πολικότητα των κυττάρων. Στη δομή τους φέρουν επτά διαμεμβρανικά τμήματα και συμμετέχουν στη μεταγωγή πολλών σημάτων με ρόλο τόσο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και στους ενήλικες οργανισμούς. Ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G οι οποίες δρουν ως GTPάσες (Huang & Klein, 2004).

Η πρόσδεση του σήματος Wnt στον υποδοχέα Frizzled οδηγεί στην φωσφορυλίωση του συν-υποδοχέα LRP5/6 και την πρόσδεση σε αυτόν της πρωτεΐνης Axin. Η Axin δρα ως πρωτεΐνη ικρίωμα που εντοπίζεται στο σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης αλλά και στο σύμπλοκο προστασίας της β-κατενίνης στον LRP5/6. Η απουσία ενός εξωκυττάριου σήματος Wnt επιτρέπει στην Axin να είναι ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα και να σχηματίζει σύμπλοκα καταστροφής της β-κατενίνης. Το σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης αποτελείται από τις Axin και APC (adenomatosis polyposis coli) και τα ένζυμα CK1α (casein kinase1α) και GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) (Stamos & Weis, 2013). Το γονίδιο APC είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση, τη διαίρεση, την πολικότητα και στη μορφογένεση. Επίσης είναι η μοναδική πρωτεΐνη μέχρι τώρα στην οποία έχουν βρεθεί πολλαπλές θέσεις δέσμευσης της β-κατενίνης. Η CK1 είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ρυθμίζει την μεταγωγή σήματος. Τέλος η GSK-3 είναι επίσης μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και μαζί με την CK1α φωσφορυλιώνουν την β-κατενίνη. Αρχικά η CK1α φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο S45 και έπειτα η GSK-3 διαδοχικά τα κατάλοιπα T41, S37 και S33. Εκτός από την β-κατενίνη φωσφορυλιώνουν και την APC, αυξάνοντας έτσι δραματικά την ικανότητά της να προσδέσει τη β-κατενίνη. Η διαδοχική φωσφορυλίωση της β-κατενίνης έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτινυλίωσή της από την E3 λιγάση ουβικιτίνης β-TrCP και συνεπώς την αποδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα με πρωτεόλυση (W. Xu & Kimelman, 2007).

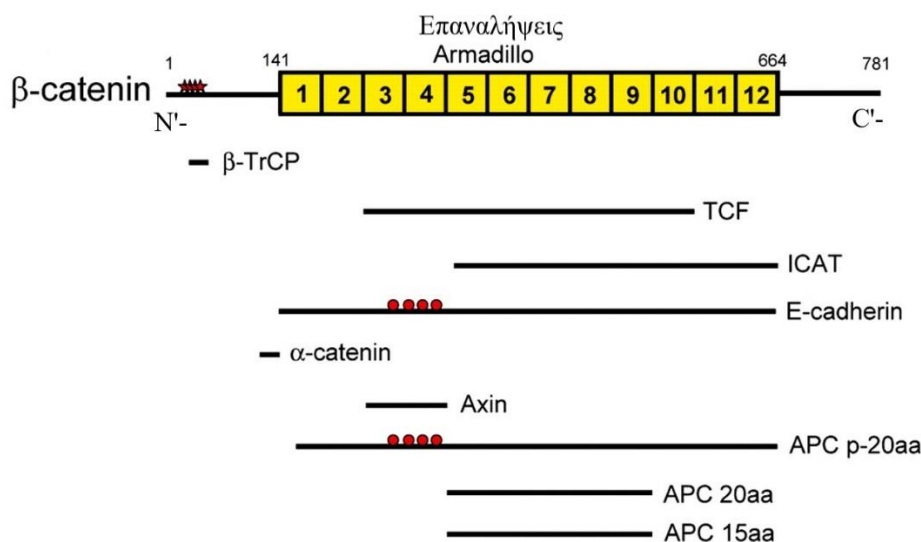
Παρουσία των Wnt εκκινείται το κανονικό μονοπάτι β-κατενίνης κατά το οποίο η Axin δεσμεύεται από τον LPR και δημιουργείται ένα σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες GSK-3 και Dsh (Dishevelled). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η β-κατενίνη να μην φωσφορυλιώνεται και συνεπώς να μην καταστρέφεται. Η πρωτεΐνη Dsh είναι μια φωσφοπρωτεΐνη που περιέχει τις τρεις διακριτές επικράτειες DIX, PDZ και DEP εκ των οποίων οι δυο πρώτες θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικές για την μεταγωγή του σήματος. Η Dsh ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση της Axin

αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν έχει εξακριβωθεί. Είναι γνωστό όμως ότι μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την CK1 η οποία μάλιστα αποκόπτεται από το σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης και προσδένεται σε αυτή παρουσία των Wnt. Η τροποποίηση αυτή επιδρά όχι μόνο στην ενεργότητά της αλλά και στον υποκυτταρικό εντοπισμό της καθώς απουσία σημάτων Wnt εντοπίζεται στον πυρήνα. Εκτός από την αναστολή της GSK-3 άμεσα από την Dsh έχουν προταθεί διάφοροι άλλοι μηχανισμοί που εξηγούν αυτή την απενεργοποίηση της δραστηριότητάς της. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ταχεία απομάκρυνση της APC από το σύμπλοκο Axin (η APC ενισχύει τη δραστηριότητα της GSK-3), η άμεση αναστολή της GSK-3 από το φωσφορυλιωμένο καρβοξυτελικό άκρο των LRP5/6 καθώς και η απομόνωση της GSK-3 σε ενδοσώματα. Ανεξαρτήτως όμως του μηχανισμού, η καταστολή της GSK-3 αποτρέπει την αποδόμησή της με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και μπορεί να μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Komiya & Habas, 2008).



Εικόνα 4.4.1. Κανονικό μονοπάτι Wnt. Α) Απουσία του παράγοντα Wnt οι πρωτεΐνες Axin, APC, CK1 και GSK3 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης η οποία αρχικά φωσφορυλιώνεται και έπειτα από ουβικιτινυλίωση αποδομείται στο πρωτεάσωμα. Β) Η ρόσδεση της Wnt στον υποδοχέα Fz/LRP οδηγεί σε επιστράτευση και πρόσδεση της Axin μαζί με τις APC και GSK3. Η δράση της GSK3 καταστέλλεται, η β-κατενίνη δεν αποδομείται και αφότου συσσωρευθεί στο κυτταρόπλασμα εισέρχεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής σε συνέργεια με παράγοντες TCF. Προσαρμοσμένη από (Komiya & Habas, 2008)

Η β-κατενίνη είναι μια πρωτεΐνη με διπλή λειτουργία καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση και το συντονισμό της διακυτταρικής προσκόλλησης και της γονιδιακής μεταγραφής. Στο αμινοτελικό της άκρο φέρει τη θέση πρόσδεσης στις α-κατενίνης καθώς και τα κατάλοιπα τα οποία φωσφορυλιώνουν οι κινάσες GSK-3 και CK1. Αυτά αναγνωρίζονται από την λιγάση β-TrCP μέσω ενός μοτίβου που φέρει και το οποίο καλείται F-box. Συνεπώς η περιοχή αυτή διαμεσολαβεί την αποδόμησή της. Το αμινοτελικό άκρο σε συνδυασμό με το καρβοξυτελικό φέρουν περιοχές με ισχυρή λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής. Κεντρικά στο μόριο της β-κατενίνης, εντοπίζονται 12 συγκεκριμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες περίπου 40 αμινοξέων που καλούνται επαναλήψεις armadillo. Η κάθε επανάληψη αποτελείται από δυο α-έλικες σε δομή φουρκέτας. Το κεντρικό μέρος είναι το πιο συντηρημένο και είναι η θέση στην οποία προσδέονται τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά η β-κατενίνη, όπως οι Axin, APC και Tcf. Μάλιστα, οι θέσεις πρόσδεσης αυτών είναι ως επί το πλείστον αλληλοεπικαλυπτόμενες και δεν είναι εφικτή η ταυτόχρονη πρόσδεσή τους (Εικ. 4.4.2) (W. Xu & Kimelman, 2007).



Εικόνα 4.3.2. Η δομή της β-κατενίνης και οι θέσεις πρόσδεσης διάφορων προσδετών της. (W. Xu & Kimelman, 2007)

Η β-κατενίνη, μετά την απενεργοποίηση του GSK-3, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και παρότι δε φέρει αλληλουχίες πυρηνικής εισόδου και εξόδου, με έναν μη χαρακτηρισμένο μηχανισμό, εισέρχεται στον πυρήνα. Εκεί εκτοπίζει την πρωτεΐνη TLE (transducin-like enhancer) η οποία λειτουργεί ως συγκαταστολέας της γονιδιακής μεταγραφής

μαζί με παράγοντες της οικογένειας Tcf/Lef (T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor). Οι παράγοντες αυτοί δρουν ως καταστολείς παρουσία συγκαταστολέων και ως ενεργοποιητές παρουσία συν-ενεργοποιητών, όπως η β-κατενίνη. Ανήκουν στην οικογένεια των παραγόντων HMGB (high-mobility group DNA-binding protein) και όλοι φέρουν μια υψηλά συντηρημένη αλληλουχία η οποία καλείται HMG box καθώς και ένα μικρό μοτίβο βασικών αμινοξέων (βασική ουρά). Αυτές οι δυο περιοχές μαζί αποτελούν την HMG DNA-προσδένουσα επικράτεια (HMG DBD). Η περιοχή HMG προσδίδει ειδικότητα στην πρόσδεση του DNA και αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-SCTTTGATS-3', ενώ ταυτόχρονα μεταβάλλει την αρχιτεκτονική του DNA προκαλώντας την κάμψη του. Η μικρή βασική ουρά εντοπίζεται 9 κατάλοιπα μετά την αλληλουχία HMG box προς το καρβοξυτελικό άκρο και εξυπηρετεί δύο σκοπούς. Αφενός ενισχύει την πρόσδεση στο DNA καθώς αλληλεπιδρά με το θετικά φορτισμένο τμήμα του DNA και αφετέρου λειτουργεί ως ισχυρό σήμα πυρηνικής εντόπισης για αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες πυρηνικής μεταφοράς (importins) (Cadigan & Waterman, 2012) (Komiya & Habas, 2008).

Εκτός από την περιοχή HMG, οι TCF φέρουν μια θέση πρόσδεσης της β-κατενίνης στο αμινοτελικό άκρο. Ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται μια μικρή, υψηλά συντηρημένη, περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη καθώς και σε βασικά και αρωματικά αμινοξέα. Η αλληλουχία αυτή έχει επίσης τη δυνατότητα δέσμευσης DNA όπως και η αλληλουχία HMG box. Ονομάζεται C clamp καθότι για τη δέσμευση του DNA είναι απαραίτητη η παρουσία τεσσάρων καταλοίπων κυστεΐνης. Τέλος, η πέμπτη διακριτή περιοχή των TCF είναι μια θέση στην οποία προσδένονται συγκαταστολείς της γονιδιακής μεταγραφής της οικογένειας Gro/TLE. Η περιοχή αυτή ονομάζεται GBS, εντοπίζεται στη μέση της αλληλουχίας των TCF και αναγνωρίζεται από υψηλά συντηρημένα μοτίβα Q τα οποία είναι πλούσια σε γλουταμίνη και τα οποία εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο των Gro/TLE (Cadigan & Waterman, 2012).

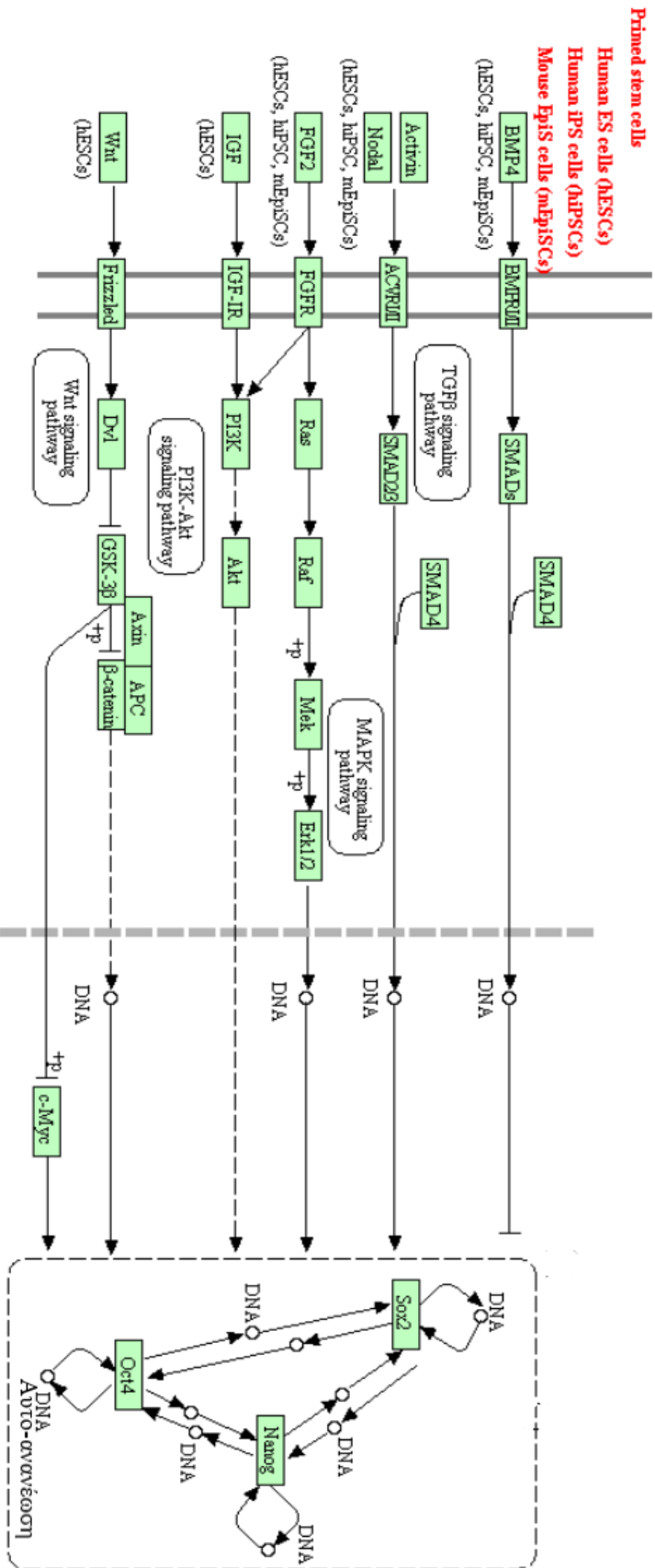


Εικόνα 4.3.3 Δομή των παραγόντων TCF. Διακρίνονται πέντε περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται η θέση δέσμευσης β-κατενίνης, η περιοχή HMG, η GBS, η C clamp, και η βασική ουρά. Προσαρμοσμένη από (Cadigan & Waterman, 2012)

Μετά την πρόσδεση της β-κατενίνης στους παράγοντες Tcf, ενεργοποιούν σε συνέργεια την έκφραση των γονιδίων που συμβάλλουν στη διατήρηση της πολυδυναμίας και στα οποία είναι προσδεδεμένα, όπως τα *Oct4*, *Nanog* και *Sox2*. Ακόμη μεταβάλλεται η έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και των φάσεων, ένα στοιχείο το οποίο όπως προαναφέρθηκε στο Κεφ. 4.2 έχει πιθανό ρόλο στην πολυδυναμία. Ταυτόχρονα επάγεται η έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε μηχανισμούς ρύθμισης του μονοπατιού όπως ο εκκρινόμενος αναστολέας Dkk1 (Dickkopf 1) που προσδέεται στους υποδοχείς LRP5/6 αποτρέποντας τη μεταγωγή σήματος από το Wnt καθώς και ενδοκυτταρικούς αναστολείς όπως η Axin 2 που έχει παρόμοια δράση με την Axin στην αποδόμηση της β-κατενίνης. Συνεπώς και αυτό το μονοπάτι ρυθμίζεται μέσω ανατροφοδοτικών μηχανισμών (Bhavanasi & Klein, 2016). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το μονοπάτι Wnt έχει σημαντικό ρόλο και στη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και η πορεία που θα ακολουθήσει το κύτταρο εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία και άλλων εξωγενών σημάτων όπως ο Fgf2 (Ding et al., 2010).

Επιπρόσθετα, με την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης GSK3, αποτρέπεται η αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης c-Myc στα PSCs. Η GSK-3 φωσφορυλιώνει φυσιολογικά την c-Myc στο κατάλοιπο Thr-58 με αποτέλεσμα να προστίθενται ομάδες ουβικιτίνης και να οδηγείται σε πρωτεασωματική αποδόμηση (Gregory, Qi, & Hann, 2003). Συνεπώς, με αναστολή της GSK-3 η c-Myc παραμένει στο κύτταρο και μπορεί να δράσει στον πυρήνα ως μεταγραφικός παράγοντας. Οι γονιδιακοί στόχοι της, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 4.3, έχουν σημαντικό ρόλο στην πολυδυναμία και παράλληλα διαμεσολαβεί τη μεταγραφική καταστολή των ανταγωνιστών Wnt μέσω της προσέλευσης, στα γονίδια αυτών, του συμπλόκου PRC2 (polycomb repressive complex 2). Το σύμπλοκο αυτό αποσιωπεί τη γονιδιακή έκφραση καθώς δρα ως μεθυλοτρανσφεράση στις ιστόνες, με συχνότερη τροποποίηση την κατασταλτική τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 27 (H3K27me3) (Fagnocchi et al., 2016). Θεωρείται μάλιστα ότι γενικότερα μέσω της δράσης της προκαλεί τροποποιήσεις στις ιστόνες του DNA καθιστώντας γενομικές περιοχές λιγότερο ή περισσότερο προσβάσιμες για μεταγραφή (Orkin et al., 2008). Η επακόλουθη ενίσχυση της αυτοκρινούς οδού Wnt/β-κατενίνη προκαλεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας Myc, σχηματίζοντας έτσι έναν θετικό κύκλο ανατροφοδότησης (Fagnocchi et al., 2016).

Σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης της πολυδυναμίας σε hESCs



Ανασκόπηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που συνεισφέρουν στην πολυδυναμία των ανθρώπινων ESCs. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα τέσσερα μονοπάτια TGFβ, PI(3)K/AKT, Ras/Raf/Mek/Erk και Wnt/β-κατενίνη. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών οδηγεί στην επακόλουθη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών τελεστών Smad2/3/4, Akt, Erk και β-κατενίνη αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την ικανότητα να επιδρούν στον πυρήνα και να ετάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία. Υπόμνημα του χάρτη περιλαμβάνεται στο Παράρτημα. Πηγή: KEGG Pathway Database

5. ΣΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΤΩΝ ESCs ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ

5.1 Μονοπάτι TGFβ

Στον ποντικό, αλλά όχι στον άνθρωπο, ο παράγοντας **BMP4** (Bone morphogenetic protein 4) συμβάλλει στη διατήρηση της πολυδυναμίας με την ενεργοποίηση του μονοπατιού TGFβ με τρόπο αντίστοιχο με αυτόν που περιγράφηκε στο Κεφ. 4.1 για τον παράγοντα activin A. Η BMP4 ανήκει στους παράγοντες TGFβ και συνεπώς φέρει κάποια κοινά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, μετάγει το σήμα μέσω πρόσδεσης σε δυο υποδοχείς τύπου I και δύο υποδοχείς τύπου II. Επίσης, όπως και η activin A, φέρει έξι κατάλοιπα κυστεΐνης σε σχηματισμό θηλιάς και ένα κατάλοιπο κυστεΐνης για διμερισμό μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Τέλος, πριν την έκκριση της, περνάει από μια διαδικασία ωρίμανσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σωμάτιο Golgi και εξέρχεται ως διμερές (Rahman, Akhtar, Jamil, Banik, & Asaduzzaman, 2015).

Ο διμερής BMP4 προσδένεται αρχικά στον υποδοχέα BMPR-II ο οποίος είναι πάντα ενεργός και φέρει ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Ιδιαίτερο στοιχείο της δομής του είναι η καρβοξυτελική ουρά που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η οποία περιέχει περίπου 530 αμινοξέα μετά την περιοχή της κινάσης. Η αλληλουχία αυτή θεωρείται ότι είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη ρύθμιση των λειτουργιών των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Αφότου ενεργοποιηθεί ο BMPR-II, επιστρατεύει και διμερίζεται με τον BMPR-I αφότου τον φωσφορυλιώσει σε μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης-σερίνης. Ο BMPR-II περιέχει το υψηλά συντηρημένο μοτίβο -TTSGSGSG- στην κυτταροπλασματική του πλευρά, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Rahman et al., 2015).

Η πρόσδεση των BMP4 οδηγεί σε ενεργοποίηση των υποδοχέων τους οι οποίοι μέσω της ενζυμικής τους ενεργότητας ενεργοποιούν τους κύριους παράγοντες μεταγωγής τους σήματος οι οποίοι καλούνται R-Smad (receptor-regulated) και περιλαμβάνουν τις Smad1, Smad5 και Smad8. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ανενεργών R-Smad με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς υποβοηθάτε αρκετές φορές από διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες δρουν ως προσαρμογείς ή ικρίωματα, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη SARA. Οι R-Smad φέρουν στη δομή τους τις δυο διακριτές περιοχές MH1 (Mad homology) και MH2 οι οποίες ενώνονται με

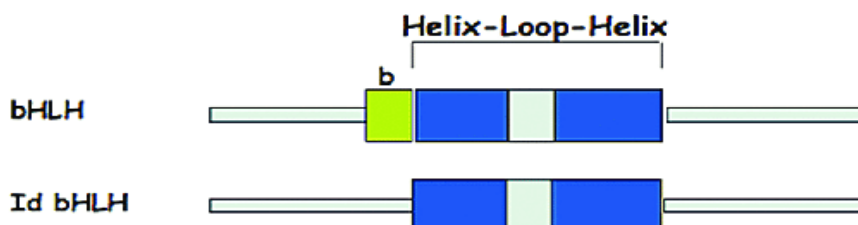
ένα συνδεδετικό τμήμα το οποίο είναι πλούσιο σε αμινοξέα προλίνης. Μέσω της υψηλά συντηρημένης περιοχής MH2 αναγνωρίζουν τον υποδοχέα BMPR-I και φωσφορυλιώνονται στο καρβοξυτελικό τους μοτίβο -SSXS-. Η ίδια περιοχή είναι απαραίτητη για τον ολιγομερισμό των Smad, την αλληλεπίδραση με την Smad4 καθώς και την αναγνώριση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών-προσαρμογέων και μεταγραφικών παραγόντων. Η περιοχή MH1 είναι επίσης υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στις R-Smad και co-Smad και είναι απαραίτητη για την εισαγωγή των Smad στον πυρήνα καθώς σε αυτή περιέχεται η αλληλουχία-σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS-nuclear localization signal) και αποτελεί το σημείο πρόσδεσης στο DNA (Rahman et al., 2015).

Οι Smad1/5/8 μετά την ενεργοποίησή τους σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με την Smad4 και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται συν-ενεργοποιητές και συγκαταστολείς της γονιδιακής μεταγραφής ενώ αλληλεπιδρούν και με σύμπλοκα τα οποία μεταβάλλουν τη χρωματινική δομή και τροποποιούν τις ιστόνες. Στον πυρήνα αναγνωρίζουν τους υποκινητές γονιδίων, σε περιοχές που φέρουν τα μοτίβα SBE, GCAT ή GCCG, και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (Zwijssen et al., 2003).

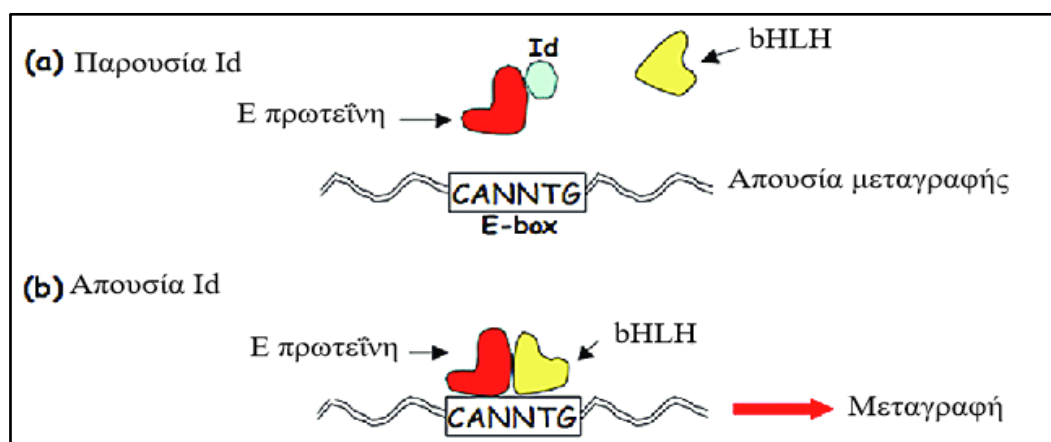
Ο κύριος γονιδιακός στόχος της BMP4 που προάγει την πολυδυναμία στα mESCs είναι τα γονίδια *Id* (Inhibitors of DNA-binding and cell differentiation) τα οποία είναι ρυθμιστές της κυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού κύκλου. Τα γονίδια αυτά ανήκουν στους μεταγραφικούς παράγοντες HLH (helix-loop-helix) καθώς φέρουν μια συντηρημένη περιοχή HLH (Εικ. 5.1.1). Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε 7 τάξεις (I-VII) και οι πρωτεΐνες *Id* απαρτίζουν την τάξη V. Πρόσφατα βρέθηκαν οι περιοχές στους υποκινητές των γονιδίων *Id*, που ανταποκρίνονται στο σήμα BMP4, και περιλαμβάνουν στοιχεία πρόσδεσης των Smad καθώς και αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC-rich) όπως η TGGCGCC (Benezra et al., 2005) (Rahman et al., 2015).

Οι πρωτεΐνες *Id*, παρότι δε φέρουν περιοχές πρόσδεσης στο DNA, φέρουν τη συντηρημένη περιοχή HLH η οποία διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες. Οι *Id* λόγω της δομικής τους ευκαμψίας αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες οι οποίες μεταξύ τους εμφανίζουν μεγάλη δομική ποικιλότητα. Σε αυτές περιλαμβάνονται κάποιες πρωτεΐνες E οι οποίες συνεντοπίζονται με τους μεταγραφικούς παράγοντες bHLH σε περιοχές E-box (CANNTG) στο DNA και μαζί επάγουν την μεταγραφή γονιδίων με ρόλο στη διαφοροποίηση. Η πρόσδεση αυτών των πρωτεϊνών με τις *Id* τις αποσυνδέει από τους μεταγραφικούς παράγοντες bHLH με

αποτέλεσμα να σταματά η μεταγραφή γονιδίων της διαφοροποίησης. Στα mESCs, λοιπόν, ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ των Id με άλλους παράγοντες, αποτρέπει την πρόσδεση των τελευταίων στο DNA, καταστέλλοντας έτσι τη διαφοροποίηση προς τη νευρική αναπτυξιακή κατεύθυνση (Εικ. 5.1.2) (Roschger & Cabrele, 2017).

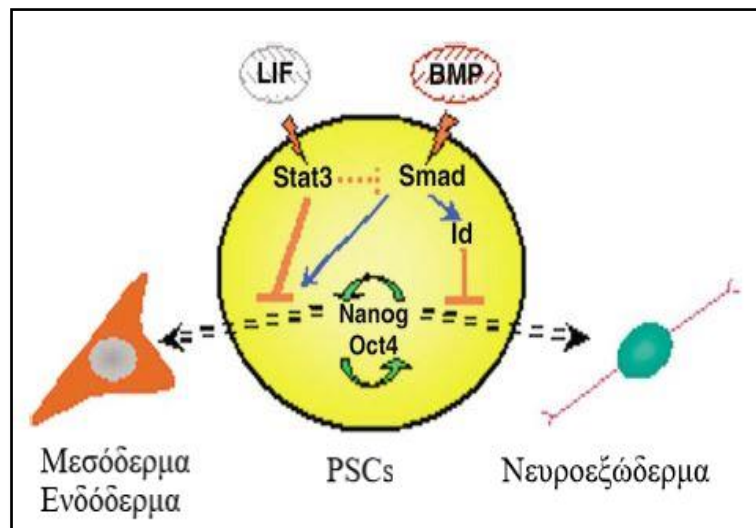


Εικόνα 3.1.1. Δομή των παραγόντων Id. Οι πρωτεΐνες Id φέρουν όπως όλοι οι παράγοντες HLH μια περιοχή με τη δομή έλικα-βρόχος-έλικα (HLH) η οποία διαμεσολαβεί αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες. Δεν φέρει όμως τη βασική περιοχή b στην οποία προσδένουν το DNA άλλοι παράγοντες HLH όπως για παράδειγμα ο bHLH. Προσαρμοσμένη από (Benezra et al., 2005).



Εικόνα 5.1.2 Λειτουργία των παραγόντων Id. Συνήθως, όταν είναι παρούσες οι πρωτεΐνες Id στον πυρήνα, αναγνωρίζουν πρωτεΐνες E οι οποίες είναι προσδεδεμένες σε μοτίβα E (CANNTG) του DNA, ως σύμπλοκα με παράγοντες bHLH, και μαζί δρουν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές γονιδίων διαφοροποίησης. Η πρόσδεση Id-E πρωτεϊνών οδηγεί σε απομάκρυνση των ενεργοποιητών από τα γονίδια αυτά με αποτέλεσμα την καταστολή της διαφοροποίησης. Προσαρμοσμένη από (Benezra et al., 2005).

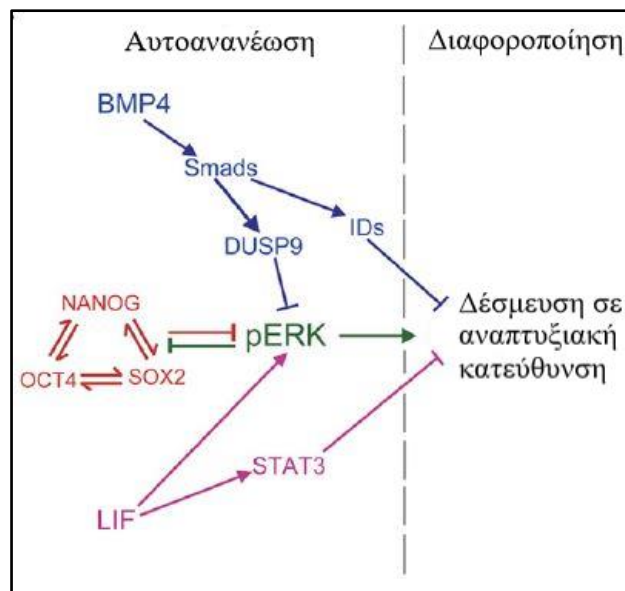
Σε αντιδιαστολή με αυτό το μηχανισμό παρεμπόδισης της διαφοροποίησης, η Smad-1 που ενεργοποιείται από τον BMP4 έχει γονιδιακούς στόχους που οδηγούν το κύτταρο σε διαφοροποίηση προς μεσόδερμα και ενδόδερμα. Η επίτευξη της διατήρησης της πολυδυναμίας με καταστολή της διαφοροποίησης προς αυτές τις αναπτυξιακές κατευθύνσεις επιτυγχάνεται μέσω των Nanog και STAT3. Η STAT3 είναι μια πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιείται όταν προσδένεται στο κύτταρο ο παράγοντας LIF και θα συζητηθεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5.2. Η δυναμική ισορροπία αυτών των μονοπατιών αποτυπώνεται και στα πρωτόκολλα διατήρησης mESC σε καλλιέργεια, όπου απουσία τροφικών κυττάρων και ορού, η πολυδυναμία τους υποστηρίζεται με την παροχή LIF και BMP4 (Εικ. 4.1.2). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού LIF/STAT3 δεν επαρκεί για τη διατήρηση της πολυδυναμίας των hESCs (Dahéron et al., 2004).



Εικόνα 5.1.3 Περιορισμός της διαφοροποίησης των ESC με συνεργιστική δράση των παραγόντων BMP/Id και LIF/STAT3. Υπάρχει ένα ευαίσθητο ισοζύγιο μεταξύ της καταστολής της διαφοροποίησης των κυττάρων προς νευροεξώδερμα από τη δράση των Smad και της καταστολής της διαφοροποίησης των κυττάρων προς μεσόδερμα ή ενδόδερμα μέσω της δράσης της STAT3. Η αύξηση ενός σήματος προς οποιαδήποτε κατεύθυνση διαταράσσει αυτή την ισορροπία και τα κύτταρα οδηγούνται προς διαφοροποίηση. Προσαρμοσμένη από (Ying, Nichols, Chambers, & Smith, 2003).

Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους ρυθμίζεται η διατήρηση της πολυδυναμίας με τη συνδυαστική δράση των παραγόντων LIF/STAT3, Nanog και BMP4/Id βρίσκεται ακόμη

υπό μελέτη. Μια περίπτωση είναι η STAT3 να επικρατεί στην αποσιώπηση γονιδίων, άμεσα ή έμμεσα, τα οποία ενεργοποιούνται από τον BMP4 και οδηγούν στη δέσμευση προς ενδο-/μεσοδερμική αναπτυξιακή κατεύθυνση. Επίσης, σε κάποιους τύπους κυττάρων έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός συμπλόκων της STAT3 με πρωτεΐνες Smad. Είναι πιθανόν λοιπόν η Smad1 να προσδένεται από την STAT3 και είτε τα σύμπλοκα αυτά να αναγνωρίζουν τα γονίδια *Id*, είτε αυτά τα γονίδια να είναι επαγώγιμα σε χαμηλά επίπεδα Smad1 (Ying et al., 2003). Ακόμη, σε μια έρευνα του 2006, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη STAT3 προσδένεται με έναν συμπαράγοντα στον ενισχυτή του γονιδίου Nanog και επάγει την έκφρασή του. Ο Nanog μετέπειτα αποτρέπει τη διαφοροποίηση προς μεσόδερμα δεσμεύοντας την Smad1 και αποτρέποντας την επιστράτευση συν-ενεργοποιητών στα ενεργά μεταγραφικά σύμπλοκα Smad (Suzuki et al., 2006).



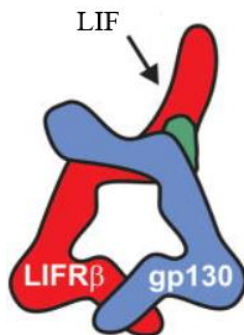
Εικόνα 5.1.4. Ο ρόλος του παράγοντα BMP4 στη διατήρηση της πολυδυναμίας στα mESCs. Όταν στο κύτταρο επιδρούν ταυτόχρονα οι πρωτεΐνες BMP4 και LIF τότε επικρατεί η αυτό-ανανέωση και παρεμποδίζεται η διαφοροποίηση. Ο BMP4 επάγει μέσω των Smad1/5/8/4 την έκφραση των γονιδίων ID που καταστέλλουν παράγοντες διαφοροποίησης προς νευροεξώδερμα. Η διαφοροποίηση προς τις άλλες αναπτυξιακές κατευθύνσεις καταστέλλεται από τον LIF μέσω της STAT3. Παράλληλα ο BMP4 καταστέλλει το μονοπάτι διαφοροποίησης MAPK απενεργοποιώντας την ERK μέσω επαγωγής της DUSP9. Προσαρμοσμένη από (Z. Li et al., 2012).

Ο BMP4 αλληλεπιδρά και με στοιχεία εκτός του κανονικού μονοπατιού TGFβ και συγκεκριμένα αναστέλλει την πρωτεΐνη Erk που συμμετέχει στο μονοπάτι MAPK. Σε αντίθεση όμως με τα ανθρώπινα ESCs, στον ποντικό το μονοπάτι MAPK συνεισφέρει στη διαφοροποίηση. Η αναστολή της ERK διαμεσολαβείται από την επαγωγή της φωσφατάσης DUSP9 (dual-specificity phosphatase 9) η οποία αποφωσφορυλιώνει ειδικά την ERK με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενεργότητά της και κατ' επέκταση να μειορρυθμίζεται το μονοπάτι MAPK. Το μονοπάτι αυτό στα mESCs επάγεται αυτοκρινώς από τον παράγοντα FGF4 και από τον παράγοντα LIF. Συνεπώς και πάλι παρατηρείται μια «επικοινωνία» (cross-talk) μεταξύ των διαφορετικών μονοπατιών όπου η διατήρηση της πολυδυναμίας είναι μια λεπτά ρυθμιζόμενη δυναμική κατάσταση (Li et al., 2012).

5.2 Μονοπάτι JAK/STAT3

Ένας βασικός παράγοντας και ο πρώτος που βρέθηκε ότι διατηρεί τα κύτταρα mESC στην κατάσταση πολυδυναμίας σε καλλιέργεια είναι η κυτοκίνη LIF (Leukemia inhibitory factor 6) η οποία ανήκει στην οικογένεια των IL-6 (Graf, Casanova, & Cinelli, 2011). Η πρωτεΐνη αυτή εκκρίνεται φυσιολογικά από τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος του ποντικού, ενώ οι υποδοχείς της εκφράζονται στα κύτταρα της ICM (Nichols et al., 1996). Η πρόσδεση της στα κύτταρα mESC εκκινεί, ανάμεσα σε άλλα, δυο σηματοδοτικά μονοπάτια που συντηρούν την αυτό-ανανέωση: τα JAK/STAT3 και PI3K/AKT.

