



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ
ΣΕ ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΓΚΑΡΤΖΙΟΥ Α. ΦΩΤΕΙΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ
ΣΕ ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΓΚΑΡΤΖΙΟΥ Α. ΦΩΤΕΙΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γκάρτζιου Φωτεινής: 25-11-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 677^α/9-2-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Γιαννόπουλος Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1-3-2011

«Μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της ρετρομετάθεσης σε νευρογλοιακά κύτταρα»

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 737^α/12-6-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κυρίτσης Αθανάσιος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 786^α/29-3-2016

Βούλγαρης Σπυρίδων

Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεωργίου Ιωάννης

Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κυρίτσης Αθανάσιος

Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κωλέττας Ευάγγελος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής-Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βρεκούσης Θωμάς

Κούκλης Παναγιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του
Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-7-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



Μαρία Καπτοπούλου
ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας και εν μέρει, στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής μου, κ. Αθανάσιο Κυρίτση, Καθηγητή Νευρολογίας, για την πολύτιμη επιστημονική βοήθειά του καθώς και για την ευγενική παροχή των κυτταρικών σειρών, αντισωμάτων και φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, για την εμπιστοσύνη που πρώτος έδειξε στο πρόσωπό μου και για την ανεκτίμητη ευκαιρία που μου έδωσε να φέρω εις πέρας το εγχείρημα αυτό. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Βούλγαρη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελο Κωλέττα και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Παναγιώτη Κούκλη και κ. Θωμά Βρεκούση, για την υποστήριξη της διδακτορικής διατριβής μου.

Ιδιαίτερα, οφείλω να ευχαριστήσω τον επιστημονικό υπεύθυνο του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων, κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο για την βοήθειά του, τις πολύτιμες συμβουλές του στα πειράματα κυτταρομετρίας και την ευγενική άδεια χρήσης του Κυτταρομέτρου Ροής που μου έδωσε, συμβάλλοντας σημαντικά στην πραγματοποίηση ενός μεγάλου μέρους των πειραμάτων της παρούσας μελέτης. Πολύτιμη υπήρξε επίσης η συμβολή της κυρίας Σοφίας Μαρκούλα, Νευρολόγου, Επιμελήτριας Α΄ του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων, η οποία μέσω της εγκάρδιας καθοδήγησής της κατά την εκπόνηση της διατριβής αυτής, αποτέλεσε τον συνδετικό κρίκο ανάμεσα στο κλινικό και ερευνητικό κομμάτι της εργασίας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω ξεχωριστά στον Εργαστηριακό υπεύθυνο αυτής της μελέτης, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεόδωρο Τζαβάρα, ο οποίος μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω το σύνολο σχεδόν των πειραμάτων στο εργαστήριο του και ακούραστα όλα αυτά τα χρόνια με καθοδηγούσε τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής μου.

Έχοντας πλήρη επίγνωση της σημασίας της συλλογικής συνεισφοράς στην ολοκλήρωση μίας ερευνητικής μελέτης, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και φίλους του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τις δόκτορες Στεφανία Μάντζιου και Σωτηρία Θρασυβούλου για την άριστη συνεργασία, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την φιλική διάθεση με την οποία με αντιμετώπισαν από την πρώτη κιόλας μέρα της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Επιπλέον, τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου, δόκτορες Δημήτρη Νουτσόπουλο και Γιώργο Μαρκόπουλο, που ως πρωτοπόροι του εργαστηρίου στην μελέτη της ρετρομετάθεσης αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης για τους νεότερους εξ ημών σε αυτό το πεδίο έρευνας. Μεταξύ των συναδέλφων θα ήθελα να ευχαριστήσω για την βοήθειά τους, τις δόκτορες Αλεξάνδρα Ντουχανιάρη, Γιώτα Κασιούμη και Εύη Βραζέλη, καθώς και το νεότερο μέλος του εργαστηρίου μας Βασίλη Βλαντό.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους στενούς φίλους μου για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ιωάννινα, Ιούνιος 2016

Γκάρτζιου Α. Φωτεινή

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	9
1.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	9
1.3 ΤΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	10
1.3.1 Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια.....	11
1.3.1.1 Τα στοιχεία LINE	11
1.3.1.2 Τα στοιχεία SINE.....	13
1.3.2 Τα LTR ρετροτρανσποζόνια.....	13
1.3.2.1 Μηχανισμός μετάθεσης των LTR-ρετροτρανσποζονίων	14
1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ	17
1.4.1 Γενωμική αστάθεια	18
1.4.2 Γενωμικές αναδιοργανώσεις.....	19
1.4.3 Ο αντίκτυπος των ρετροτρανσποζονίων στην γονιδιακή έκφραση.....	20
1.5 ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ-ΞΕΝΙΣΤΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	22
1.5.1 Η μεθυλίωση του DNA στη μεταγραφική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης.....	23
1.5.2 Ιστονικές τροποποιήσεις στη μεταγραφική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης.....	24
1.5.3 Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις στη ρύθμιση της ρετρομετάθεσης.....	25
1.6 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ HERV-K(10) ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΡΕΤΡΟΪΩΝ	27
1.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	29
1.7.1 Αστροκύτταρα.....	29
1.7.2 Ολιγοδενδροκύτταρα.....	30
1.7.3 Επενδυματικά κύτταρα.....	31
1.7.4 Μικρογλοία.	32
1.7.5 Νευρώνες.....	32
1.8 Η ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	33
1.8.1 Η νευρογενετική ζώνη (Neurogenic Niche).....	34
1.8.2 Η επιγενετική των NSCs	38
1.8.3 Ρετρομετάθεση και νευρογένεση	40
1.9 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	43
1.9.1 Δείκτες βλαστικών κυττάρων σε γλοιωματικούς όγκους	47
1.9.2 Η πλαστικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων: Κυτταρικός επαναπρογραμματισμός και Δια-διαφοροποίηση	48
1.9.3 Η ρετρομετάθεση σε φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού	50
1.10 Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ	51
α) Η μεθυλίωση του DNA.....	51