Ο παράγοντας LIF έχει μια ιδιαίτερα σταθερή και συμπαγή δομή που απαρτίζεται από τέσσερις έλικες σε κατεύθυνση up-up-down-down, όπως πολλά άλλα μέλη της οικογένειας των κυτοκινών IL-6. Πριν εκκριθεί από τα κύτταρα υφίσταται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συμπεριλαμβανομένης της αποκοπής αμινοξέων από το αμινοτελικό της άκρο. Το άκρο αυτό έχει βρεθεί ότι συνεισφέρει σημαντικά στην αναγνώριση του υποδοχέα της. Τα μέλη της οικογένειας IL-6 προσδέονται σε υποδοχείς οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε μη-σηματοδοτικούς α-υποδοχείς και σε σηματοδοτικούς υποδοχείς. Η κυτοκίνη LIF αναγνωρίζει και προσδέεται στους σηματοδοτικούς υποδοχείς gp130 και LIF-Rβ χωρίς να συμμετέχουν μη-σηματοδοτικοί υποδοχείς (Nicos A Nicola and Jeffrey J Babon, 2015).

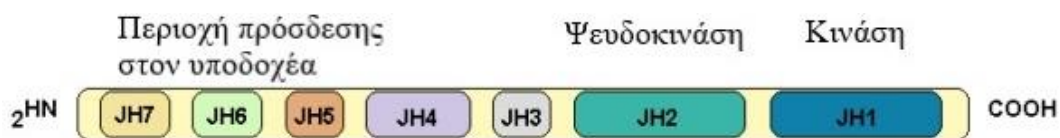


Εικόνα 5.2.1. Το τριμερές σύμπλοκο του παράγοντα LIF με τους υποδοχείς LIFRβ και gp130. Προσαρμοσμένη από (Nicos A Nicola and Jeffrey J Babon, 2015)

Η πρόσδεση του LIF στον υποδοχέα LIF-Rβ προκαλεί την ενεργοποίησή του και διμερισμό με τον συνυποδοχέα gp130 (glycoprotein 130). Οι δυο υποδοχείς έχουν μεταξύ τους παρόμοια αρχιτεκτονική και είναι προσδεδεμένοι στην κυτταροπλασματική τους πλευρά με μέλη της οικογένειας των κινασών JAK. Ο LIFRβ περιέχει 8 διακριτές περιοχές στην εξωκυττάρια περιοχή που φέρουν την ίδια αρχιτεκτονική β-sandwich που διακρίνονται σε δυο περιοχές πρόσδεσης κυτοκινών (CBM) που διαχωρίζονται από μια περιοχή Ig-like και ακολουθούνται από τρεις περιοχές φιβρονεκτίνης τύπου III (FnIII). Οι περιοχές FnIII εξασφαλίζουν τη σωστή διεύθυνση του ενδομεμβρανικού και του ενδοκυτταρικού τμήματος ώστε να διασφαλίζεται η ενεργοποιητική φωσφορυλίωση των κινασών JAK έπειτα από την πρόσδεση κυτοκινών. Ο υποδοχέας gp130 έχει παρόμοια εξωκυτταρική δομή αλλά φέρει μόνο μια περιοχή CBM. Ο παράγοντας LIF προσδέεται με υψηλή συγγένεια και στους δυο υποδοχείς (Nicos A Nicola and Jeffrey J Babon, 2015).

Οι JAK (Janus kinase) πρωτεΐνες αποτελούν μια από τις δέκα οικογένειες τυροσινικών κινασών οι οποίες δεν έχουν λειτουργία υποδοχέα και στα θηλαστικά εντοπίζονται οι τέσσερις JAK1, JAK2, JAK3 και Tyk2 (Graf et al., 2011). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει δυνατότητα πρόσδεσης στον υποδοχέα και ενεργοποίησης των τριών JAK1 JAK2 και Tyk2 αλλά φυσιολογικά κυριαρχεί η πρόσδεση της JAK1. Οι JAK περιέχουν επτά περιοχές JH (JAK homology) που είναι υψηλά διατηρημένες ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας (Εικ. 5.2.2). Η περιοχή JH1 εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο και είναι η καταλυτική περιοχή με την ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Η JH2 μια περιοχή ψευδοκινάσης (kinase-like) χωρίς ενζυμική δραστηριότητα αλλά απαραίτητη για την λειτουργία της κινάσης της περιοχής JH1. Η περιοχή

JH3 είναι μια περιοχή SH2 (Src-homology 2⁹). Οι περιοχές JH4-JH7 καλούνται συλλογικά επικράτεια FERM και συμμετέχουν στη δέσμευση του υποδοχέα gp130 (Hirai, Karian, & Kikyo, 2011).



Εικόνα 5.2.2. Δομή των παραγόντων JAK. Οι JAK κινάσες φέρουν στη δομή τους τις επτά διακριτές περιοχές JH1-JH7. Στο καρβοξυτελικό άκρο φέρουν τις περιοχές JH1 και JH2 που φέρουν την καταλυτική ενεργότητα κινάσης και μια βοηθητική ψευδοκινάση αντίστοιχα. Στο αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται η περιοχή FERM η οποία αποτελείται από τις JH4-7 και διαμεσολαβεί την πρόσδεση στον υποδοχέα. Κεντρικά στο μόριο βρίσκεται η περιοχή SH2 JH3. Προσαρμοσμένη από (Becerra-Díaz, Valderrama-Carvajal, & Terrazas, 2011)

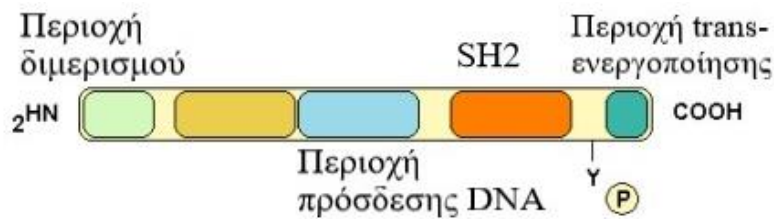
Η ενεργοποίηση των κινασών JAK είναι άμεση μετά την πρόσδεση του παράγοντα LIF αλλά ο μοριακός μηχανισμός δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Είναι γνωστό όμως ότι μετά την ενεργοποίηση της JAK που είναι προσδεδεμένη στον ένα υποδοχέα διενεργείται από αυτή, μια trans-φωσφορυλίωση της JAK που είναι προσδεδεμένη στον άλλο υποδοχέα σε κατάλοιπα τυροσίνης και ιδιαίτερα στο κατάλοιπο Tyr1034. Αυτό το κατάλοιπο εντοπίζεται στον «βρόχο ενεργοποίησης» της περιοχής της κινάσης με αποτέλεσμα με αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης που επιτρέπει την πρόσδεση του ATP και των υποστρωμάτων (Nicos A Nicola and Jeffrey J Babon, 2015).

Έπειτα από την ενεργοποίησή τους, οι JAK κινάσες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα των υποδοχέων στους οποίους είναι προσδεδεμένες και αυτοί πλέον λειτουργούν ως πρωτεΐνες κριώματα προσελκύνοντας διάφορους παράγοντες. Ιδιαίτερα σημαντική τροποποίηση είναι η φωσφορυλίωση τεσσάρων καταλοίπων τυροσίνης του υποδοχέα gp130 που πλέον δρα ως περιοχή ελλιμενισμού (docking site) της STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Ταυτόχρονα προσδένεται σε φωσφορυλιώμενα κατάλοιπα τυροσίνης του υποδοχέα LIFRβ. Οι JAK έπειτα ενεργοποιούν με φωσφορυλίωση την πρωτεΐνη STAT3 σε

⁹ Η Src homology 2 περιοχή είναι μια μικρή αλληλουχία από τις δυο που εντοπίζονται στην ογκοπρωτεΐνη Src και αυτές διαμεσολαβούν την πρόσδεση σε πρωτεΐνες. Ομόλογα αυτών εντοπίζονται σε ένα μεγάλο πλήθος πρωτεϊνών.

κατάλοιπα τυροσίνης όπως η Tyr705 και συνήθως η φωσφορυλίωση αυτή διαμεσολαβείται από την JAK1(Graf et al., 2011) (Hirai et al., 2011).

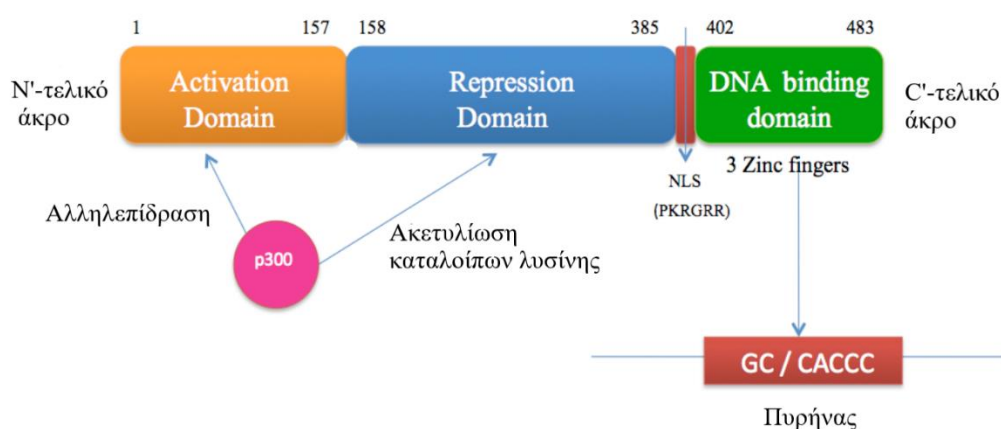
Η STAT3 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών STAT, ενεργοποιείται από διάφορα είδη κυτοκινών και, σε αντίθεση με τα άλλα μέλη της οικογένειας, φαίνεται να συμμετέχει σε πολλές και διαφορετικές φυσιολογικές διεργασίες. Αυτό υποστηρίζεται και από τη θνησιμότητα εμβρύων ποντικών στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση του γονιδίου, ενώ η αποσιώπηση των άλλων STAT πρωτεϊνών οδηγεί σε διακριτούς φαινοτύπους (Levy & Lee, 2002). Στην δομή των STAT και συνεπώς και της STAT3 περιλαμβάνονται ένα αμινοτελικό άκρο που ακολουθείται από ένα σπειρωμένο σπείραμα, μια θέση πρόσδεσης DNA, μια περιοχή SH2 (Src homology 2) και μια καρβοξυτελική περιοχή trans-ενεργοποίησης (Becerra-Díaz et al., 2011).



Εικόνα 5.2.3. Δομή των παραγόντων STAT. Προσαρμοσμένη από (Becerra-Díaz et al., 2011)

Αφότου φωσφορυλιωθούν οι STAT3 από τις κινάσες JAK είναι ικανές να σχηματίζουν διμερή και να εισέρχονται στον πυρήνα όπου εντοπίζουν και ρυθμίζουν διάφορους πυρηνικούς στόχους και ειδικότερα αυξάνουν τη μεταγραφή των γονιδίων που ανταποκρίνονται στην παρουσία κυτοκινών (Graf et al., 2011)(Nicos A Nicola and Jeffrey J Babon, 2015). Η ενεργοποίηση της STAT3 αρκεί για τη διατήρηση της πολυδυναμίας σε καλλιέργεια mESCs παρουσία ορού και απουσία τροφικών κυττάρων. Σημαντικές περιοχές στην αλληλουχία της είναι οι θέσεις πολυμερισμού και οι θέσεις πρόσδεσης στο DNA (Levy & Lee, 2002). Όταν λοιπόν φωσφορυλιωθεί ως απόκριση στον παράγοντα LIF, το διμερές pSTAT3-pSTAT3 μετατοπίζεται στον πυρήνα και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας προσδεδεμένος σε ενισχυτές γονιδίων σε αλληλουχίες TTCCSGGAA (S=C ή G). Μαζί με τον παράγοντα Brachyury (T-box μεταγραφικός παράγοντας) προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου του παράγοντα πολυδυναμίας Nanog και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του. Σημαντικός στόχος του στον πυρήνα που επάγει την πολυδυναμία είναι το γονίδιο *Klf4* (krüppel-like factor) το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα (Hirai et al., 2011).

Ο Klf4 ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων KLF οι οποίοι αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω «δακτύλων» ψευδαργύρου (zinc finger). Διάφορες περιοχές έχουν αναγνωριστεί στη δομή του και σε αυτές περιλαμβάνονται το όξινο αμινοτελικό άκρο μεταγραφικής ενεργοποίησης που ακολουθείται από μια περιοχή NLS η οποία χαρακτηρίζεται από επαναλήψεις PKRGRR¹⁰, καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο δέσμησης του DNA. Η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με το p300/CBP και να ενεργοποιείται καθώς μπορεί να ακετυλιώνει τα κατάλοιπα λυσίνης K225 και K229 στην περιοχή καταστολής της μεταγραφής. Η περιοχή δέσμησης του DNA φέρει τρία υψηλά συντηρημένα «δάχτυλα» ψευδαργύρου, κάτι που το διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες KLF (Vangarandu & Ai, 2009).



Εικόνα 5.2.4. Η δομή του παράγοντα KLF4 και οι αλληλεπιδράσεις του με πρωτεΐνες και το DNA. Προσαρμοσμένη από (Vangarandu & Ai, 2009).

Πειράματα που έχουν γίνει σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έχουν δείξει ότι ο παράγοντας Klf4 ενεργοποιεί την έκφραση του παράγοντα πολυδυναμίας Sox2. Κατ' επέκταση, μέσω της λειτουργίας του παράγοντα Sox2 (βλ. Κεφ6), επάγεται η έκφραση του παράγοντα πολυδυναμίας OCT4. Συνδυαστικά και οι τρεις παράγοντες Klf4, OCT4 και Sox2 προσδένονται σε γονίδια και μεταβάλλουν την έκφρασή τους προάγοντας την πολυδυναμία (Niwa, Ogawa, Shimosato, & Adachi, 2009). Μάλιστα αποτελεί έναν από τους τέσσερις παράγοντες (Oct4, Sox2, cMyc, Klf4) που ανακαλύφθηκε ότι επάγουν την πολυδυναμία και τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε ινοβλάστες ποντικού. Πειράματα όμως έκτοτε, με τη χρήση για παράδειγμα αναστολέων, έχουν αναδείξει τη μη αναγκαιότητα του παράγοντα

¹⁰ Οι συντομεύσεις PKRGRR αντιστοιχούν στα αμινοξέα προλίνη-λυσίνη-αργινίνη-γλυκίνη-λυσίνη-λυσίνη.

αυτού για τον επαναπρογραμματισμό σε μια πολυδύναμη κατάσταση (Vangarandu & Ai, 2009).

Ένας ακόμη γονιδιακός στόχος της STAT3 με επίδραση στη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης είναι το γονίδιο *Myc*. Η πρωτεΐνη *Myc* ανήκει σε μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που στο καρβοξυτελικό άκρο φέρουν μια επικράτεια bHLHZip (helix-loop-helix/leukine zipper). Στη δομή τους περιέχουν μια μεγάλη αμινοτελική περιοχή με συντηρημένες περιοχές που καλούνται MYC (MBI, MBII) και οι οποίες συμμετέχουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση, μια περιοχή PEST¹¹, δυο ακόμη συντηρημένες περιοχές MBIII, MBIV, μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού και μια καρβοξυτελική περιοχή bHLHZ. Αυτή η περιοχή διαμεσολαβεί την πρόσδεση με άλλους παράγοντες bHLHZip όπως η πρωτεΐνη Max με την οποία έχει βρεθεί ότι διμερίζεται (Lüscher & Larsson, 1999). Σε συνέργεια με την Max συνδέεται σε υποκινητές γονιδίων τα μοτίβα E-box (5'-CACGTG-3') και ενεργοποιεί την μετάφραση. Ταυτόχρονα, το διμερές αυτό φέρει μια μεγάλη περιοχή στην οποία μπορούν να προσδένονται διάφοροι παράγοντες όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών HAT οι οποίες αναδιαμορφώνουν τη δομή της χρωματίνης. Η *Myc* με αυτό τον τρόπο, καθώς στοχεύει σε γονίδια σχετικά με την πολυδυναμία, συμβάλλει στη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης (Fagnocchi et al., 2016).

Η ενεργοποίηση του παράγοντα STAT3 εκκινεί δυο αντίρροπους μηχανισμούς. Αφενός ενεργοποιείται ένας θετικός ανατροφοδοτικός μηχανισμός κατά τον οποίο επάγεται η έκφραση των στοιχείων του μονοπατιού JAK1, STAT3, gp130 και LIF-R. Παράλληλα όμως επάγεται η έκφραση του παράγοντα SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) ο οποίος αναστέλλει τη μεταγωγή του σήματος στο μονοπάτι αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα gp130 καθώς και με την STAT3. Με την ταυτόχρονη παρουσία του θετικού και αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού, το κύτταρο βρίσκεται σε μια κατάσταση «ετοιμότητας» για να ανταποκριθεί σε αναπτυξιακά ερεθίσματα (Onishi & Zandstra, 2015).

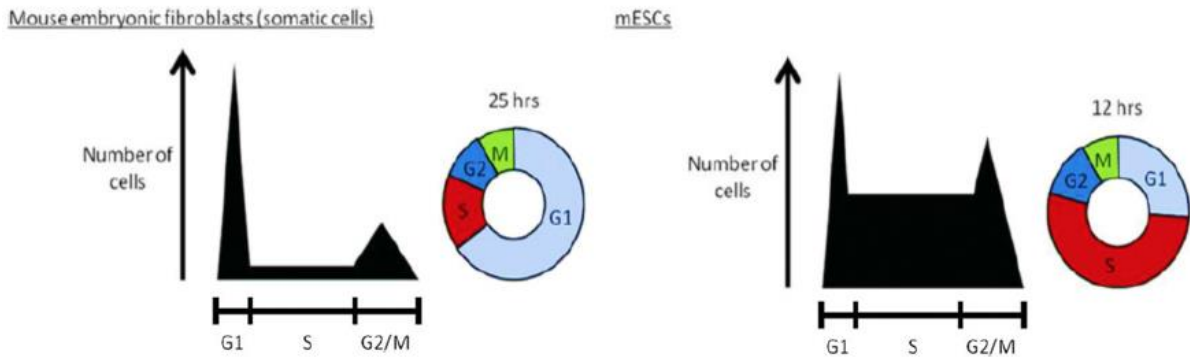
¹¹ Η περιοχή PEST είναι μια περιοχή πλούσια σε αμινοξέα προλίνης (P), γλουταμικού οξέος (E), σερίνης (S) και θρεονίνης (T) και υπάρχουν ενδείξεις ότι δρα ως σηματοδοτική αλληλουχία για την πρωτεϊνική αποδόμηση.