β) Ιστονικές τροποποιήσεις	52
γ) Τα micro-RNAs	53
1.10.1 Επιγενετική θεραπεία του γλοιώματος	54
α) Αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA	54
β) Αναστολείς των από-ακετυλασών των ιστονών	56
β i) Βαλπροϊκό Οξύ	57
β ii) Τα βαλπροϊκό οξύ ως αναστολέας των ιστονικών από-ακετυλασών	58
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	61
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	63
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	63
2.1.1 Αναλώσιμα	63
2.1.2 Εξοπλισμός	63
2.1.3 Διαλύματα αντιδραστηρίων	63
2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	64
2.2.1 Κυτταρικές σειρές	64
2.2.1.1 U-373 MG.	64
2.2.1.2 U-87 MG.	64
2.2.2 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας	65
2.2.2.1 Θρεπτικά υλικά	65
2.2.2.2 Διάλυμα έκπλυσης	65
2.2.2.3 Διάλυμα θρυψίνης/EDTA	65
2.2.3 Αραίωση και επανακαλλιέργεια κυττάρων	65
2.2.4 Αποθήκευση κυττάρων (stock)	65
2.2.5 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων σε καλλιέργεια μέσω λιπιδίων (transfection)	66
2.2.6 Εξέταση κυττάρων για ικανότητα σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης (anchorage-independent foci)	67
2.2.7 Εξέταση ικανότητας επιβίωσης και σχηματισμού νευροσφαιρών υπό συνθήκες ελαττωμένης προσκόλλησης	67
2.2.8 Εξέταση ικανότητας αυτοανανέωσης (self-renewal) νευροσφαιρών	67
2.3 Μικροσκοπία φθορισμού (<i>Fluorescence microscopy</i>)	68
2.4 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence	68
2.5 Κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης (growth curves) με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence με την χρήση ειδικών πολυτρυβλίων (e-plates).	69
2.6 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	69
2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	70
2.7.1 Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA για ανάλυση PCR	70
2.7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	70
2.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA	72

2.8.1 Απομόνωση RNA.....	72
2.8.2 Αντίστροφη μεταγραφή - Παρασκευή cDNA.....	72
2.8.3 Αντιδράσεις RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης mRNA των γονιδίων Sox2 και Oct-4.....	73
2.9 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	73
2.9.1 Ανάλυση πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blotting).....	73
2.9.1.1 Παρασκευή εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών.....	74
2.9.1.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	74
2.9.1.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	75
2.9.1.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting).....	75
2.9.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (<i>Indirect Immunofluorescence</i>).....	76
2.9.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS).....	77
2.9.3.1 Μέτρηση ποσοστού ρετρομετάθεσης μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS)...	78
2.9.3.2 Ανίχνευση επιφανειακών δεικτών μέσω άμεσου ανοσοφθορισμού των και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής.....	78
2.9.3.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου.....	79
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
3.1 Η διαμόλυνση γλοιοματικών κυττάρων U-373 MG και U-87 MG με ένα ανασυνδιασμένο στοιχείο HERV-K10 παράγει γεγονότα ρετρομετάθεσης.....	81
3.1.1 Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης των HERV-K10 σε κύτταρα κλώνων..	84
3.2 Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U373 και U87 συσχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης.....	86
3.2.1 Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U373 επάγει την διαφοροποίησή τους προς έναν αστροκυτταρικό φαινότυπο.....	89
3.2.2 Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U87 επάγει δια-διαφοροποίησή (trans-differentiation) τους προς έναν νευρωνικό φαινότυπο.....	92
3.2.3 Το ρετινοϊκό οξύ (All-trans Retinoic Acid, ATRA) επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο σε κύτταρα U-373 και U-87.....	94
3.3 Έλεγχος αναπτυξιακού προφίλ κλώνων U373-HERV-K10 και U87-HERV-K10 θετικών ρετρομετάθεσης.....	96
3.3.1 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συσχετίζεται με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U-373- και U-87 MG.....	99
3.4 Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης HERV-K10 με τον σχηματισμό νευροσφαιρών υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης σε κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος.....	102
3.4.1 Έλεγχος της ικανότητας αυτό-ανανέωσης των θετικών σε ρετρομετάθεση νευροσφαιρών U87-HERV-K10.....	105
3.4.2 Έλεγχος της έκφρασης μοριακών δεικτών βλαστικότητας σε κύτταρα U373- και U87- θετικά ρετρομετάθεσης.....	106

3.4.3 Οι θετικές σε ρετρομετάθεση νευρόσφαιρες U87-HERV-K10 διαφοροποιούνται σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους.....	109
3.4.4 Μεταβολή έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD133, και CD44 σε κύτταρα κλώνων U373- και U87- θετικών ρετρομετάθεσης.....	110
3.4.5 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα φέρουν ενισχυμένη ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά καλλιεργητικά μέσα.	112
3.4.6 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCA DP-XCelligence.	114
3.5 Το βαλπροϊκό οξύ (Valproic Acid, VPA) επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο.....	117
3.5.1 Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης των HERV-K10 μετά από επίδραση με βαλπροϊκό οξύ	120
3.5.2 Η επαγόμενη από το βαλπροϊκό οξύ ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης, κατά τρόπο δοσο-εξαρτώμενο.....	121
3.5.3 Η επαγόμενη από το βαλπροϊκό οξύ ρετρομετάθεση HERV-K10 συσχετίζεται με δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου.....	126
3.5.4 Η 5-Αζακυτιδίνη επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο	128
3.5.5 Η επαγόμενη από την 5'-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης	130
3.5.6 Η επαγόμενη από τη 5'-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συσχετίζεται με δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου.	132
3.5.7 Η τεμοζολομίδη αναστέλλει την ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10, κατά δοσο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο.....	134
3.5.8 Η επίδραση του αναστολέα των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών Efavirenz στην επαγόμενη ρετρομετάθεση των HERV-K10.	138
3.5.9 Η επίδραση της διαμεσολαβούμενης από Efavirenz αναστολής της ρετρομετάθεσης στο φαινότυπο κυττάρων U373/HERV-K10 και U87/HERV-K10.	140
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	143
4.1 Τα ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης	143
4.2 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 επάγει κυτταρική διαφοροποίηση σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος	144
4.3 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 μεταβάλλει το αναπτυξιακό προφίλ των γλοιωματικών κυττάρων U-373- και U-87 MG	146
4.4 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συσχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού μέσω επαγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος	148
4.5 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ογκογενετικότητας και μεταστατικότητας.....	153

4.6 Η επιγενετική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος.....	153
<i>Αναστολείς από-ακετυλασών (HDACs) – Βαλπροϊκό οξύ (VPA).....</i>	<i>154</i>
<i>Αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs) – 5'-αζακυτιδίνη (5'-AZA) ..</i>	<i>157</i>
<i>Αλκυλιωτικοί παράγοντες – Τεμοζολομίδη</i>	<i>159</i>
4.7 Η δράση των αναστολέων των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών στην επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10	161
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	163
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	167
ABSTRACT.....	171
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	173

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ως μεταθετά στοιχεία ορίζονται μη κωδικές μετρίως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που εντοπίζονται διάσπαρτες σε όλο το γένωμα των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών. Πρόκειται για κινητές αλληλουχίες, δηλαδή αλληλουχίες που είναι ικανές να μεταφέρονται από μία περιοχή του γενώματος σε μία άλλη, μέσω ενός μηχανισμού που αποκαλείται μετάθεση.

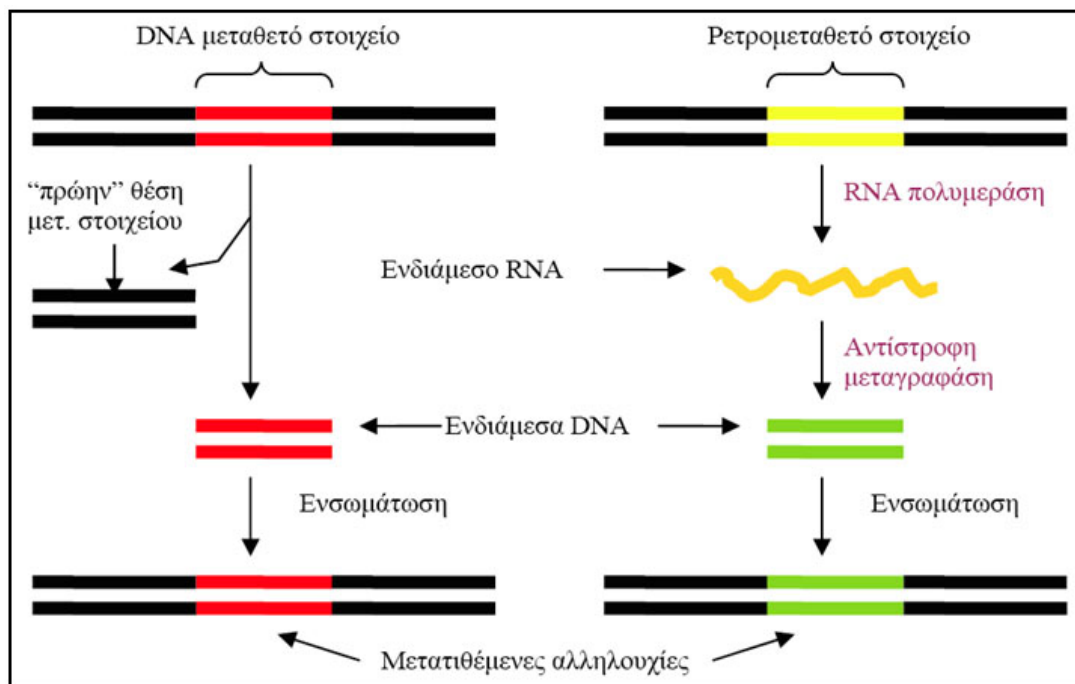
Η πρώτη αναφορά στα μεταθετά στοιχεία έγινε τη δεκαετία του 1940 από την γενετίστρια Barbara McClintock, η οποία τα όρισε ως γενετικές οντότητες, ικανές να μετακινούνται από θέση σε θέση γύρω από τα χρωμοσώματα και να ρυθμίζουν την χρωματική ετερογένεια των σπόρων αραβοσίτου (1). Αρκετές δεκαετίες αργότερα, μη έχοντας λάβει η εργασία της την απαιτούμενη προσοχή, αποδόθηκε στα μεταθετά στοιχεία ο ανθρωποκεντρικός χαρακτηρισμός «εγωιστικό» ή και «παρασιτικό» DNA, που έχει ως μοναδικό στόχο την αυτό-συντηρησή του στο γένωμα του οργανισμού, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τον φαινότυπό του (2). Η πλήρης αναγνώριση της σπουδαιότητας της ανακάλυψης της Barbara McClintock από την επιστημονική κοινότητα ήρθε αρκετά χρόνια αργότερα με την απονομή του βραβείου Νόμπελ το 1983. Χρειάστηκε επιπλέον μισός αιώνας για την κατανόηση του τρόπου δράσης των μεταθετών στοιχείων τους στη δομή και τη λειτουργία του γονιδιώματος (3).

Με την ολοκλήρωση του προγράμματος αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project), αποκαλύφθηκε ότι το ανθρώπινο γένωμα σχεδόν κατά το ήμισυ αποτελείται από μεταθετά στοιχεία και αναγνωρίσιμα κατάλοιπα αυτών (4).