5.3 Μονοπάτι PI(3)K/AKT

Ο παράγοντας LIF όταν προσδεθεί στα mESCs πυροδοτεί, εκτός από το μονοπάτι JAK/STAT3, το μονοπάτι PI(3)K/AKT. Μερικοί άλλοι παράγοντες που ενεργοποιούν αυτό το μονοπάτι είναι ο FGF4, ο IGF1 και η ρετινόλη. Αφότου συνδεθεί η κινάση LIF στους υποδοχείς LIFRβ και gp130, ενεργοποιούνται οι κινάσες JAK, όπως περιγράφηκε στο Κεφ. 5.2. Οι JAK έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τα μέλη της οικογένειας των κινασών PI3K της κλάσης I. Οι PI(3)K κινάσες της κλάσης I αποτελούν μία οικογένεια ενδοκυτταρικών ενζύμων μεταγωγής σήματος ικανών να φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα της θέσης 3 του δακτυλίου ινοσιτόλης των φωσφατιδυλinoσιτολών. Στο μονοπάτι αυτό διενεργείται φωσφορυλίωση της PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), που βρίσκεται προσδεσμένη στη μεμβράνη, προς παραγωγή PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate).

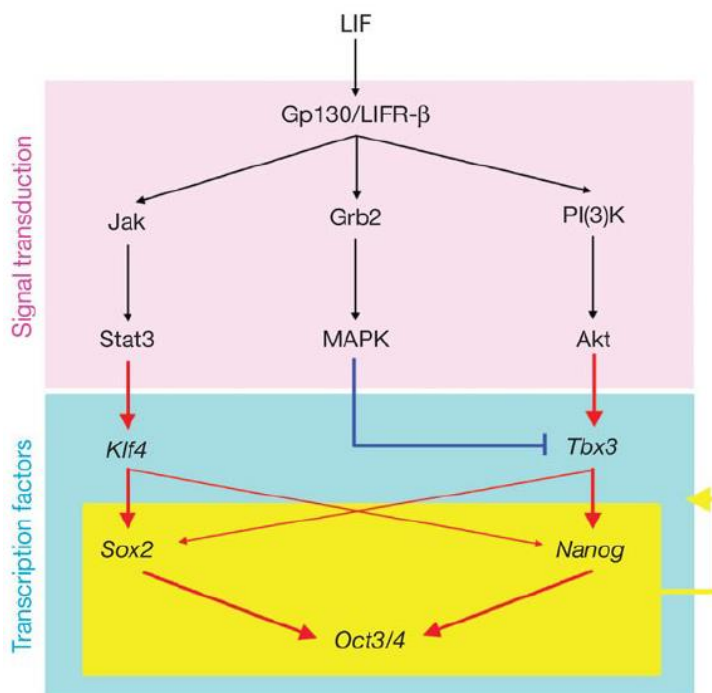
Αυτή η τροποποίηση δίνει τη δυνατότητα να προσδεθεί στην PIP₃ η κινάση AKT μέσω μιας επικράτειας με ομολογία πλεκστρίνης. Η κινάση Akt, γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB), ενεργοποιείται επίσης από την πρωτεϊνική κινάση PDK1 και από τον mTOR του συμπλόκου mTORC2. Η Akt συνεισφέρει στην πολυδυναμία αναστέλλοντας μέσω φωσφορυλίωσης τον παράγοντα GSK3-β που προάγει τη διαφοροποίηση (βλ. Κεφ 5.4), ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο και ενεργοποιώντας την έκφραση του γονιδίου *Tbx3* (Varga et al., 2004)(Niwa et al., 2009).

Η κινάση Akt, όπως προαναφέρθηκε στο Κεφ. 4.2, έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S. Τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μια σχετικά μικρής διάρκειας φάση G1 (Εικ.5.3.1) και βρίσκονται κυρίως στη φάση S. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην απουσία μηχανισμών που εντοπίζονται στα διαφοροποιημένα κύτταρα και οι οποίοι αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ανταποκρινόμενοι σε διάφορα ερεθίσματα. Είναι πιθανόν λοιπόν, η Akt να συνεισφέρει στην πολυδυναμία καθώς επάγει την δημιουργία συμπλόκων κυκλινών /CDK που είναι απαραίτητα για την μετάβαση G1/S (Graf et al., 2011).



Εικόνα 5.3.1. Σύγκριση της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου ανάμεσα σε διαφοροποιημένα (MEFs) και αδιαφοροποίητα κύτταρα (mESCs). Ο κάθετος άξονας αναπαριστά τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκεται στην εκάστοτε φάση του οριζόντιου άξονα. Επίσης στο γράφημα φαίνεται η διαφορά της συνολικής διάρκειας του κύκλου του κάθε κυττάρου (Hindley & Philpott, 2013).

Το γονίδιο *Tbx3* κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα με επικράτεια T-box, μια συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA που μοιράζονται οι T-box πρωτεΐνες, η οποία αναγνωρίζει ειδικά τη συναινετική αλληλουχία -TCACACCT- (Wilson & Conlon, 2002). Η περιοχή πρόσδεσης του DNA T-box εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή ενεργοποίησης ή ενεργοποίησης και καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής. Ο παράγοντας *Tbx3* προσδένονται στον ενισχυτή του γονιδίου *Nanog* και επάγει την έκφρασή του. Έπειτα, ο παράγοντας *Nanog* επάγει την έκφραση του γονιδίου *Oct4* σε συνδυασμό με τον μεταγραφικό παράγοντα *Sox2*. Το μονοπάτι ρυθμίζεται αρνητικά μέσω της αναστολής του *Tbx3* από το μονοπάτι MAPK που επίσης ενεργοποιείται από την πρόσδεση του παράγοντα LIF στο κύτταρο. Συνοπτικά αυτά τα μονοπάτια παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.3.2. Η λειτουργία του παράγοντα *Tbx3* στην πολυδυναμία επιβεβαιώθηκε ύστερα από πειράματα απώλειας λειτουργία με RNAi όπου διαπιστώθηκε η συνεισφορά του στην αδιαφοροποίητη κατάσταση (Niwa et al., 2009).



Εικόνα 4.4: Παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια του παράγοντα LIF σε mESCs.

Το μονοπάτι *Jak-Stat3* ενεργοποιεί τον *Klf4*, ενώ η οδός *PI(3)K-Akt* διεγείρει τη μεταγραφή του *Tbx3*. Η οδός *MAPK* ανταγωνίζεται τον πυρηνικό εντοπισμό του *Tbx3*. Οι *Klf4* και *Tbx3* ενεργοποιούν κυρίως τους παράγοντες *Sox2* και *Nanog*, αντίστοιχα, και διατηρούν την έκφραση του *Oct4*. Η μεταγραφή αυτών των μεταγραφικών παραγόντων είναι ρυθμιζόμενη θετικά από τις *Oct4*, *Sox2* και *Nanog*, οι οποίες μπορεί να συμβάλουν στη σταθερή έκφρασή τους απουσία σημάτων (Niwa et al., 2009).

5.4 Μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης

Το μονοπάτι Wnt έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικού. Η κύρια πρωτεΐνη-τελεστής του μονοπατιού είναι η β-κατενίνη η οποία μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός συμπαράγοντας. Μέσω του μονοπατιού αυτού αναστέλλεται η λειτουργία μιας πρωτεΐνης που καλείται GSK-3 και η οποία σημαίνει την β-κατενίνη για αποδόμηση. Πειράματα κατά τα οποία προστίθενται σε κυτταροκαλλιέργειες mESC παράγοντες Wnt ή αναστολείς της GSK-3 (με συνδυασμό αναστολέων της ERK) επιβεβαιώνουν την συνεισφορά του μονοπατιού στη διατήρηση της πολυδυναμίας (Z. Xu et al., 2016).

Οι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες Wnt, όταν προσδεθούν στο κύτταρο, μετάγουν το σήμα μέσω τριών διαφορετικών μονοπατιών. Εκτός από το κανονικό μονοπάτι β-κατενίνης

που αναλύεται εδώ υπάρχουν και τα μη κανονικά μονοπάτια Planar Cell Polarity (PCP) και Wnt/Calcium (Komiya & Habas, 2008). Οι Wnt πρωτεΐνες έχουν σφαιρική δομή και στην αλληλουχία τους εντοπίζονται 23-25 υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία επιτρέπουν τη δημιουργία ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών που εξυπηρετούν αυτή τη δομή. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης συμμετέχουν επίσης στη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών με αποτέλεσμα να εντοπίζονται και σε ολιγομερή οι πρωτεΐνες Wnt. Αφότου περάσουν μια διαδικασία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως γλυκοζυλίωση, εκκρίνονται στην εξωκυττάρια μήτρα και προσδένονται στους υποδοχείς τους. Η πρόσδεση στους υποδοχείς σταθεροποιείται μέσω της δράσης πρωτεογλυκανών της κυτταρικής μεμβράνης HSPGs (βλ. Κεφ.4.2) οι οποίες τις σταθεροποιούν, αποτρέπουν τη διάχυσή τους και ρυθμίζουν την ικανότητά τους για σηματοδότηση (Coudreuse & Korswagen, 2007).

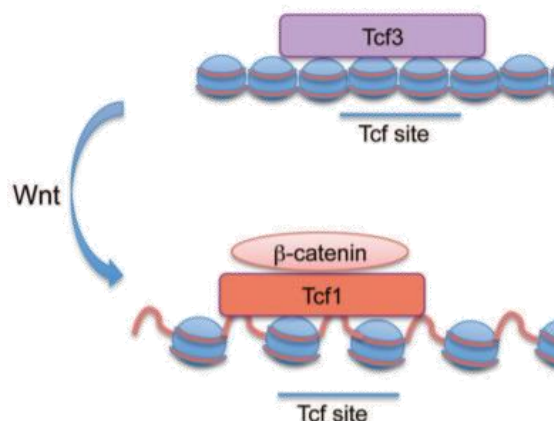
Οι Wnt φέρουν στη δομή τους ένα λιπιδικό τμήμα μέσω του οποίου αναγνωρίζουν τον υποδοχέα Frizzled. Οι υποδοχείς αυτοί φέρουν επτά διαμεμβρανικά τμήματα και αναγνωρίζουν μια πληθώρα σημάτων τα οποία μετάγουν και τα οποία σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και τη ρύθμιση σε ενήλικες οργανισμούς. Ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G οι οποίες δρουν ως GTPασες. Οι Wnt αναγνωρίζουν επίσης τον συν-υποδοχέα LRP5/6 (lipoprotein receptor-related proteins 5/6) (Willert & Nusse, 2012). (Huang & Klein, 2004).

Έπειτα από την πρόσδεση της Wnt στον υποδοχέα Frizzled επάγεται μέσω αυτού η φωσφορυλίωση του συν-υποδοχέα LRP5/6 που επιτρέπει να προσδεθεί σε αυτόν η πρωτεΐνη Axin. Η Axin είναι μια πρωτεΐνη-ικρίωμα η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου καταστροφής της β-κατενίνης. Όταν δεν είναι προσδεδεμένος ένας παράγοντας Wnt στον υποδοχέα Frizzled, τότε η Axin εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες APC (adenomatosis polyposis coli), CK1α (casein kinase1α) και GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) που συνθέτουν το σύμπλοκο καταστροφής της β-κατενίνης. (Stamos & Weis, 2013). Οι ρόλοι των πρωτεϊνών αυτών αναλύθηκαν στο Κεφ. 4.4 με σημαντικότερο ρόλο να έχουν οι CK1α και GSK-3 οι οποίες φωσφορυλιώνουν την β-κατενίνη. Αρχικά φωσφορυλιώνεται ένα κατάλοιπο σερίνης από την CK1α και έπειτα φωσφορυλιώνονται διαδοχικά ένα κατάλοιπο τυροσίνης και δυο κατάλοιπα σερίνης από την GSK-3. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν επίσης την APC και με αυτή την τροποποίηση αυξάνεται η ικανότητά της να προσδέσει τη β-κατενίνη. Η διαδοχική φωσφορυλίωση της β-κατενίνης έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτινυλίωσή της από την E3 λιγάση ουβικιτίνης β-TrCP και συνεπώς την αποδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα με πρωτεόλυση (W. Xu & Kimelman, 2007).

Παρουσία των Wnt εκκινείται το κανονικό μονοπάτι β-κατενίνης κατά το οποίο η Axin δεσμεύεται από τον LPR και δημιουργείται ένα σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες GSK-3 και Dsh (Dishevelled) (βλ. Κεφ. 4.4). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου απενεργοποιεί τη δράση της GSK-3 και αποτρέπει τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται αυτή η απενεργοποίηση με επικρατέστερη την άμεση αλληλεπίδραση της GSK-3 με την Dsh. Ανεξαρτήτως όμως του μηχανισμού, η καταστολή της GSK-3 αποτρέπει την αποδόμησή της β-κατενίνης η οποία συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και μπορεί να μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Komiyama & Habas, 2008).

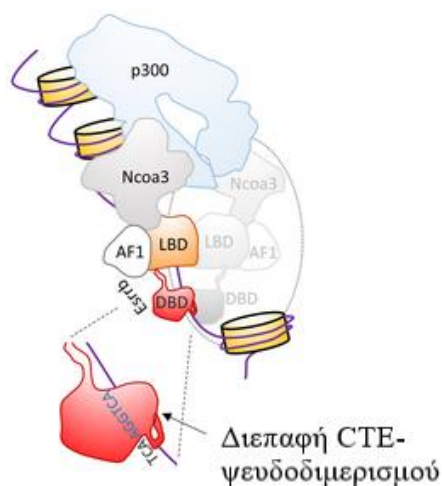
Η β-κατενίνη φέρει περιοχές στο μόριό της με τις οποίες μπορεί να προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες και συγκεκριμένα μπορεί να προσδένεται σε μεταγραφικούς παράγοντες του πυρήνα και να ρυθμίζει σε συνέργεια με αυτούς τη γονιδιακή έκφραση. Έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί την έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας Sox 2 και Oct4 και παραγόντων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, μια διαδικασία που έχει ρόλο στην πολυδυναμία. Η β-κατενίνη μπορεί να αλληλεπιδρά στον πυρήνα με του μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF και μαζί δρουν ως συν-ενεργοποιητές (Bhavanasi & Klein, 2016).

Κατά την αναστολή της GSK-3 σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού παρατηρείται η απενεργοποίηση του κατασταλτικού μεταγραφικού παράγοντα Tcf3. Η καταστολή του Tcf3 διαμεσολαβείται από την β-κατενίνη η οποία επιστρατεύει συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής όπως ο Tcf1. Ο Tcf3 προσδένεται στους υποκινητές πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία και φαίνεται να δρα κατασταλτικά. Επίσης έχει παρατηρηθεί μια συσχέτιση με τις τροποποιήσεις των ιστονών που καθιστούν τη δομή της χρωματίνης μεταγραφικά ενεργή. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση της ακετυλίωσης της ιστόνης H3 (AcH3) και τη μείωση της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 9 της ίδιας ιστόνης (H3K9me3). Ενδεχομένως οι μεταβολές αυτές διευκολύνουν την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ενισχύουν το δυναμικό αυτοανανέωσης. Ο Tcf3 στοχεύει και καταστέλλει διάφορα γονίδια που σχετίζονται με την πολυδυναμία όπως τα γονίδια *Nanog* (Κεφ. 6) και *Esrrb* (Yi et al., 2012)(Ombrato, Lluís, Cosma, & Pathway, 2012)(Pereira, Yi, & Merrill, 2006).



Εικόνα 5.4.1. Το μονοπάτι Wnt / β-κατενίνη και οι παράγοντες Tcf. Απουσία σήματος Wnt ο Tcf δρα ως καταστολέας της μεταγραφής, καθώς μαζί με παράγοντες του δικτύου μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας προσδένεται σε πολλούς υποκινητές. Παρουσία της β-κατενίνης ο Tcf3 φωσφορυλιώνεται και απομακρύνεται από το DNA. Η β-κατενίνη μπορεί να προσδένεται στους ίδιους γονιδιακούς τόπους με συμπάραγοντες (π.χ. Tcf1) και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή. Προσαρμοσμένη από (Ombrato et al., 2012).

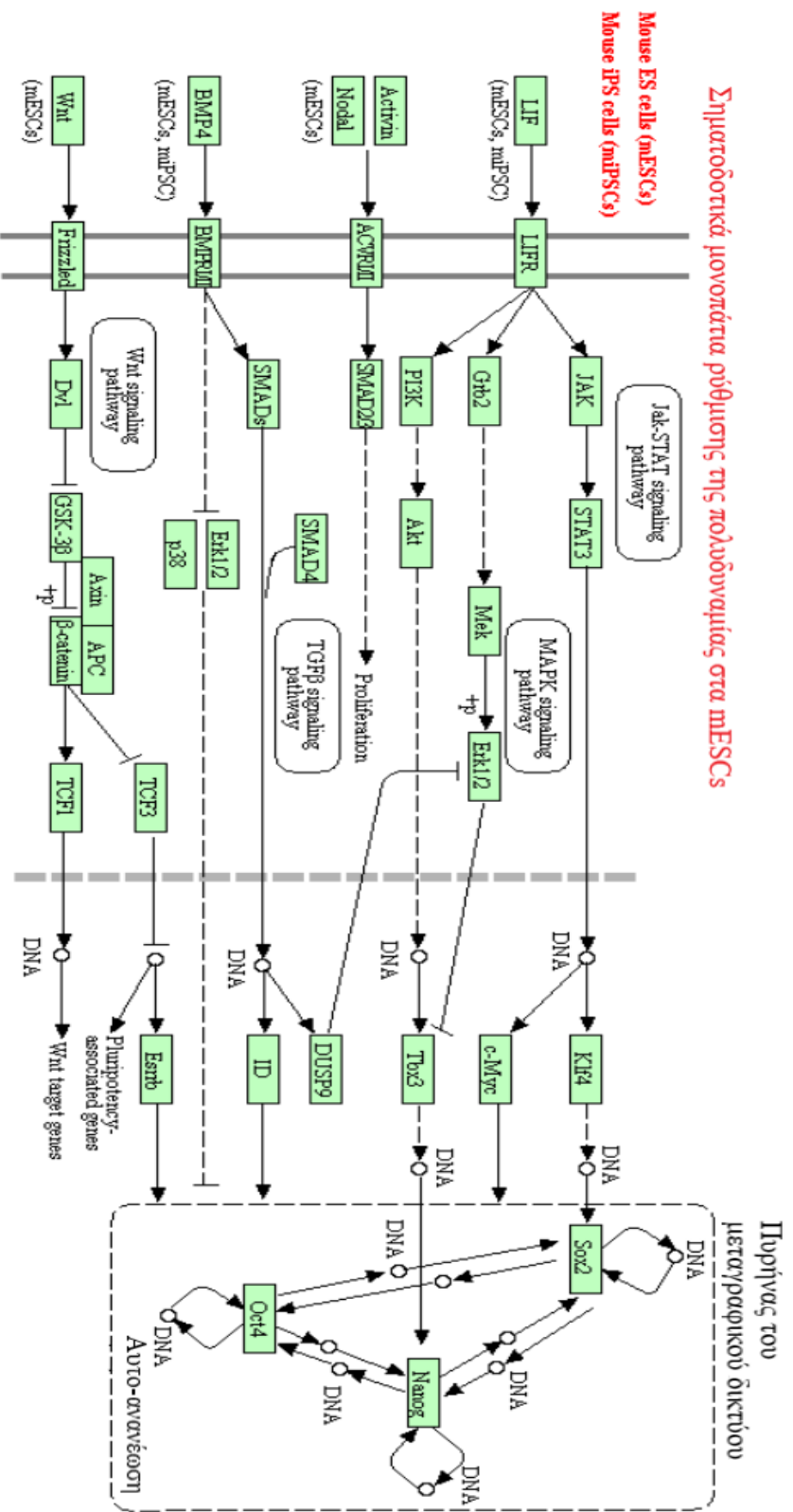
Το γονίδιο *Esrrb* (estrogen-related receptor beta) καταστέλλεται από τον παράγοντα Tcf3 και ενεργοποιείται όταν η β-κατενίνη απομακρύνει τον παράγοντα αυτό από τον υποκινητή του. Η *Esrrb* ανήκει στην υποομάδα πυρηνικών υποδοχέων NR3B (NMDA-type glutamate receptor) που αναγνωρίζει διάφορες ορμόνες (οιστρογόνα, ανδρογόνα, προγεστερόνη, αλδοστερόνη, κορτιζόλη). Η αμινοτελική περιοχή της *Esrrb* φέρει την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης ενώ το κεντρικό μέρος φέρει ένα «δάχτυλο» ψευδαργύρου υπεύθυνο για την πρόσδεση στο DNA (Εικ. 5.4.2). Η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει την περιοχή LBD (ligand-binding domain) η οποία είναι υπεύθυνη για την ειδικότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης που εξαρτάται από τον εκάστοτε προσδέτη. Οι υποδοχείς αυτοί είναι μόνιμα ενεργοί (ορφανός πυρηνικός υποδοχέας) λόγω της ενεργοποιημένης διάταξης της περιοχής LBD. Η λειτουργία του υποδοχέα ρυθμίζεται σημαντικά από την διαθεσιμότητα συμπαραγόντων και ρυθμίζεται χρονο-χωρικά αυστηρά κατά την ανάπτυξη υποδεικνύοντας έναν σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση (Festuccia, Owens, & Navarro, 2017).