1.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες βάσει του μηχανισμού που ακολουθούν για να επιτελέσουν την μετάθεσή τους (εικόνα 1.1): **α.** Τα DNA τρανσποζόνια (DNA transposons) τα οποία μετατίθενται άμεσα ως μόρια DNA με ένα μηχανισμό «αποκοπής και ενσωμάτωσης» και **β.** Τα ρετροτρανσποζόνια (retrotransposons) τα οποία μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» που περιλαμβάνει την μεταγραφή ενός ενδιάμεσου ρετροτρανσποζονιακού μορίου RNA, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή και ενσωματώνεται ως συμπληρωματικό DNA (cDNA) σε νέα θέση στο γένωμα, ενώ το αρχικό αντίγραφο παραμένει *in situ* στη θέση από όπου αντιγράφηκε (5).

Αμφότερα DNA τρανσποζόνια και ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται περαιτέρω σε αυτόνομα και μη αυτόνομα μεταθετά στοιχεία, βάσει του αν κωδικεύουν ή όχι αντίστοιχα, τις απαραίτητες για τη μετάθεσή τους πρωτεΐνες. Στη δεύτερη περίπτωση, η μετάθεση ενός μη-αυτόνομου μεταθετού στοιχείου μπορεί να καταστεί εφικτή μέσω «υποκλοπής» των απαιτούμενων για τη μετάθεσή του ενεργοτήτων *in trans* από ένα ομόλογο αυτόνομο στοιχείο (6).

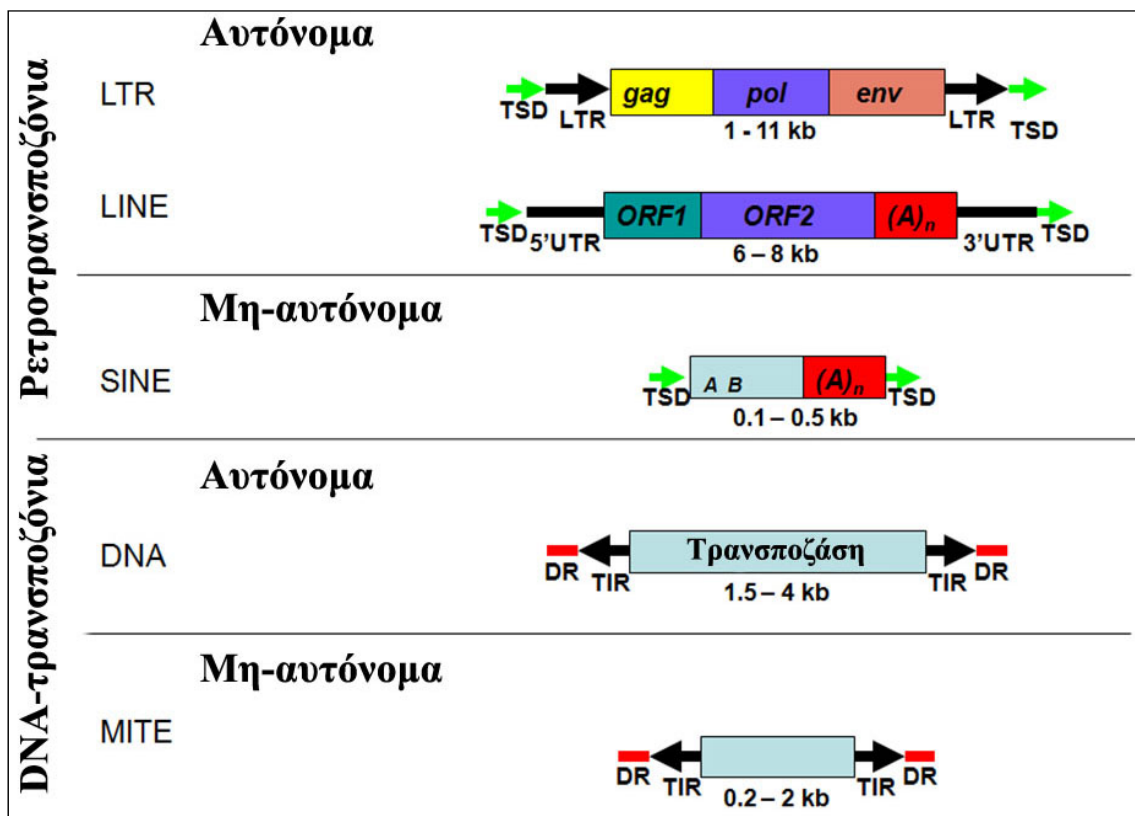


Εικόνα 1.1: Ταξινόμηση μεταθετών στοιχείων ανάλογα με τον μηχανισμό μετάθεσής τους.

Γενικά τα ευκαρυωτικά DNA τρανσποζόνια αποτελούν αυτόνομα μεταθετά στοιχεία μεγέθους 1-2 Kb. Αποτελούν περίπου το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος, απαντώντας σε 294.000 αντίγραφα (7). Δομικά πρόσκεινται στα βακτηριακά στοιχεία IS (Αλληλουχίες Ένθεσης – Insertion Sequences, IS) και συνίστανται από τρεις περιοχές: την κεντρική περιοχή που κωδικοποιεί για μία τρανσποζάση, δύο αντίστροφες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 5-500 bp και δύο ευθείες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 2-8 bp που βρίσκονται στα άκρα τους (εικόνα 1.2) Γενικά, ο αριθμός του στο γένωμα παραμένει σταθερός εξαιτίας του γεγονότος ότι αποκόπτονται από το ένα σημείο του γενώματος και εντίθενται σε ένα άλλο, ενώ για να αυξηθεί, θα πρέπει η μετάθεση να συμβεί στη φάση διπλασιασμού του γενετικού υλικού του κυττάρου (φάση S).

1.3 ΤΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα ρετροτρανσποζόνια αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα της τάξης του 90% των μεταθετών στοιχείων στο ανθρώπινο γονιδίωμα και διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες (8): **α.** στα LTR ή ιϊκού τύπου ρετροτρανσποζόνια, τα οποία φέρουν μακρές τερματικές επαναλήψεις (**Long Terminal Repeats, LTRs**) και **β.** στα μη φέροντα LTR ρετροτρανσποζόνια τα οποία έχουν μία πολυαδενυλική αλληλουχία στο 3' άκρο. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρετρομεταθετών στοιχείων όπως προαναφέρθηκε είναι ότι χρησιμοποιούν ένα ενδιάμεσο γενωμικό RNA για την μετάθεσή τους, γεγονός που επιτρέπει την συνεχή αύξηση του αριθμού αντιγράφων τους στα ευκαρυωτικά γενώματα.



Εικόνα 1.2: Διάκριση μεταθετών στοιχείων. Τροποποιημένη από <http://www.myweb.ttu.edu/daray/Research.htm>. LTR: μακρές τερματικές επαναλήψεις, TSD: επαναλήψεις αλληλουχίας στόχου, UTR: αμετάφραστη περιοχή, ORF: ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, $(A)_n$: πολυαδενυλική αλληλουχία, DR: ευθείες επαναλήψεις, TIR: τελικές ανάστροφες επαναλήψεις, MITE: Miniature Inverted-repeat Transposable Elements.

1.3.1 Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια

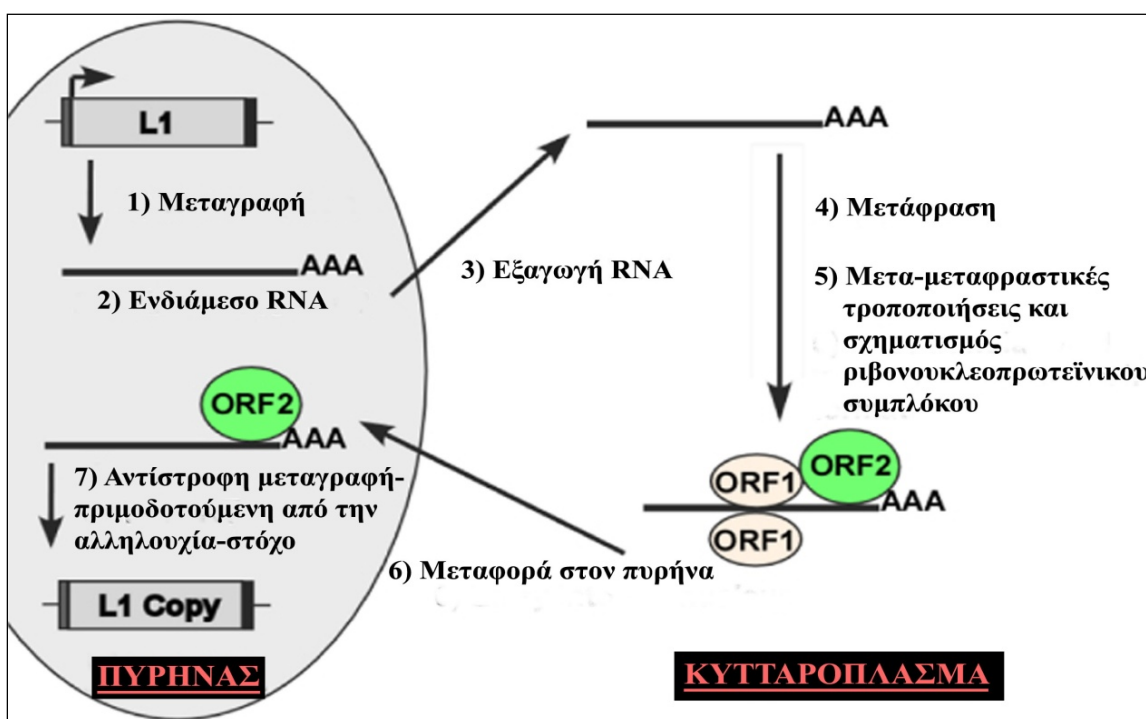
Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια αποτελούν την πιο διαδεδομένη κατηγορία ρετροτρανσποζονίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αντιστοιχούν στο 33.9% του γονιδιώματος του ανθρώπου. Οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι τα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Long Interspersed Nuclear Elements, **LINEs**), τα βραχεία διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Short Interspersed Nuclear Elements, **SINEs**) και τα σύνθετα στοιχεία SVA (SINE-VNTR-Alus: **SVA**) (9).

1.3.1.1 Τα στοιχεία LINE

Τα LINEs αποτελούν τα καλύτερα χαρακτηρισμένα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία (9). Φυλογενετικά διακρίνονται σε τρεις απομακρυσμένα σχετιζόμενες οικογένειες, τις LINE-1, LINE-2 και LINE-3, εκ των οποίων μόνο η πρώτη θεωρείται ενεργή (7). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα απαντούν σε 868.000 αντίγραφα που αντιστοιχούν στο 21% του ανθρώπινου γενώματος. Η οικογένεια των LINE-1 είναι η πολυπληθέστερη (520.000 αντίγραφα) και η μόνη που περιλαμβάνει εκτός από ανενεργά, ελλειμματικά στοιχεία εξαιτίας κολόβωσης της αλληλουχίας τους ή συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων, και ενεργά μέλη (7). Συγκεκριμένα, στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζονται 3.000-5.000 πλήρους μήκους στοιχεία L1 εκ των οποίων μόλις 80-100 είναι ικανά προς ρετρομετάθεση (10).