Εικόνα 5.4.2. Το σύμπλοκο του *Esrrb* με το DNA και τους συν-ενεργοποιητές *p300-CBP* και *Nco3* (*nuclear receptor coactivator 3*) (Festuccia et al., 2017).

Η ενεργοποίηση της *Esrrb* έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία καθώς και την καταστολή γονιδίων της διαφοροποίησης. Έχει μάλιστα χρησιμοποιηθεί ως αντικαταστάτης του *Klf4* στον επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών, με μικρότερη όμως αποδοτικότητα. Μέσω πειραμάτων siRNA knockdown και γονιδιακής διαγραφής με ομόλογο ανασυνδυασμό έχει βρεθεί ότι η *Esrrb* είναι απαραίτητη για την διατήρηση της αυτοανανέωσης που οφείλεται στην αναστολή της *GSK-3*. Οι κύριοι στόχοι της είναι οι σημαντικοί παράγοντες πολυδυναμίας *Oct4* και *Nanog*. Από πειράματα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών βρέθηκε ότι η *Esrrb* προσδένεται στην πρωτεΐνη *Oct4* και μαζί ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου *Nanog*. Μάλιστα αλληλεπιδρά και με τον *Nanog* ρυθμίζοντας έτσι την ενεργοποίηση και του γονιδίου *Oct4*. Συνεπώς έχει καίριο ρόλο στην διατήρηση της πολυδυναμίας επηρεάζοντας συμμετέχοντας άμεσα στο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας (Martello et al., 2012).

Σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης της πολυδυναμίας στα mESCs



Ανασκόπηση των σημειωτικών μονοπατιών που συνεισφέρουν στην πολυδυναμία των ανθρώπινων ESCs. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα τέσσερα μονοπάτια TGFβ, JAK/STAT3, PI(3)K/AKT και Wnt/β-καρενίνη. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών οδηγεί στην επακόλουθη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών τελεστών Smad1/5/8/4, STAT3, Akt, Erk και β-καρενίνη αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την ικανότητα να επιδρούν στον πυρήνα και να επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία. Υπόμνημα του χάρτη περιλαμβάνεται στο Παράρτημα. Πηγή: KEGG Pathway Database

6. ΔΙΚΤΥΟ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ OCT4, SOX2, NANOG (OSN)

Όλα τα μονοπάτια που περιγράφηκαν συγκλίνουν στην ενεργοποίηση ενός δικτύου μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας με σημαντικότερα μέλη τους παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog (OSN). Άλλα μέλη του δικτύου που έχουν ήδη αναλυθεί είναι οι πρωτεΐνες Klf4, Esrrb και Tbx3 οι οποίες συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των OSN μέσω των μονοπατιών JAK/STAT3, Wnt/β-κατενίνης και PI(3)K/AKT αντίστοιχα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας έχουν διττό ρόλο. Αφενός καταστέλλουν τα γονίδια που επάγουν τη διαφοροποίηση και αφετέρου ρυθμίζουν τη δική τους επαγωγή και την επαγωγή άλλων γονιδίων σχετικών με την πολυδυναμία.

6.1 NANOG

Το σημαντικότερο μέλος αυτού του δικτύου ως προς τη διατήρηση της πολυδυναμίας είναι ο Nanog ο οποίος αποτρέπει την διαφοροποίηση προς νευροεξώδερμα. Ο παράγοντας αυτός αναγνωρίστηκε όταν βρέθηκε ότι επαρκεί για την διατήρηση της πολυδυναμίας σε mESCs στα οποία υπερεκφράζεται, απουσία του παράγοντα LIF. Το γονίδιο *Nanog* φέρει μια περιοχή homeobox η οποία εντοπίζεται σε μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. γονίδια HOX) και κωδικοποιεί μια περιοχή homeodomain (HD) που διαμεσολαβεί την πρόσδεση στο DNA και παράλληλα λειτουργεί ως σημείο πρόσδεσης άλλων πρωτεϊνών. Στον υποκινητή του φέρει μια περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου Oct4/Sox2, μια αλληλουχία TATA και θέσεις δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. AP-2, Sp1, TFIIID). Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης Nanog είναι πλούσιο σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και προλίνης τα οποία αποτελούν σημαντικά ρυθμιστικά σημεία φωσφορυλίωσης. Το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει μια περιοχή επαναλήψεων τρυπτοφάνης WD, όπου κάθε πέμπτο αμινοξύ είναι τρυπτοφάνη, και συμμετέχει στο διμερισμό (Allouba, ElGuindy, Krishnamoorthy, Yacoub, & Aguib, 2015).



Εικόνα 6.1.1 Δομή της πρωτεΐνης Nanog. Ο Nanog αποτελείται από περίπου 305 αμινοξέα και οργανώνεται σε ένα αμινοτελικό άκρο και ένα καρβοξυτελικό. Το αμινοτελικό άκρο περιέχει την περιοχή *homeodomain* (HD) η οποία διαμεσολαβεί την πρόσδεση στο DNA. Ανάμεσα στα δυο καρβοξυτελικά άκρα CD1 (C-terminal domain) και CD2 εντοπίζεται μια περιοχή υπεύθυνη για το διμερισμό του παράγοντα η οποία περιέχει επαναλήψεις τρυπτοφάνης (WD). (Chambers & Tomlinson, 2009)

Πειράματα σήμανσης του Nanog έδειξαν ότι εντοπίζεται κυρίως ως ομοδιμερές στα κύτταρα και αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες υπό αυτή την μορφή. Καθότι η ευεργετική για την πολυδυναμία δράση του προαπαιτεί τον διμερισμό του, προτάθηκε ότι ένας μηχανισμός διάσπασης του διμερούς θα οδηγεί στην απενεργοποίησή του και συνεπώς στη διαφοροποίηση. Πράγματι έχει βρεθεί χρονική συσχέτιση μεταξύ της έναρξης της διαφοροποίησης και της διάσπασης του Nanog από μια κασπάση (Saunders et al., 2013).

Η λειτουργία του Nanog, πέρα από τον διμερισμό του, ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα. Ίσως ο σημαντικότερος τρόπος ρύθμισής του σε επίπεδο μεταγραφής είναι η ιδιότητα που έχει να αυτορρυθμίζει την ενεργοποίηση και την καταστολή του. Η πρόσδεση του στον υποκινητή του παρουσία συν-ενεργοποιητών όπως οι Sox2 και Oct4 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γονιδιακής του μεταγραφής. Οι παράγοντες Oct4/Sox2 δεν είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του *Nanog* καθώς έχει βρεθεί ότι μπορεί να ενεργοποιείται ανεξάρτητα από αυτούς μέσω της πρωτεΐνης Zic3 (zinc finger of the cerebellum). Αντίστοιχα, όταν προσδένεται στον υποκινητή του παρουσία του συγκαταστολέα Zfp281 (zinc finger protein 281) η μεταγραφή του γονιδίου του καταστέλλεται (Saunders et al., 2013).

Διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής του *Nanog*. Στα mESCs η θετική ρύθμιση πραγματοποιείται στο εγγύς άκρο του υποκινητή του γονιδίου και περιέχει έναν ενισχυτή Oct-Sox ο οποίος είναι υψηλά συντηρημένος σε πολλά είδη θηλαστικών. Σημαντικοί μεταγραφικοί ενεργοποιητές είναι η SP-1 πρωτεΐνη (Κεφ. 4.3), η Esrrb η οποία προσδένεται στον υποκινητή μαζί με την Oct4 (Κεφ. 5.4), ο Zfp143 (zinc finger protein 143) ο οποίος ρυθμίζει την πρόσδεση του Oct4 στον υποκινητή, ο Klf4 (Κεφ. 5.2), ο Tbx3 (Κεφ. 5.3) και ο STAT3 που προσδένεται με τον Brachyury σε έναν ενισχυτή στην περιοχή του υποκινητή (Κεφ. 5.2). Στον αντίποδα της διαφοροποίησης εντοπίζονται παράγοντες που καταστέλλουν τη μεταγραφή του *Nanog* και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται

ο Tcf3 (Κεφ.5.4), το μέλος των πυρηνικών υποδοχέων Gcnf (germ cell nuclear factor) και ο μεταγραφικός παράγοντας Zfp281 (Saunders et al., 2013).

Το δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση του Nanog είναι ιδιαίτερα εκτενές και ευαίσθητο σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Σταδιακά όμως προκύπτουν αποτελέσματα ερευνών που καταδεικνύουν την αξία και των επιγενετικών τροποποιήσεων στη μεταγραφική του ρύθμιση. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο αποακετυλίωσης των ιστονών Sin3a/HDAC μπορεί να ενεργοποιεί τον Nanog όταν δρα μαζί με τον Sox2. Ακόμη, η ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών H4 Mof προσδένεται άμεσα στον Nanog και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του. Το ρυθμιστικό δίκτυο της ενεργότητας του Nanog καθίσταται ακόμη πιο πολύπλοκο αν ληφθεί ακόμη υπόψιν η επίδραση των μικρών μη κωδικών μορίων RNA ncRNA που έχουν ρόλο σε κάθε επίπεδο της ροής της γενετικής πληροφορίας, καθώς και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs). Μια σημαντική PTM είναι η φωσφορυλίωση αρκετών καταλοίπων Ser/Thr-Pro στο γονίδιο του Nanog οι οποίες προκαλούν την πρόσδεση του παράγοντα Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα μικρό μόριο που όταν προσδεθεί στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα του Nanog σταθεροποιεί τη δομή του και αποτρέπει την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Τόσο οι επιγενετικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όσο και η συνεισφορά των ncRNA βρίσκονται ακόμα στα αρχικά στάδια μελέτης (Saunders et al., 2013).

Σε μια μελέτη των Kim et al. του 2008 κατά την οποία διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του Nanog και άλλων παραγόντων πολυδυναμίας με περιοχές ενισχυτών σε υποκινητές, όχι όμως και των απομακρυσμένων σημείων πρόσδεσης, βρέθηκαν 1284 αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 6.2). Από την ανάλυση αυτών επιβεβαιώθηκε ο διπλός ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων που περιλαμβάνει την καταστολή των γονιδίων διαφοροποίησης και την ενεργοποίηση των γονιδίων πολυδυναμίας. Για παράδειγμα ο παράγοντας GATA-6 ο οποίος είναι απαραίτητος για την έκφραση γονιδίων του πρωτογενούς ενδοδέρματος υπόκειται σε άμεση καταστολή από τον Nanog, σε συνέργεια και με άλλους παράγοντες. Παράλληλα, η γνωστότερη επίδραση του Nanog με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του δικτύου OSN είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής των παραγόντων πολυδυναμίας Oct4 και Sox 2 και η παρουσία θετικών κύκλων ανατροφοδότησης μεταξύ τους (Orkin et al., 2008).

Πίνακας 6.1. Αριθμός ενισχυτών στους οποίους προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας

Πρωτεΐνη	Αριθμός ενισχυτών
Nanog	1284
Sox2	819
Oct4	783
Klf4	1790
Myc	3542

(Orkin et al., 2008)

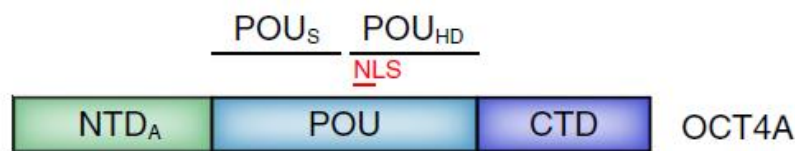
Ο Nanog συνήθως επιδρά στα γονίδια παρουσία άλλων πρωτεϊνών και σε πολλούς γονιδιακούς στόχους του παρατηρείται ταυτόχρονη πρόσδεση και των τριών παραγόντων OSN όπως οι επιγενετικοί ενεργοποιητές και καταστολείς. Ένας ιδιαίτερα μελετημένος παράγοντας είναι η υδροξυλάση μεθυλοκυτοσίνης TET1 η οποία επιστρατεύεται από τον Nanog και οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδιακών στόχων. Ακόμη έχει βρεθεί συνεντοπισμός και λειτουργική αλληλεπίδραση με την E3 λιγάση ουβικιτίνης Trim24 η οποία αναγνωρίζει τροποποιήσεις ιστονών και δρα ενεργοποιώντας γονίδια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής του DNA και καταστέλλοντας γονίδια διαφοροποίησης (Rafiee, Girardot, Sigismondo, & Krijgsveld, 2016).

6.2. OCT4

Ένας από τους πρώτους παράγοντες πολυδυναμίας που αναγνωρίστηκαν ήταν ο Oct4 και αποτελεί έναν από τους τέσσερις παράγοντες που απαιτούνται για τον επαναπρογραμματισμό διαφοροποιημένων κυττάρων στην αδιαφοροποίητη κατάσταση. Έχει διάφορους λειτουργικούς ρόλους στη διατήρηση της πολυδυναμίας και στην διαφοροποίηση και η απώλεια της έκφρασής του οδηγεί σε διαφοροποίηση προς τροφοβλαστική κατεύθυνση (Y.-Q. Li, 2017). Ο Oct4 αλληλεπιδρά και αλληλορυθμίζεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog και Sox2 σε ένα αυστηρά καθορισμένο πλαίσιο με τη συμμετοχή διάφορων παραγόντων και τροποποιήσεων. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του που τον κατατάσσει στους pioneer μεταγραφικούς παράγοντες είναι η ικανότητα του να αναγνωρίζει και να προσδένεται

στον γονιδιακό του στόχου σε κλειστή δομή χρωματίνης (Jerabek, Merino, Schöler, & Cojocaru, 2014).

Ο Oct4 (γνωστός και ως Oct3) είναι μέλος της υποοικογένειας πρωτεϊνών που προσδένονται σε οκταμερή (octamer-binding) μοτίβα DNA, της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων POU (pit-oct-unc), και κωδικοποιείται από το γονίδιο *POU5F1*. Συνολικά υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές του οι οποίες προκύπτουν ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα, αλλά μόνο η ισομορφή Oct4A (Εικόνα 6.2.1) εντοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την πολυδυναμία. Η συναινετική αλληλουχία στην οποία προσδένεται ο Oct4 είναι η ATGCAAAT και η αλληλεπίδραση αυτή συμβαίνει μέσω της περιοχής POU. Η περιοχή POU φέρει δυο δομές δέσμευσης DNA σε διαμόρφωση έλικα-στροφή-έλικα και διακρίνεται στις υποπεριοχές POU-specific domain (POU_S) και POU-homeodomain (POU_{HD}) οι οποίες συνδέονται μέσω ενός μεταβλητού συνδέτη. Η κάθε περιοχή αναγνωρίζει και προσδένεται στα νουκλεοτίδια ATGC και AAAT αντίστοιχα, τα οποία συνθέτουν την συναινετική αλληλουχία πρόσδεσης. Μέσω αυτής της περιοχής διαμεσολαβείτε και η πρόσδεση με συμπαραγόντες ενώ είναι ταυτόχρονα προσδεμένος στο DNA. Η αμινοτελική άκρη της περιοχής POU_{HD} περιέχει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και τα άκρα του μορίου αποτελούν της περιοχές που διαμεσολαβούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση (Jerabek et al., 2014).