Ένα πλήρους μεγέθους ανθρώπινο L1, φέρει μία 5'-αμετάφραστη περιοχή (**5'-Untranslated Region, 5'-UTR**), μήκους 900 νουκλεοτιδίων, δύο ανοιχτά πλαίσια

ανάγνωσης (Open Reading Frames, **ORF1**, **ORF2**) και μία μικρότερη μεγέθους 3'-UTR περιοχή, που καταλήγει σε μία πολυαδενυλική ουρά (**poly(A)** tail) περιέχοντας ένα λειτουργικό σήμα πολυαδενυλίωσης (6) (εικόνα 1.2). Η 5'-UTR των L1 φέρει δύο ρυθμιστικές μεταγραφικές περιοχές οι οποίες συνίστανται σε **α.** έναν πρόσθιο (Sense Promoter, **SP**) εσωτερικό υποκινητή πολυμεράσης II, που οδηγεί την μεταγραφή του πλήρους μεγέθους στοιχείου, και **β.** έναν ανάστροφο υποκινητή (AntiSense Promoter, **ASP**), ο οποίος οδηγεί την μεταγραφή προς την αντίθετη κατεύθυνση παρακείμενων περιοχών των L1 (11). Τα ORF1 και ORF2 κωδικοποιούν για πρωτεΐνες απαραίτητες για την ρετρομετάθεσή τους. Το ORF1 κωδικεύει μία πρωτεΐνη (ORF1p) μεγέθους περίπου 40kDa, με ενεργότητα συνοδού νουκλεϊκών οξέων που σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και φαίνεται να συντονίζει τη μεταφορά και τη μετάφραση του ρετροτρανσποζονίου (12). Το ORF2 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 150kDa (ORF2p), με ενεργότητες ενδονουκλεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης (13).



Εικόνα 1.3: Αλληλουχία γεγονότων κατά τη διάρκεια ρετρομετάθεσης ενός αυτόνομου L1 στοιχείου. Τροποποιημένη από (14). Η ρετρομετάθεση των στοιχείων L1 είναι μία ενδοκυτταρική διαδικασία μέρος της οποίας πραγματοποιείται στον πυρήνα, ενώ κάποια από τα στάδιά της λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα. Περιλαμβάνει τη μεταγραφή του στοιχείου, τη μετάφραση του ρετροτρανσποζονιακού RNA, την αντίστροφη μεταγραφή και την ενσωμάτωση του νέου αντιγράφου στο γένομα

Η διαδικασία μετάθεσης των L1 (εικόνα 1.3) περιλαμβάνει την αρχική μεταγραφή του από τον εσωτερικό υποκινητή που φέρει στην 5'-UTR, παράγοντας ένα πλήρους μεγέθους δικιστρωνικού L1 mRNA. Εν συνεχεία, αφού το L1 mRNA μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα και μεταφραστεί, μετακινείται μαζί με τις δικές του κωδικοποιές πρωτεΐνες στον πυρήνα. Εκεί η ORF2p με ενεργότητα ενδονουκλεάσης πραγματοποιεί μια σχάση στη μια αλυσίδα DNA, στη θέση στόχο (15). Κατά τη διαδικασία αυτή η ενδονουκλεάση των L1 κόβει την αλυσίδα DNA σε ένα μοτίβο 5'-TTT/AA3'. Η ουρά poly(A) προσδένεται στο ελεύθερο 3' άκρο του DNA και το ρετροτρανσποζονιακό mRNA μεταγράφεται αντίστροφα από την αντίστροφη μεταγραφάση των L1 (16). Ακολουθεί

τομή του δεύτερου κλώνου και σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Οι νέες θέσεις ένθεσης των αντιγράφων L1, πλαισιώνονται από βραχείες ευθείες επαναλήψεις (Target Site Duplications, **TSDs**), ποικίλου μεγέθους (2 ως 20 bp), που δημιουργούνται από τον διπλασιασμό της θέσης στόχου DNA μετά τη ρετρομετάθεση (17).

1.3.1.2 Τα στοιχεία SINE

Τα μεταθετά στοιχεία SINE, αποτελούν βραχείες/διάσπαρτες αλληλουχίες, μεγέθους 100-300 bp, και ανήκουν στην κατηγορία των μη-αυτόνομων, χωρίς LTR ρετροτρανσποζονίων. Ο αριθμός τους φτάνει τα 1.6×10^6 αντίγραφα, που αντιστοιχεί στο 13.64% του ανθρώπινου γονιδιώματος (7). Τα στοιχεία SINE δε κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και χρησιμοποιούν για τη ρετρομετάθεσή τους ενζυμικές ενεργότητες *in trans* που κωδικοποιούνται από τα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία L1 (εικόνα 1.2) (18).

Τα περισσότερα στοιχεία SINEs έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τα LINEs συμπεριλαμβανομένων της πολυαδενυλιωμένης ουράς στο 3' άκρο και των ευθείων επαναλήψεων TSD που τα πλαισιώνουν. Τα SINEs αποτελούνται από μία περιοχή που προέρχεται από αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούν για tRNA και φέρουν εσωτερικό υποκινητή για την RNA πολυμεράση III (19). Η διαδικασία μετάθεσή τους περιλαμβάνει την αρχική μεταγραφή του στοιχείου σε RNA από την RNA πολυμεράση III και ακολούθως, με την αξιοποίηση της ενζυμικής δράσης των L1, αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση στο γένωμα (15).

Κυριότερο εκπρόσωπο των SINEs αποτελεί η οικογένεια των στοιχείων Alu, χαρακτηριστικά γνωρίσματα των οποίων αποτελούν τον μικρό τους μέγεθος και ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων τους στο γένωμα. Συγκεκριμένα, τα Alu απαντούν σε περίπου 1.4×10^6 αντίγραφα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπου πιστεύεται ότι δεν κατανέμονται τυχαία, αλλά τείνουν να συσσωρεύονται σε περιοχές που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό γονιδίων (20).

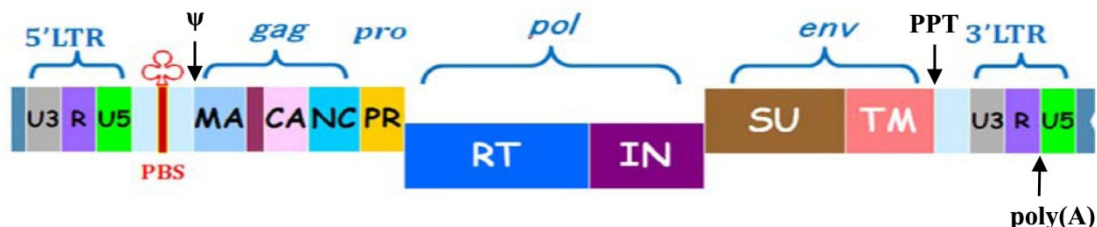
Μία επιπρόσθετη, λιγότερο χαρακτηρισμένη ομάδα στοιχείων SINE αποτελούν τα SVA, τα οποία αν και απαντούν σε σχετικά λίγα αντίγραφα εντός του ανθρώπινου γονιδιώματος (3000 αντίγραφα), θεωρούνται εξαιρετικά ενεργά και μεταλλαξιγόνα, ενώ έχουν συσχετιστεί με αρκετές γνωστές ανθρώπινες ασθένειες (6), (21).

1.3.2 Τα LTR ρετροτρανσποζόνια

Ανάμεσα στα μεταθετά στοιχεία, ιδιαίτερη θέση κατέχουν οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (**Human Endogenous Retroviruses, HERVs**), οι οποίοι αποτελούν το 8% περίπου του ανθρώπινου γενώματος [7] και θεωρούνται ως κατάλοιπα εξωγενών ρετροϊκών μολύνσεων που πιστεύεται ότι έλαβαν χώρα κατά την διάρκεια εκατομμυρίων ετών εξέλιξης των πρωτεύοντων. Η διασπορά τους στο γένωμα έγινε μέσω αρχέγονων μολύνσεων της γαμετικής σειράς και οριζόντιας μεταφοράς τους βάση της μεντελικής κληρονομικότητας (22). Κύρια χαρακτηριστικά τους αποτελούν η δομική και γονιδιακή ομοιότητά τους με τους εξωγενείς ρετροϊούς. Τα περισσότερα ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται από τους ρετροϊούς λόγω απουσίας της εξωκυττάριας φάσης του κύκλου ζωής τους, καθώς δεν διαθέτουν λειτουργικά γονίδια για τον σχηματισμό φακέλου και ιικού καψιδίου, και επομένως τα ψευδοϊικά σωματίδια που σχηματίζονται ενδοκυτταρικά δεν είναι μολυσματικά ως προς άλλα κύτταρα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις ρετροτρανσποζονίων που περιλαμβάνουν λειτουργικά πλαίσια ανάγνωσης του γονιδίου *env* και για τα οποία έχει ανιχνευθεί ο σχηματισμός εξωκυτταρικών μολυσματικών ισοσωματιδίων (23).

Οι πλήρους μήκους HERV έχουν μέγεθος 9-10 Kb. Δομικά, τα εν λόγω ρετροϊικά στοιχεία φέρουν στα δύο άκρα τους δύο μακρές τερματικές επαναλήψεις (LTR), μεγέθους 0.3-1.5 Kb, οι οποίες διευθετούνται στην ίδια μεταγραφική κατεύθυνση και πλαισιώνουν το κωδικοποιό τμήμα του στοιχείου (εικόνα 1.4). Οι αλληλουχίες αυτές χαρακτηρίζονται από την τυπική οργάνωση 5'-U3-R-U5-3' και περιέχουν σήματα έναρξης της μεταγραφής μέσω ενός υποκινητή RNA πολυμεράσης II καθώς και σήματα τερματισμού της μεταγραφής. Στην κεντρική περιοχή περιλαμβάνονται *cis*-δράσες αλληλουχίες, απαραίτητες για την αντίστροφη μεταγραφή. Συγκεκριμένα, η περιοχή αυτή φέρει στο 5'-άκρο της την πριμοδοτική ακολουθία PBS για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής, ενώ στο 3' άκρο της εντοπίζεται η πριμοδοτική για την αντίστροφη μεταγραφή πολυπυρινική περιοχή (PPT). Καθοδικά του PBS βρίσκεται το σήμα πακεταρίσματος Ψ το οποίο περιλαμβάνει τις απαραίτητες *in cis* ακολουθίες για την εγκαψιδίωση του RNA. Μεταξύ του Ψ και της περιοχής PPT εντοπίζονται τα γονίδια: **gag** που κωδικοποιεί μια δομική πρωτεΐνη με ενεργότητα δέσμευσης νουκλεϊνικού οξέος, απαραίτητη για την συγκρότηση των μορίων RNA σε κυτταροπλασματικά ψευδοϊκά σωματίδια, **prt** που κωδικεύει για μία πρωτεάση, και **pol** με ενεργότητες αντίστροφης μεταγραφής, ριβονουκλεάσης και ιντεγκράσης. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι ενδογενείς ρετροϊοί στερούνται του γονιδίου *env* ενν το οποίο αποτελεί κωδικοποιό τμήμα των εξωγενών ρετροϊών, κωδικεύει για εξωτερικές δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου και είναι απαραίτητο για την διαδικασία της μόλυνσης. Οι ενεργές μορφές των HERV περιλαμβάνουν επίσης θέσεις δότη (Splice Donor, SD) και αποδέκτη ματίσματος (Splice Acceptor, SA) (24), (25), (26).

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, πιστεύεται ότι οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί μετατίθενται στο γένωμα μέσω σχηματισμού ενός ενδιάμεσου ρετροτρανσποζονιακού mRNA, αντίστροφης μεταγραφής αυτού και ενσωμάτωσης σε μία νέα θέση. Ο μηχανισμός μετάθεσής τους εξασφαλίζει την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων τους στο γένωμα κάθε φορά που μετατίθενται.



Εικόνα 1.4: Αναλυτική γενετική δομή ενός ενδογενούς ρετροϊού. Τροποποιημένη από (26).