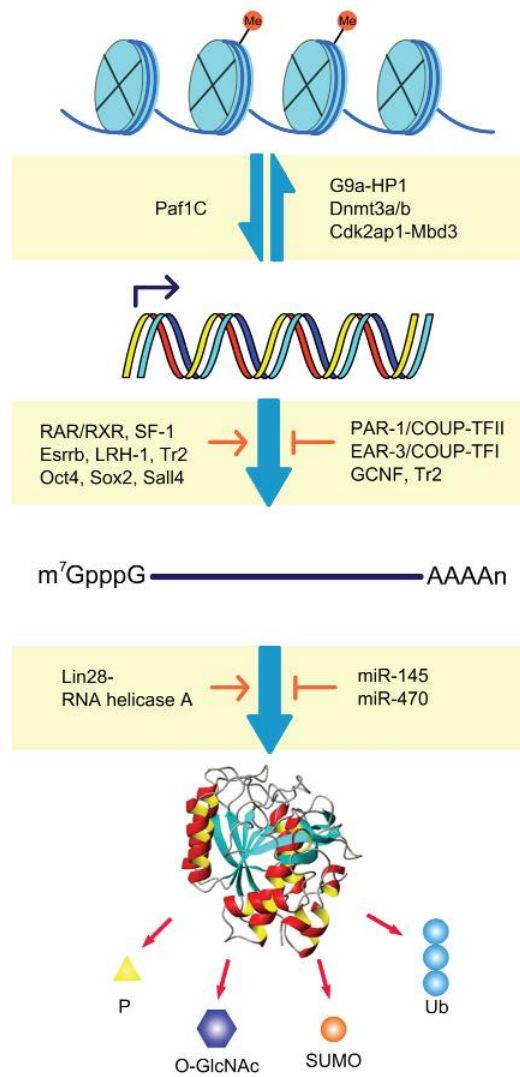


Εικόνα 4.2.1. Η δομή του μεταγραφικού παράγοντα Oct4. Ο Oct4 φέρει την περιοχή πρόσδεσης DNA POU που διακρίνεται στις περιοχές POU_S και POU_{HD}, η οποία μάλιστα φέρει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Το αμινοτελικό (NTD) και το καρβοξυτελικό (CTD) άκρο αποτελούν θέσεις με δράση μεταγραφικής ενεργοποίησης. (Jerabek et al., 2014)

Ο Oct4 αλληλεπιδρά με ένα πολύπλοκο δίκτυο παραγόντων και στοχεύει σε διάφορα γονίδια της πολυδυναμίας και της διαφοροποίησης. Η έκφρασή του στα ESCs κύτταρα είναι ιδιαίτερα σταθερή και ακόμη και μικρές αυξομειώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση. Συνεπώς είναι απαραίτητη η αυστηρή ρύθμιση της δράσης του στο κύτταρο ώστε να διατηρείται η πολυδυναμία αλλά και να επιτρέπεται σωστά η έξοδος προς την

διαφοροποίηση. Η ρύθμισή του περιλαμβάνει τροποποιήσεις της ιστονικής αρχιτεκτονικής καθώς και μετα-μεταγραφικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικ. 6.2.2). Σημαντικός τροποποιητής της χρωματίνης που δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής είναι ο Paf1C (polymerase-associated factor 1 complex) ο οποίος επάγει μια ανοιχτή διαμόρφωση. Αντίθετα η μεθυλοτρανσφεράση G9a προσθέτει ένα κατασταλτικό σήμα το οποίο προσελκύει την πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης HP1 (heterochromatin protein 1) που οδηγεί σε κλειστή διαμόρφωση χρωματίνης. Ως αποτέλεσμα αυτού, η Dnmt3α/β (DNA methyltransferase 3) μεθυλιώνει τον υποκινητή του *Oct4* καταστέλλοντας μόνιμα την έκφρασή του. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται από τις Cdk2ap1 (cyclin dependent kinase 2 associated protein 1) που αλληλεπιδρά με την Mbd3 (Methyl-CpG-binding domain protein 3) (Shi & Jin, 2010).

Στο επίπεδο της μεταγραφής έχουν βρεθεί δυο ομάδες που περιέχουν μεταγραφικούς παράγοντες και πυρηνικούς υποδοχείς οι οποίες δρουν αντίθετα. Η ομάδα των παραγόντων που συμπεριλαμβάνει τους Nanog, Esrrb, Lrh-1 (liver receptor homolog-1), Oct4, Sox2 και Sall4 (Sal-like protein 4) σε σύμπλοκα που περιγράφονται στο άρθρο Y.-Q. Li, 2017 ενεργοποιεί την έκφραση του Oct4, ενώ η ομάδα που συμπεριλαμβάνει τους Gcnf (germ cell nuclear factor) και Tr2 (testicular receptor 2) την καταστέλλει. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο η πρωτεΐνη Lin28 επιστρατεύει την RNA ελικάση A και ενεργοποιεί την μετάφραση. Αντίθετα σε αυτή δρουν κάποια miRNA, όπως τα miRNA145 και miRNA470. Τέλος, στις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις περιλαμβάνονται η γλυκοζυλίωση, η φωσφορυλίωση, η σουμοϋλίωση με κατασταλτικό ρόλο και η ουβικιτινυλίωση (Shi & Jin, 2010).



Εικόνα 6.2.2. Συνοπτική απεικόνιση των τροποποιήσεων που ρυθμίζουν την έκφραση της πρωτεΐνης *Oct4* (Shi & Jin, 2010).

Ο παράγοντας Oct4 δρα ως μονομερές, ομοδιμερές ή ετεροδιμερές όταν προσδένεται με τον Sox2. Οι Oct4 και Sox2 συνεισφέρουν στην πολυδυναμία ρυθμίζοντας από κοινού την μεταγραφή των γονιδίων τους καθώς και γονιδίων σχετικών με την πολυδυναμία, όπως ο Nanog (πιθανά μέσω του απομακρυσμένου εκκινητή), ο FGF4 και ο μεταγραφικός συνενεργοποιητής UTF1. Παρατηρήθηκε μάλιστα σε πειράματα σε hESCs ο συνεντοπισμός του παράγοντα Nanog στα γονίδια που επιδρά το ετεροδιμερές Oct4/Sox2. Μέσω πειραμάτων που βασίζονται στη φασματομετρία μάζας αναγνωρίστηκαν διάφοροι παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά ο Oct4 για την διατήρηση της πολυδυναμίας και αυτοί διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες: (i) μεταγραφικοί παράγοντες του κύριου μεταγραφικού δικτύου

πολυδυναμίας, (ii) τροποποιητές της δομής της χρωματίνης, (iii) στοιχεία των σηματοδοτικών μονοπατιών, (iv) μεταγραφική συν-ενεργοποιητές και στοιχεία μεταγραφικών συμπλόκων και (v) παράγοντες που συμμετέχουν στην αντιγραφή, την επιδιόρθωση και τον ανασυνδυασμό του DNA (Jerabek et al., 2014).

6.2 SOX2

Ο παράγοντας Sox2 έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας, κυρίως μέσω της ενίσχυσης των μηχανισμών που περιγράφηκαν για τους Nanog και Oct4. Δρα σε συνέργεια με αυτούς, και ιδιαίτερα με τον Oct4, ως καταστολέας των γονιδίων της διαφοροποίησης και ταυτόχρονα ως ενεργοποιητής των γονιδίων πολυδυναμίας. Η πρωτεΐνη Sox2 (sex determining region Y-box2) ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Sox, τα μέλη της οποίας φέρουν μια υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης του DNA που καλείται HMG (High-mobility group) (Εικ. 6.2.1). Η περιοχή αυτή συναντάται κυρίως σε μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με διαδικασίες που εξαρτώνται από το DNA όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η επιδιόρθωση. Αποτελείται από τρεις α-έλικες που διαχωρίζονται από βρόχους και εξυπηρετεί επιπλέον και τη δέσμευση με άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα η σύνδεση των παραγόντων Oct4 και Sox2 συμβαίνει ανάμεσα στις αντίστοιχες περιοχές POU και HMG (S. Zhang, 2014). Σε αυτή την περιοχή προσδένονται ακόμα και σήματα εισόδου (NIS) και εξόδου (NES) από τον πυρήνα, ρυθμίζοντας έτσι τον Sox2. Εκτός από τη θέση δέσμευσης του DNA, ο Sox2 φέρει και την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης η οποία προσδέεται σε υποδοχείς γονιδίων και μπορεί να προκαλέσει την αναστολή ή την ενεργοποίησή τους (Weina & Utikal, 2014).

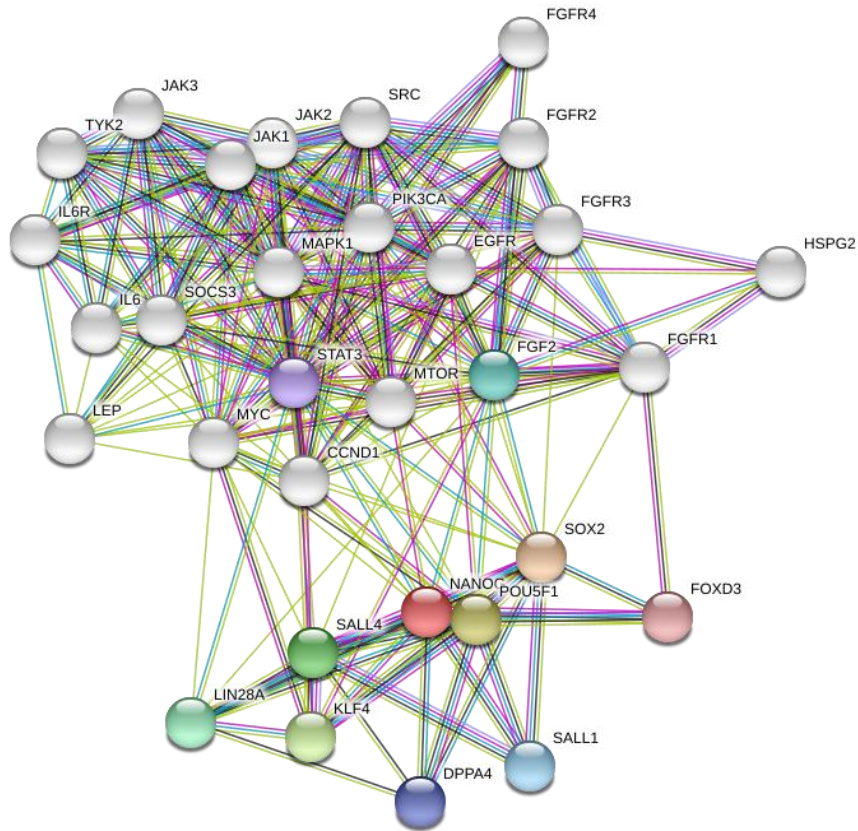


Εικόνα 6.2.1. Πρωτεϊνική δομή Sox2. Προσαρμοσμένη από (Weina & Utikal, 2014)

Όπως και ο Oct4, έτσι και ο Sox2 είναι ένας δοσο-εξαρτώμενος παράγοντας όπου μικρές αυξομειώσεις στα επίπεδά του μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολή της κατάστασης πολυδυναμίας ενός κυττάρου. Η μεταγραφή του ελέγχεται από έναν υποκινητή και δυο

απομακρυσμένους ενισχυτές. Ένας θετικός ανατροφοδοτικός μηχανισμός έχει αναγνωρισθεί κατά τον οποίο ο Sox2 συγκροτεί ένα ρυθμιστικό σύμπλοκο με τον Oct4 και μαζί προσδένονται σε μια περιοχή του υποκινητή του Sox2 και ενεργοποιούν τη μεταγραφή. Σε αυτό το σημείο συμβαίνει ενσωμάτωση των εσωκυτταρικών μεταγραφικών δικτύων και των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από εξωτερικά ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, στα σύμπλοκα Sox2/Oct4 του ανατροφοδοτικού μηχανισμού συμμετέχουν παράγοντες που επάγονται από την πρόσδεση αναπτυξιακών παραγόντων και σε αυτούς περιλαμβάνονται η Stat3 και Smad1 για τα mESC και Smad3 για τα hESC (S. Zhang, 2014).

Η έκφραση και η ενεργότητα του Sox2 ρυθμίζονται επίσης από μετα-μεταγραφικούς και μεταφραστικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα το miRNA-145 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας Oct4 και Klf4 και έχει βρεθεί ότι μειώνει την έκφραση και του Sox2. Σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, οι πρωτεΐνες Sox2 μπορούν να τροποποιηθούν με φωσφορυλλίωση, μεθυλίωση, ακετυλίωση και σουμοϋλίωση με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η λειτουργία τους ως μεταγραφικών παραγόντων. Έχουν βρεθεί δυο μηχανισμοί αρνητικής ρύθμισης της λειτουργίας της Sox2 μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Αφενός, η φωσφορυλλίωση της Sox2 στα κατάλοιπα S249, S250 και S251 έχει ως αποτέλεσμα τη σουμοϋλίωσή της που αποτρέπει την πρόσδεση στο DNA και η ακετυλίωση από την ακετυλοτρανσφεράση ιστονών p300, ωθεί την πυρηνική της έξοδο με αποτέλεσμα να σημαίνεται για πρωτεασομική αποδόμηση (S. Zhang, 2014).

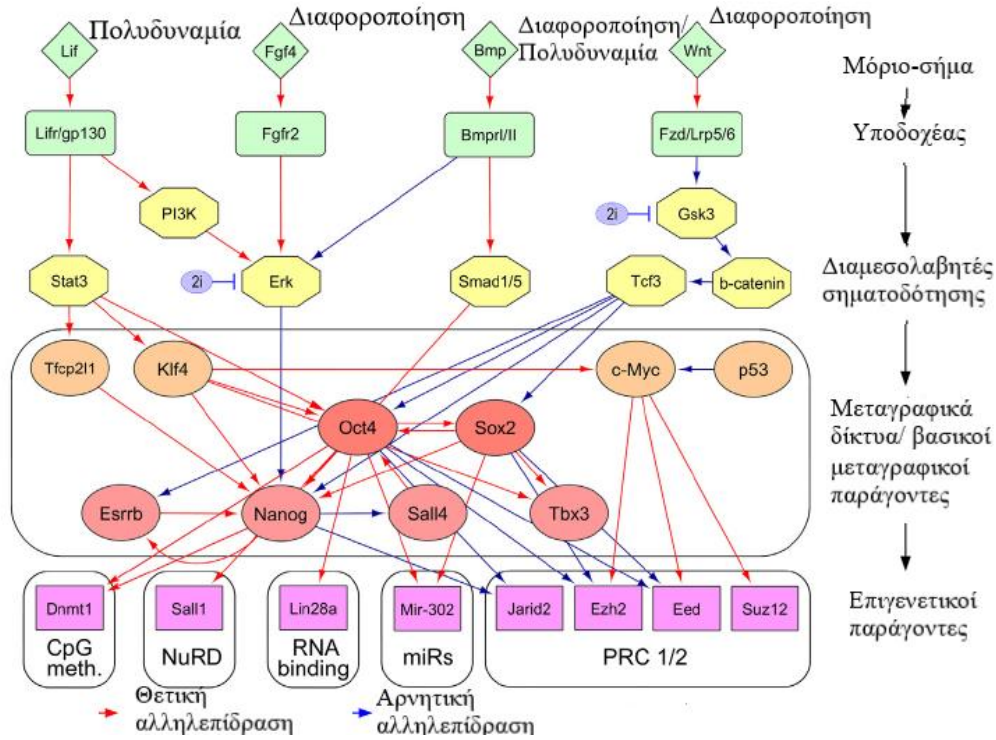


Εικόνα 6.4.1 Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με βασικό μόριο τον μεταγραφικό παράγοντα *Nanog*. Οι κόμβοι παρουσιάζουν πρωτεΐνες με τις οποίες έχει διαπιστωθεί αλληλεπίδραση ή/και έχει προβλεφθεί με υπολογιστικά μοντέλα το οποίο διευκρινίζεται από το χρώμα των μεταξύ τους ακμών. (Γαλάζιο, ροζ: πειραματικά εξακριβωμένες αλληλεπιδράσεις, πράσινο, κόκκινο, μπλε: προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις, μαύρο: συνέκφραση, μωβ: ομολογία πρωτεϊνών) (Βάση δεδομένων STRING)

6.4 Ανατροφοδοτικός έλεγχος της πολυδυναμίας μέσω των επιγενετικών και μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων

Σε ένα πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης των Papatsenko, et. al, 2018 παρουσιάστηκε μια πολυεπίπεδη δομή του δικτύου πολυδυναμίας των mESCs κατά την οποία το δίκτυο συντίθεται από έναν αριθμό ιεραρχικών επιπέδων τα οποία διασυνδέονται μέσω θετικών και αρνητικών ανατροφοδοτικών μηχανισμών. Τα επίπεδα αυτά είναι τέσσερα και περιλαμβάνουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια, τους διαμεσολαβητές αυτών (πρωτεΐνες-τελεστές), τα μεταγραφικά δίκτυα καθώς και επιγενετικούς παράγοντες που ρυθμίζουν τις μετα-μεταγραφικές

διαδικασίες. Ένα παράδειγμα αυτής της οργάνωσης απεικονίζεται στην Εικόνα 6.4.1 (Papatsenko et al., 2018).



Εικόνα 6.4.1. Ιεραρχική δομή του δικτύου πολυδυναμίας (Papatsenko et al., 2018).

Μέχρι εδώ έχουν αναλυθεί τα πρώτα τρία επίπεδα αυτής της προτεινόμενης αρχιτεκτονικής, αλλά είναι ιδιαίτερης σημασίας και οι παράγοντες που επάγονται σε απόκριση των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας και διαμεσολαβούν τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και εγκαθιδρύουν ανατροφοδοτικούς μηχανισμούς. Σε αυτούς περιλαμβάνονται παράγοντες οι οποίοι συμμετέχουν στην επιγενετική τροποποίηση των ιστονών (ακετυλίωση, φωσφορυλλίωση, ουβικιτινυλίωση και σουμοϋλίωση), στη μεθυλίωση των υποκινητών γονιδίων, πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (RNA-binding proteins) καθώς και τα microRNA. Η έκφραση αυτών των παραγόντων ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας με τους οποίους μπορούν να δρουν σε συνέργεια για την διατήρηση της (Papatsenko et al., 2018).

Ιστονικές τροποποιήσεις

Τα σύμπλοκα PRC1 (polycomb repressive complex 1) και PRC2 ελέγχουν την έκφραση των γονιδιακών στόχων τους μέσω της εισαγωγής τροποποιήσεων στις ιστόνες. Μια αρκετά μελετημένη τροποποίηση είναι η τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (H3K27me3) που οδηγεί σε κλειστή διαμόρφωση χρωματίνης και συνεπώς καταστολή της έκφρασης. Οι σημαντικότερες υπομονάδες αυτών των συμπλόκων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Jarid2 που διαμεσολαβεί την επιστράτευση των PRC και το ένζυμο N-μεθυλοτρανσφεράση Ezh2 που προσθέτει μεθυλομάδες στη λυσίνη 27 της ιστόνης H3. Τα σύμπλοκα PRC είναι απαραίτητα για την καταστολή γονιδίων πολυδυναμίας κατά τη διαφοροποίηση ενώ έχει χαρακτηριστεί η σχέση τους με τους παράγοντες πολυδυναμίας καθότι αλληλορυθμίζονται. Κατά την απουσία μάλιστα του παράγοντα Ezh2 από τα κύτταρα παρατηρείται σημαντική μείωση των κατασταλτικών μεθυλίωσεων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου Nanog που επιτρέπει την ενεργοποίηση της έκφρασης του Nanog. Συνεπώς τα σύμπλοκα PRC συμμετέχουν άμεσα στη ρύθμιση της μεταγραφής των παραγόντων πολυδυναμίας (Papatsenko et al., 2018).

Μεθυλίωση του DNA

Κατά την εμβρυογένεση παρατηρείται μια δυναμική μεταβολή των επιπέδων μεθυλίωσης όπου αρχικά συμβαίνει μια απότομη μείωση από το ζυγωτό μέχρι την εμφύτευση η οποία ακολουθείται από αύξηση και εγκαθίδρυση ενός νέου μοτίβου μεθυλίωσης στην πλειοψηφία των γονιδιακών τόπων (εξάιρεση αποτελούν τα αποτυπωμένα γονίδια). Συνεπώς υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης πολυδυναμίας ενός κυττάρου με την μεθυλίωση του γονιδιώματός του (He, Chen, & Zhu, 2011). Σημαντικοί παράγοντες που ρυθμίζουν αυτή τη διαδικασία είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT και συγκεκριμένα οι Dnmt3a και Dnmt3b που διαμεσολαβούν την de novo μεθυλίωση και ο Dnmt1 που διατηρεί τη μεθυλίωση κατά την αντιγραφή του DNA. Αυτά τα ένζυμα ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct 4 και Sox2 είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω επαγωγής της έκφρασης κάποιων microRNA (miRNA 290-295). Ακόμη ένα σημαντικό ένζυμο που μεταβάλλει τη μεθυλίωση είναι η διοξυγενάση Tet1 που μετατρέπει την 5-μεθυλοκυτοσίνη σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται άμεσα από τους Oct4 και Nanog (Papatsenko et al., 2018).

Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις

Τα μικρά μη-κωδικοποιά microRNA συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο καθώς μπορούν να προσδένουν το mRNA τους και να αποσιωπούν την έκφρασή τους με διάφορους μηχανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης των βασικών παραγόντων πολυδυναμίας και σημαντικά ανάμεσα σε αυτά, με αρνητική ή θετική επίδραση, είναι τα let-7, miR-302 και miR-145. Θετικοί κύκλοι ανατροφοδότησης έχουν παρατηρηθεί ανάμεσα στους παράγοντες πολυδυναμία Oct4, Sox2 και cMyc με την αλληλεπίδραση με τον let-7 και την πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA Lin28a. Ο Oct4 επάγει την έκφραση της Lin28a η οποία αποτρέπει την ωρίμανση του miRNA let-7. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της έκφρασης του παράγοντα πολυδυναμίας cMyc, τον οποίο η let-7 στοχεύει προς αποδόμηση. Ακόμη ένα δίκτυο ανατροφοδοτικού μηχανισμού παρατηρείται ανάμεσα στους Oct4, miR-302 και Nr2f2. Συγκεκριμένα ο Oct4 ενεργοποιεί την έκφραση του miR-302 το οποίο καταστέλλει τον πυρηνικό υποδοχέα Nr2f2 ο οποίος καταστέλλει την έκφραση του Oct4. Τέλος έχει βρεθεί το κατασταλτικό για τον Oct4 miR-145 το οποίο ανταγωνίζεται ένα μακρύ μη-κωδικοποιό RNA το οποίο καλείται Linc-RoR (long intergenic non-protein coding RNA-regulator of reprogramming) καθώς αναγνωρίζουν τις ίδιες περιοχές του Oct4 (Papatsenko et al., 2018).

7. ΕΠΑΓΩΜΕΝΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (iPSCs)

Μέσω της διαδικασίας του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού είναι πλέον εφικτή η δημιουργία επαγόμενων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) από σωματικά κύτταρα μέσω της υπερέκφρασης τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων. Από αυτά τα κύτταρα είναι εφικτό να προκύψουν πρακτικά όλοι οι τύποι κυττάρων και ιστών μέχρι και τη δημιουργία ενός ολόκληρου οργανισμού. Οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού βρέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Shinya Yamanaka το 2006. Ήδη τότε ήταν γνωστά κάποια γονίδια που σχετίζονταν με την πολυδυναμία έπειτα από πρωτομικές αναλύσεις σε ESCs. Κάποια από αυτά εισήχθησαν σε ινοβλάστες ποντικού *in vitro* με τη χρήση ιϊκών φορέων. Ως αποτέλεσμα, η τεχνητή παρουσία των παραγόντων Oct4, Sox2, Klf4 και cMyc, στα διαφοροποιημένα κύτταρα προσέδωσε σε αυτά πολυδυναμία με μεταβολές στη μορφολογία και την γονιδιακή έκφραση (Orqueda, Giménez, & Pereyra-bonnet, 2016).

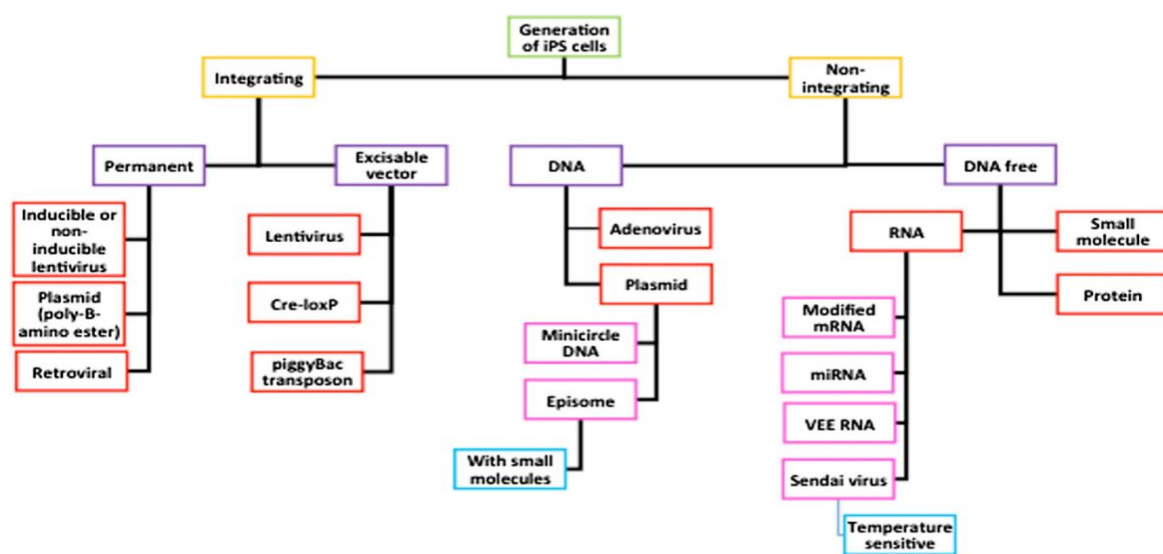
Η μέθοδος αυτή παρέχει στους ερευνητές πρόσβαση σε πολυδύναμα κύτταρα χωρίς να υπάρχουν νομικά και ηθικά θέματα που συναντώνται στη χρήση αυτών. Αμέσως μετά την ανακάλυψη τους το 2006 εκατοντάδες ερευνητικά κέντρα ξεκίνησαν πειράματα για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων αυτών των κυττάρων καθώς και της δυνατότητας παραγωγής τους. Παρά τον αρχικό ενθουσιασμό, ανέκυψαν δυσκολίες και στις δυο αυτές κατευθύνσεις. Αφενός διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στο γονιδίωμα και στην επιγενετική κατάσταση ανάμεσα στα iPSCs και στα ESCs. Αφετέρου η παραγωγή τους, παρότι έχει διευκρινιστεί και εμπλουτιστεί με νέες τεχνικές, ενέχει το μειονέκτημα της αποδοτικότητας καθώς και της πιθανότητας μερικού επαναπρογραμματισμού. Τα προβλήματα αυτά μπορεί να μείωσαν το δυναμικό των iPSCs για κλινική εφαρμογή αλλά παραμένουν ένα πολύ ισχυρό εργαλείο της έρευνας σε τομείς όπως η αναπτυξιακή βιολογία (Menon, Shailendra, Renda, Longaker, & Quarto, 2016).

Αρχικά, τα πρώτα iPSCs παρήχθησαν με τη διαμόλυση ινοβλαστών ποντικού και ανθρώπου με τη χρήση ιϊκών φορέων για την εισαγωγή των παραγόντων Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc). Για τα ανθρώπινα κύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι η πολυδυναμία επάγεται μέσω των παραγόντων Oct4, Sox2 και Nanog. Οι ιϊκοί φορείς παρότι έχουν μεγάλα ποσοστά ενσωμάτωσης, απαιτούν αυστηρά πρωτόκολλα βιοασφαλείας ενώ υπάρχει η πιθανότητα ενσωμάτωσης ξένου DNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Συνεπώς προέκυψε η ανάγκη εύρεσης

νέων τεχνικών που δεν περιέχουν την ενσωμάτωση των γονιδίων πολυδυναμίας (Orqueda et al., 2016).

Η χρήση κυκλικών πλασμιδίων για την έκφραση των παραγόντων Yamanaka έχει κάποια πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης ιϊκών φορέων. Αρχικά, η δημιουργία τους είναι εύκολη και η εισαγωγή τους στα κύτταρα επιτυγχάνεται με ηλεκτροδιάτρηση. Επίσης, τα κυκλικά πλασμίδια χάνονται μετά από κάποιες κυτταρικές διαιρέσεις και ο επαναπρογραμματισμός συντηρείται από ενδογενής μεταγραφικούς παράγοντες χωρίς την ενσωμάτωση γονιδίων. Μια μέθοδος είναι η εισαγωγή των mRNA των τεσσάρων παραγόντων, η οποία παρότι μη αποδοτική και χρονοβόρα, αποτελεί την ασφαλέστερη μέθοδο για κλινικές εφαρμογές των iPSCs (Orqueda et al., 2016).

Πριν μερικά χρόνια σχεδιάστηκε μια διαφορετική προσέγγιση στην δημιουργία των iPSCs, με τη χρήση μικρών, μεμβρανοδιαπερατών, μη ανοσογενών μορίων. Ένας συνδυασμός τέτοιων μορίων που χρησιμοποιείται σε ινοβλάστες ποντικού αποτελείται από τον αναστολέα CHIR της GSK-3, τον αναστολέα 616452 του TGF- β , τον αγωνιστή Forskolin της cAMP και τον αναστολέα DZNep της υδρολάσης του αμινοξέος SAH (S-adenosylhomocysteine). Ο συνδυασμός CHIR/616452/Forskolin/DZNep οδηγεί στη δημιουργία κυττάρων που εκφράζουν σχεδόν όλους τους μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζονται στα ESCs και που έχουν παρόμοια διάρκεια κυτταρικού κύκλου με αυτά. Κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η πολύ χαμηλή αποδοτικότητα (Orqueda et al., 2016). Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί συνοψίζονται στην Εικόνα 7.1.



Εικόνα 5.1. Μέθοδοι εισαγωγής των παραγόντων Yamanaka σε σωματικά κύτταρα για την παραγωγή των iPSCs.

Διάφορες συγκριτικές μελέτες έχουν γίνει στις οποίες αναλύεται η μοριακή κατάσταση των ESCs και των iPSCs. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα κύτταρα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους παρότι και τα δυο είναι πολυδύναμα και έχουν το ίδιο αναπτυξιακό δυναμικό και διαφοροποιούνται και προς τις τρεις βλαστικές στιβάδες. Για παράδειγμα έχουν εντοπιστεί διαφορές στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, στη μεθυλίωση του DNA (αυξημένη στα iPSCs), στην επιγενετική μνήμη (αυξημένη στα iPSCs) καθώς και στην σταθερότητα του πολυδύναμου φαινοτύπου με την πάροδο του χρόνου (Spinelli, Guillot, & Coppi, 2013). Παρά την ύπαρξη αυτών των μειονεκτημάτων όμως, οι χρήσεις των iPSCs είναι ιδιαίτερα σημαντικές και διαρκώς αυξάνονται. Οι δυο πιο μελετημένες εφαρμογές τους, πέραν της ερευνητικής τους αξίας περιλαμβάνει τη δημιουργία μικροοργανιδίων (microorganoids) για τη μοντελοποίηση ασθενειών και τη διαλογή φαρμάκων και τη δημιουργία, σε συνέργεια με το σύστημα CRISPR/Cas9, εξατομικευμένων κυτταρικών και γονιδιακών θεραπειών (Menon et al., 2016).

Ένα από τα πλεονεκτήματα των iPSCs είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν με περισσότερη ασφάλεια σε ενδεχόμενη κλινική εφαρμογή καθώς αποτελούν αυτόλογη πηγή και εξασφαλίζεται η ιστοσυμβατότητα. Επίσης, σε αντίθεση με τα ESCs, δεν προέρχονται από το έμβρυο αλλά μπορούν να παραχθούν από οποιονδήποτε τύπο κυττάρου. Όμως, ένα σημαντικό τους μειονέκτημα που έχει παρατηρηθεί είναι ότι μπορεί να ενεργοποιηθούν ογκογονίδια και να συσσωρευθούν μεταλλάξεις με αποτέλεσμα τον σχηματισμό τερατωμάτων. Επίσης η τυποποίηση της δημιουργίας τους ακόμη δεν είναι ικανοποιητική με αποτέλεσμα να μην μπορούν πάντα να αναπαραχθούν τα αποτελέσματα πειραμάτων. Τέλος ακόμη ένα σημαντικό μειονέκτημα, είναι το μεγάλο κόστος και ο χρόνος που απαιτούνται για τη δημιουργία τους (Pappas & C Yang, 2008).

8. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΗΜΕΡΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν μια κατηγορία κυττάρων που χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης προς όλες τις βλαστικές στιβάδες. Η διαλεύκανση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την πολυδυναμία των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων έχει καίρια σημασία για την αξιοποίησή τους και την κλινική τους εφαρμογή. Η μελέτη τους μέχρι και σήμερα έχει αποσαφηνίσει διάφορα σημαντικά μοριακά και κυτταρικά γεγονότα της πρώιμης εμβρυογένεσης και έχει αποτελέσει πυλώνα της ανάπτυξης των τομέων της Αναπτυξιακής και της Κυτταρικής Βιολογίας (Menon et al., 2016).

Παρότι η κλινική εφαρμογή των ESCs δεν είναι ευρεία, υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες έχει εγκριθεί η χρήση τους. Ένας τομέας ο οποίος στηρίζεται στα βλαστικά κύτταρα είναι η Αναγεννητική Ιατρική η οποία στοχεύει στην λειτουργική αποκατάσταση των ιστών ή των οργάνων ασθενών με σοβαρά τραύματα ή χρόνιες παθήσεις. Για παράδειγμα, ήδη εφαρμόζεται η μεταμόσχευση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων σε άτομα με παραπληγία και τετραπληγία με αποτέλεσμα την βελτίωση του ελέγχου του σώματος και της ισορροπίας. Ταυτόχρονα, μέσω της μελέτης μονοπατιών που ρυθμίζουν την πολυδυναμία και των αλληλεπιδράσεων των διάφορων στοιχείων τους, έχουν βρεθεί κατάλληλοι στόχοι για την παρέμβαση σε αυτά με σκοπό την δέσμευση των κυττάρων προς μια συγκεκριμένη αναπτυξιακή κατεύθυνση. Μέσω της κατευθυνόμενης διαφοροποίησης των ESCs αλλά και των iPSCs είναι θεωρητικά εφικτή η παραγωγή κάθε τύπου κυττάρου. Στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ή τα iPSC μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή συγκεκριμένων κυτταρικών για την ανάπλαση ενός οργάνου (Mahla, 2016).

Παρότι η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση αποτελεί μια πολύπλοκη τεχνική που ακόμη αναπτύσσεται έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα PSC-derived κύτταρα για διάφορες μελέτες. Ειδικότερα, μπορούν να δημιουργηθούν συγκεκριμένα κύτταρα σχετιζόμενα με μια ασθένεια, που φυσιολογικά θα ήταν δύσκολο να αποκτηθούν, και να ακολουθήσει μελέτη της τοξικότητας ενός φαρμάκου στα κύτταρα. Ακόμη, είναι εφικτό να δημιουργηθούν κύτταρα-μοντέλα συγκεκριμένων ασθενειών και να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των μοριακών μηχανισμών και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων (Deshmukh et al., 2012)(Menon et al., 2016).

Συμπερασματικά, τα ESCs είναι απαραίτητα για την μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης, για την Αναγεννητική Ιατρική, για την μοντελοποίηση ασθενειών καθώς και για την φαρμακολογική και τοξικολογική μελέτη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

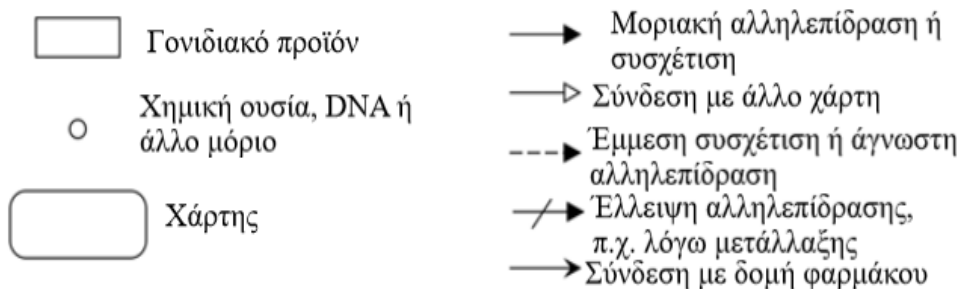
Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα απομονώνονται από την έσω κυτταρική μάζα του πρώιμου προ-εμφυτευτικού εμβρύου και, όπως όλα τα βλαστικά κύτταρα, έχουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης. Καθότι είναι πολυδύναμα ως προς το αναπτυξιακό τους δυναμικό, είναι ικανά να διαφοροποιούνται και προς τις τρεις βλαστικές στιβάδες (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα) από τις οποίες προκύπτουν όλοι οι τύποι κυττάρων. Η ιδιότητα της πολυδυναμίας αποτελεί αντικείμενο εκτενούς μελέτης, αφενός για την διερεύνηση των μηχανισμών της εμβρυογένεσης, και αφετέρου για την αξιοποίησή της σε κλινικές εφαρμογές όπως η ανάπλαση ιστών. Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται η δομή και η ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στη διατήρηση της πολυδυναμίας στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικού. Ακόμα, αναλύεται το δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας που ενεργοποιείται καθοδικά της σηματοδοτικής οδού, το οποίο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ρυθμιστικών ανατροφοδοτικών μηχανισμών, ευαίσθητων σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα.

ABSTRACT

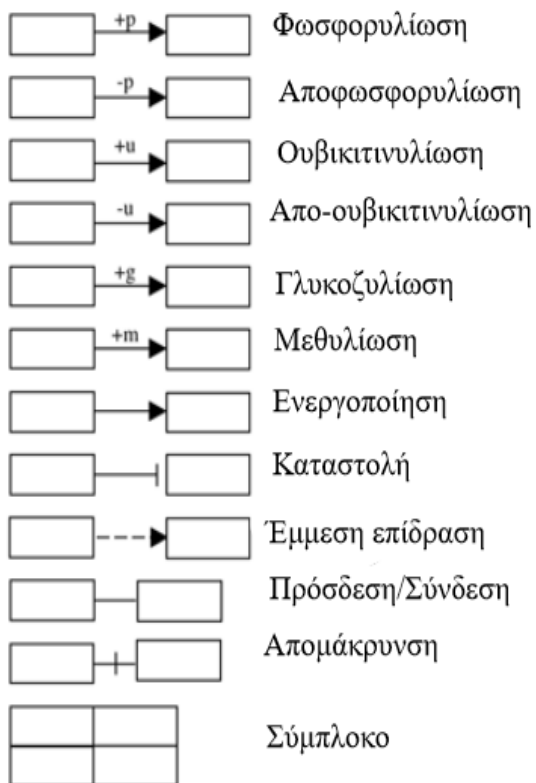
Embryonic stem cells are isolated from the inner cell mass of the early pre-implantation embryo and, like all stem cells, they can self-renew and differentiate. Because ESCs are pluripotent in terms of developmental potential, they are able to differentiate into all three germ layers (exoderm, mesoderm, endoderm) which give rise to all somatic cell types. The property of pluripotency has been extensively studied to elucidate the mechanisms involved in embryogenesis and for establishing clinical applications (e.g. tissue regeneration) as well. In this thesis, the structure and regulation of major signalling pathways involved in pluripotency maintenance, in human and mouse embryonic stem cells, are presented. In addition, the pluripotency transcription factor network, that is activated downstream to the signalling path, is analysed and stimuli-sensitive feedback mechanisms are also presented.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

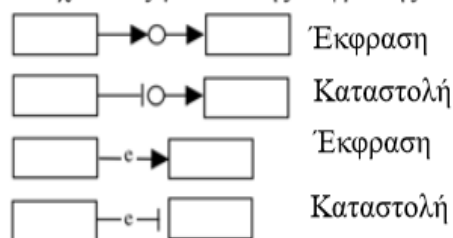
ΥΠΟΜΝΗΜΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ KEGG Pathway Database



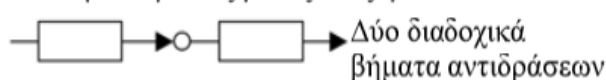
Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών



Συσχετίσεις γονιδιακής έκφρασης



Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμων



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allouba, M. H., ElGuindy, A. M., Krishnamoorthy, N., Yacoub, M. H., & Aguib, Y. E. (2015). NaNog: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Global Cardiology Science & Practice*, 2015(3), 36. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2015.36>
- Andrews, P. W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1420), 405–417. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1058>
- Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., ... Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
- Bantounas, I., Ranjzad, P., Tengku, F., Silajdžić, E., Forster, D., Asselin, M. C., ... Kimber, S. J. (2018). Generation of Functioning Nephrons by Implanting Human Pluripotent Stem Cell-Derived Kidney Progenitors. *Stem Cell Reports*, 10(3), 766–779. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.008>
- Barroso-delJesus, A., Lucena-Aguilar, G., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., & Menendez, P. (2011). The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. *The FASEB Journal*, 25(5), 1497–1508. <https://doi.org/10.1096/fj.10-172221>
- Becerra-Díaz, M., Valderrama-Carvajal, H., & Terrazas, L. I. (2011). Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1371–1381. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1371>
- Benezra, R., Henke, E., Ciarrocchi, A., Ruzinova, M., Solit, D., Rosen, N., ... De Candia, P. (2005). Induction of complete regressions of oncogene-induced breast tumors in mice. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70(February), 375–381. <https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.006>
- Berg JM, Tymoczko JL, S. L. (2002). *Signal-Transduction Pathways: An Introduction to Information Metabolism*. (5th ed.). New York: W H Freeman;
- Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N. C., Moreno, I., Burks, D., ... Vallier, L. (2015). Activin/Nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate

- decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes and Development*.
<https://doi.org/10.1101/gad.255984.114>
- Bhavanasi, D., & Klein, P. S. (2016). Wnt Signaling in Normal and Malignant Stem Cells. *Curr Stem Cell Rep.*, 2(4), 379–387. <https://doi.org/10.1515/jci-2013-0007>. Targeted
- Boeira, V. L. S. Y., Souza, E. S., Rocha, B. de O., Oliveira, P. D., Oliveira, M. de F. S. P. de, Rêgo, V. R. P. de A., & Follador, I. (2013). Inherited epidermolysis bullosa: clinical and therapeutic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(2), 185–198. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962013000200001>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3, 730. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Bos, J., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs : Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.010>
- Branden, C., & Tooze, J. (1999). Introduction to protein structure (2nd ed., pp. 343-344,384-386). Garland Publishing Inc.
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the Genome Homologous Recombination by From ES Cells to Germ Line Chimera. *Science*, 244(4910), 1288–1292. <https://doi.org/10.1126/science.2660260>
- Chambers, I., & Tomlinson, S. R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*, 136(14), 2311–2322. <https://doi.org/10.1242/dev.024398>
- Chen, Y. G., Li, Z., & Wang, X. F. (2012). Where PI3K/Akt meets smads: The crosstalk determines human embryonic stem cell fate. *Cell Stem Cell*, 10(3), 231–232. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.008>
- Coudreuse, D., & Korswagen, H. C. (2007). The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134(1), 3–12. <https://doi.org/10.1242/dev.02699>

- Coutu, D. L., & Galipeau, J. (2011). Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging*, 3(10), 920–933. <https://doi.org/10.18632/aging.100369>
- Dahéron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, W. M., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J., & Daley, G. Q. (2004). LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-770>
- Dalton, S. (2014). Signaling networks in human pluripotent stem cells, 25(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.09.005>. Signaling
- Deshmukh et al. (2012). Drug Discovery Models and Toxicity Testing Using Embryonic and Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Cardiac and Neuronal Cells.pdf.
- Ding, V. M. Y., Ling, L., Natarajan, S., Yap, M. G. S., Cool, S. M., & Choo, A. B. H. (2010). FGF-2 Modulates Wnt Signaling in Undifferentiated hESC and iPS Cells Through Activated PI3-K / GSK3 b Signaling. <https://doi.org/10.1002/jcp.22214>
- Dodsworth, B. T., Flynn, R., & Cowley, S. A. (2015). The current state of Naïve human pluripotency. *Stem Cells*, 33(11), 3181–3186. <https://doi.org/10.1002/stem.2085>
- Dvorak, P., Dvorakova, D., Koskova, S., Vodinska, M., Najvirtova, M., & Krekac, D. (2005). Expression and Potential Role of Fibroblast Growth Factor 2 and Its Receptors in Human Embryonic Stem Cells, 1200–1211. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0303>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Fábián, Á., Vereb, G., & Szöllosi, J. (2013). The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: Markers, pathways and therapy. *Cytometry Part A*, 83 A(1), 62–71. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22206>
- Fagnocchi, L., Cherubini, A., Hatsuda, H., Fasciani, A., Mazzoleni, S., Poli, V., ... Zippo, A. (2016). A Myc-driven self-reinforcing regulatory network maintains mouse embryonic stem cell identity. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11903>
- Fernandez-Alonso, R., Bustos, F., Williams, C. A. C., & Findlay, G. M. (2017). Protein Kinases in Pluripotency—Beyond the Usual Suspects. *Journal of Molecular Biology*, 429(10), 1504–1520. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.04.013>

- Festuccia, N., Owens, N., & Navarro, P. (2017). Esrrb, an estrogen-related receptor involved in early development, pluripotency, and reprogramming. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12826>
- Foster, D. A., Yellen, P., Xu, L., & Saqcena, M. (2011). Regulation of G1 cell cycle progression: Distinguishing the restriction point from a nutrient-sensing cell growth checkpoint(s). *Genes and Cancer*, *1*(11), 1124–1131. <https://doi.org/10.1177/1947601910392989>
- Furue, M. K., Tateyama, D., Kinehara, M., Na, J., Okamoto, T., & Sato, J. D. (2010). Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, *46*(7), 573–576. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9317-z>
- Gaarenstroom, T., & Hill, C. S. (2014). TGF- β signaling to chromatin: How Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.009>
- Galat, A. (2011). Common structural traits for cystine knot domain of the TGF β superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0643-4>
- Gentry, L., Samatar, A. A., & Der, C. J. (2013). *Inhibitors of the ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for Targeting RAS Mutant Cancers*. *Enzymes* (1st ed., Vol. 34). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420146-0.00004-4>
- Gotoh, N. (2008). Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Science*, *99*(7), 1319–1325. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00840.x>
- Graf, U., Casanova, E. A., & Cinelli, P. (2011). The role of the leukemia inhibitory factor (LIF) - Pathway in derivation and maintenance of murine pluripotent stem cells. *Genes*, *2*(1), 280–297. <https://doi.org/10.3390/genes2010280>
- Gregory, M. A., Qi, Y., & Hann, S. R. (2003). Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 Controls c-Myc Proteolysis and Subnuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(51), 51606–51612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310722200>

- Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research*. (2005). <https://doi.org/10.17226/11278>
- Gurdon, J. B. (1968). Transplanted nuclei and cell differentiation. *Scientific American*, 219(6), 24–35. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1268-24>
- He, X., Chen, T., & Zhu, J. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Nature Publishing Group*, 21(3), 442–465. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.23>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB / Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), 1–4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Hindley, C., & Philpott, A. (2013). The cell cycle and pluripotency. *Biochemical Journal*, 451(2), 135–143. <https://doi.org/10.1042/BJ20121627>
- Hirai, H., Karian, P., & Kikyo, N. (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochemical Journal*, 438(1), 11–23. <https://doi.org/10.1042/BJ20102152>
- Hirsch, T., Rothoef, T., Teig, N., Bauer, J. W., Pellegrini, G., De Rosa, L., ... De Luca, M. (2017). Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*, 551(7680), 327–332. <https://doi.org/10.1038/nature24487>
- Huang, H.-C., & Klein, P. S. (2004). The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology*, 5(7), 234. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-7-234>
- Jerabek, S., Merino, F., Schöler, H. R., & Cojocaru, V. (2014). OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(3), 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.10.001>
- Jun, J. E., Rubio, I., & Roose, J. P. (2013). Regulation of Ras exchange factors and cellular localization of Ras activation by lipid messengers in T cells. *Frontiers in Immunology*, 4(SEP), 13–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00239>
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75. Retrieved from www.landesbioscience.com
- Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., & Evans, M. J. (1987). A potential animal model for Lesch–Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*,

326(6110), 295–298. <https://doi.org/10.1038/326295a0>

- Kumari, D. (2016). States of Pluripotency: Naïve and Primed Pluripotent Stem Cells. *Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic*. <https://doi.org/10.5772/63202>
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., & Tzivion, G. (2007). Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1196–1212. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.001>
- Levy, D. E., & Lee, C. K. (2002). What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1143–1148. <https://doi.org/10.1172/JCI0215650>
- Li, Y.-Q. (2017). Networks of Transcription Factors for *Oct4* Expression in Mice. *DNA and Cell Biology*, 36(9), dna.2017.3780. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.3780>
- Li, Z., Fei, T., Zhang, J., Zhu, G., Wang, L., Lu, D., ... Chen, Y. G. (2012). BMP4 signaling acts via dual-specificity phosphatase 9 to control ERK activity in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10(2), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.016>
- Loomans, H. A., Andl, C. D., Andl, C. D., Andl, C. D., Andl, C. D., & Andl, C. D. (2014). Intertwining of activin a and TGF β signaling: Dual roles in cancer progression and cancer cell invasion. *Cancers*, 7(1), 70–91. <https://doi.org/10.3390/cancers7010070>
- Lüscher, B., & Larsson, L. G. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: Function and regulation. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202750>
- Ma, X., Chen, H., & Chen, L. (2016). A dual role of Erk signaling in embryonic stem cells. *Experimental Hematology*, 44(3), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.12.008>
- Maehle, A.-H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and Records of the Royal Society*. Retrieved from <http://rsnr.royalsocietypublishing.org/content/early/2011/07/21/rsnr.2011.0023.abstract>
- Mahla, R. S. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>

- Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., ... Smith, A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, *11*(4), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.008>
- Mascetti, V. L., & Pedersen, R. A. (2016). Contributions of Mammalian Chimeras to Pluripotent Stem Cell Research. *Cell Stem Cell*, *19*(2), 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.018>
- Massagué, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors, 2783–2810. <https://doi.org/10.1101/gad.1350705>
- Mcculloch, E. A., & Till, J. E. (1963). Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived From Trans-, *197*(4866), 452–454.
- Menon, S., Shailendra, S., Renda, A., Longaker, M., & Quarto, N. (2016). An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs, (Figure 1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms17010141>
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., & Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes to Cells*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00599.x>
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., & Heldin, C.-H. (2001). Smad regulation in TGF- β signal transduction. *Journal of Cell Science*. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/114/24/4359%5Cnhttp://jcs.biologists.org/content/114/24/4359.full.pdf%5Cnhttp://jcs.biologists.org/content/114/24/4359.long%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792802>
- Nichols, J., Davidson, D., Taga, T., Yoshida, K., Chambers, I., & Smith, A. (1996). Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, *57*(2), 123–131. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(96\)00531-X](https://doi.org/10.1016/0925-4773(96)00531-X)
- Nicos A Nicola and Jeffrey J Babon. (2015). Leukemia Inhibitory Factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Review*, *26*(5), 533–544. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.001.Leukemia>
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling

- pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460(7251), 118–122. <https://doi.org/10.1038/nature08113>
- Ombrato, L., Lluís, F., Cosma, M. P., & Pathway, W. C. (2012). Regulation of self-renewal and reprogramming by TCF factors © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience ., (Dvl), 39–47.
- Onishi, K., & Zandstra, P. W. (2015). LIF signaling in stem cells and development. *Development*, 142(13), 2230–2236. <https://doi.org/10.1242/dev.117598>
- Orkin, S. H., Wang, J., Kim, J., Chu, J., Rao, S., Theunissen, T. W., ... Levasseur, D. N. (2008). The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73(February), 195–202. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.72.001>
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 215–266. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>
- Orqueda, A. J., Giménez, C. A., & Pereyra-bonnet, F. (2016). iPSCs : A Minireview from Bench to Bed , including Organoids and the CRISPR System, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5934782>
- Oshimori, N., & Fuchs, E. (2012). The harmonies played by TGF- β in stem cell biology. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.001>
- Papatsenko, D., Waghray, A., & Lemischka, I. R. (2018). Feedback control of pluripotency in embryonic stem cells: Signaling, transcription and epigenetics. *Stem Cell Research*, 29, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.02.012>
- Pappas, J., & C Yang, P. (2008). Human ESC vs. iPSC—pros and cons. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 1, 96–99.
- Park, K. S. (2011). TGF-beta family signaling in embryonic stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 4(1), 18–23. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2011.4.1.18>
- Pauklin, S., & Vallier, L. (2015). Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development*, 142(4), 607–619. <https://doi.org/10.1242/dev.091769>

- Pereira, L., Yi, F., & Merrill, B. J. (2006). Repression of Nanog Gene Transcription by Tcf3 Limits Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7479–7491. <https://doi.org/10.1128/MCB.00368-06>
- Poniatowski, L. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., & Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor beta family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/137823>
- Prowse, A. B. J., McQuade, L. R., Bryant, K. J., Van Dyk, D. D., Tuch, B. E., & Gray, P. P. (2005). A proteome analysis of conditioned media from human neonatal fibroblasts used in the maintenance of human embryonic stem cells. *Proteomics*, 5(4), 978–989. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401087>
- Rafiee, M. R., Girardot, C., Sigismondo, G., & Krijgsveld, J. (2016). Expanding the Circuitry of Pluripotency by Selective Isolation of Chromatin-Associated Proteins. *Molecular Cell*, 64(3), 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.019>
- Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S., & Asaduzzaman, S. M. (2015). TGF- β /BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research*. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.5>
- Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term “stem cell”. *Cell Stem Cell*, 1(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.013>
- Refaat, B. (2014). Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-116>
- Roschger, C., & Cabrele, C. (2017). The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways Fritz Aberger. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0161-y>
- Saunders, A., Faiola, F., & Wang, J. (2013). Pursuing Self-Renewal and Pluripotency with the Stem Cell Factor Nanog. *Stem Cells*, 31(7), 1227–1236. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x>. Endothelial
- Schier, A. F. (2003). Nodal Signaling in Vertebrate Development. *Annual Review of Cell and*

- Developmental Biology*, 19(1), 589–621.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.041603.094522>
- Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research and Therapy*, 1(5), 1–9. <https://doi.org/10.1186/scrt39>
- Soncin, F., & Ward, C. (2011). The Function of E-Cadherin in Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal. *Genes*, 2, 229–259.
- Spinelli, V., Guillot, P. V., & Coppi, P. De. (2013). Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs), (June), 101–110.
- Sridhar, S. S., Hedley, D., & Siu, L. L. (2005). Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(4), 677–685. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0297>
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>
- Suwinska, A., & Ciemerych, M. A. (2011). *Factors Regulating Pluripotency and Differentiation in Early Mammalian Embryos and Embryo-derived Stem Cells. Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 87). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386015-6.00022-6>
- Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10294–10299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506945103>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thomson, J. A., Thomson, J. A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., ... Jones, J. M. (2012). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, 1145(1998), 1145–1148. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Vallier, L. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4495–4509.

<https://doi.org/10.1242/jcs.02553>

- Vander, Sherman, Luciano, & Tsakopoulos. (2001). Human Physiology: The mechanisms of body function (8th ed., pp. 215–232). McGraw-Hill.
- Vangapandu, H., & Ai, W. (2009). Kruppel like factor 4 (KLF4): A transcription factor with diverse context-dependent functions. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 13(1), 194–203.
- Vara, J. Á. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30(2), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007>
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7), 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Vogel, G. (2008). Reprogramming Cells. *Science*, 322(5909), 1766 LP-1767. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/322/5909/1766.1.abstract>
- Warrier, S., Van Der Jeught, M., Duggal, G., Tilleman, L., Sutherland, E., Taelman, J., ... Heindryckx, B. (2017). Direct comparison of distinct naive pluripotent states in human embryonic stem cells. *Nature Communications*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15055>
- Weina, K., & Utikal, J. (2014). SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and Translational Medicine*, 3(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-19>
- Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1285–1298. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.011>
- Willert, K., & Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007864>
- Wilson, V., & Conlon, F. L. (2002). The T-box family. *Genome Biology*, 3(6), REVIEWS3008. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-6-reviews3008>
- Winther, R. G. (2001). August Weismann on germ-plasm variation. *Journal of the History of*

Biology, 34(3), 517–555. <https://doi.org/10.1023/A:1012950826540>

- Xu, W., & Kimelman, D. (2007). Mechanistic Insights from Structural Studies of β -catenin and its Binding Partners. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.013771>
- Xu, Z., Robitaille, A. M., Berndt, J. D., Davidson, K. C., Fischer, K. A., Mathieu, J., ... Moon, R. T. (2016). Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613849113>
- Yang, S. H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.033>
- Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J. A., Shy, B. R., Yuen, C. M., Liu, R., & Merrill, B. J. (2012). Opposing Effects of Tcf3 and Tcf1 Control Wnt-Stimulation of Embryonic Stem Cell Self Renewal. *Nat Cell Biology*, 13(7), 762–770. <https://doi.org/10.1038/ncb2283.Opposing>
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X)
- Yu, J. S. L., Ramasamy, T. S., Murphy, N., Holt, M. K., Czapiewski, R., Wei, S. K., & Cui, W. (2015). PI3K/mTORC2 regulates TGF- β /Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8212>
- Yuan, H.-X., & Guan, K.-L. (2015). The Sin1 PH domain connects mTORC2 to PI3K, 5(11), 1127–1129. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30265-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30265-0). Cost-effectiveness
- Zhang, D., Mai, Q., Li, T., Huang, J., Ding, C., Jia, M., ... Xu, Y. (2016). Comparison of a xeno-free and serum-free culture system for human embryonic stem cells with conventional culture systems. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0347-7>
- Zhang, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>
- Zwijssen, A., Verschueren, K., & Huylebroeck, D. (2003). New intracellular components of

bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Letters*, 546(1), 133–139.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00566-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00566-0)