LTR: μακρές τερματικές επαναλήψεις, PBS: θέση πρόσδεσης πριμοδοτικής αλληλουχίας (Prime Binding Site), Ψ: σήμα πακεταρίσματος, RT: αντίστροφη μεταγραφή, IN: ιντεγκράση, PPT: πολυπυρινική περιοχή (polyurine tract), poly(A): σήμα πολυαδενυλίωσης, gag: γονίδιο που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες MA (Structural Matrix: θεμέλια πρωτεΐνη), CA (Capsid, καψιδιακή πρωτεΐνη), NC (Nucleocapsid, νουκλεο-καψιδιακή πρωτεΐνη), pro: γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεάση, pol: γονίδιο που κωδικοποιεί τα ένζυμα αντίστροφης μεταγραφής και ιντεγκράση, env (υπολείπεται στα στοιχεία HERV): γονίδιο που κωδικοποιεί για την γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας (Surface Protein, SU) και την διαμεμβρανική πρωτεΐνη (TransMembrane protein, TM).

1.3.2.1 Μηχανισμός μετάθεσης των LTR-ρετροτρανσποζονίων

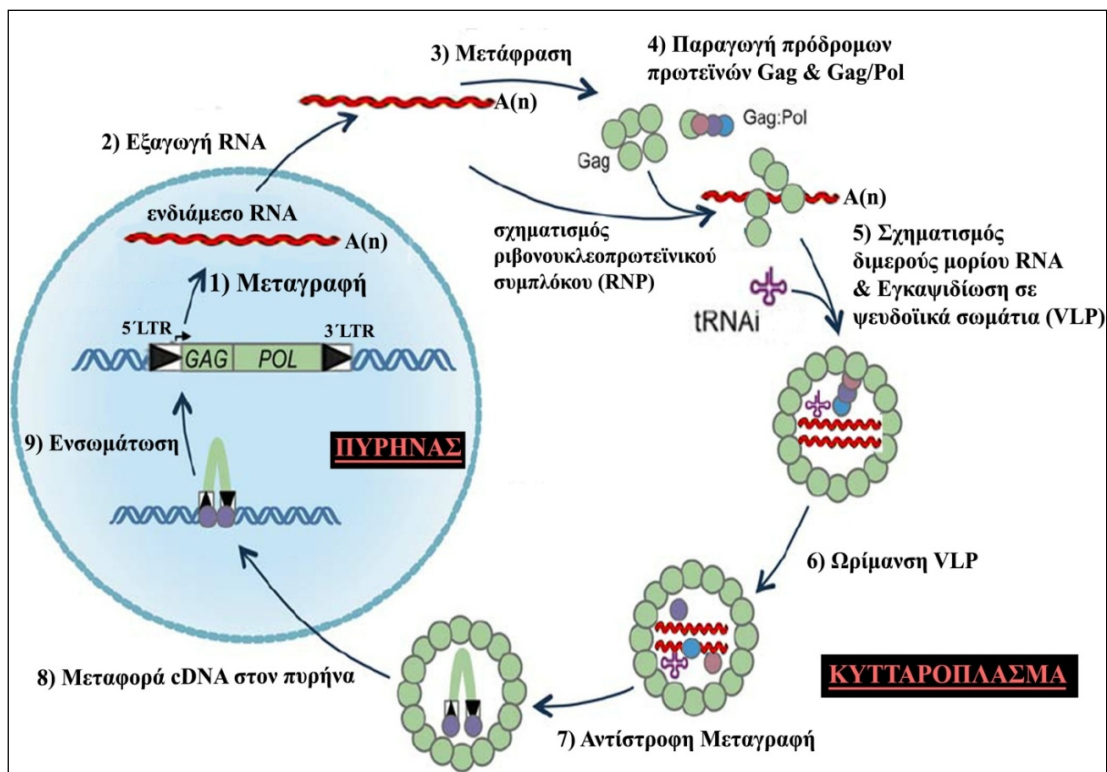
Ο μηχανισμός με τον οποίο μετατίθενται τα LTR-ρετροτρανσποζόνια παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με τη διαδικασία πολλαπλασιασμού των ρετροϊικών γενωμάτων κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή. Ωστόσο, οι δύο διαδικασίες έχουν σημαντικές διαφορές που αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη διαφορών στη

βιολογία των ρετροϊών και των ρετροτρανσποζονίων. Βασικότερη διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι η ρετροεπίθεση αποτελεί αποκλειστικά ένα ενδοκυτταρικό φαινόμενο καθώς δεν παρατηρείται σχηματισμός εξωκυτταρικών προϊκών σωματίων (27). Επίσης, τα ρετροτρανσποζόνια, σε αντίθεση με τους ρετροϊούς ακόμα και όταν είναι κωδικοποιώς ελλειματικά δύνανται να μετατεθούν λαμβάνοντας *in trans*, τις απαιτούμενες προς μετάθεση ενεργότητες (21), (27).

Το πρώτο στάδιο του μηχανισμού ρετρομετάθεσης των LTR-ρετροτρανσποζονίων προβλέπει την παραγωγή του μεταγραφήματος του στοιχείου από την πολυμεράση II του κυττάρου ξενιστή και έναν υποκινητή που εντοπίζεται στο 5'LTR. Η παρουσία ενός σήματος πολυαδενυλίωσης (ακολουθία polyA) στο εσωτερικό του 3'LTR του ρετροτρανσποζονίου οδηγεί τα κατάλληλα ένζυμα του κυττάρου να σχάσουν το πρωτογενές μεταγράφημα στο 3' άκρο της περιοχής R του 3'LTR και στο επεξεργασμένο μεταγράφημα προστίθεται μετα-μεταγραφικά μία ουρά πολυαδενυλικών οξέων (εικόνα 1.5).

Στη συνέχεια το επεξεργασμένο μόριο RNA εξέρχεται του κυτταρικού πυρήνα και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιείται η μετάφραση για την παραγωγή των πρόδρομων πολυπρωτεϊνών Gag και Gag/Pol, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό των ψευδοϊκών σωματιδίων (Virus-Like Particle, VLP) καθώς και για την αντίστροφη μεταγραφή, αντίστοιχα.

Σε ένα επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η εγκαψιδίωση του ρετροτρανσποζονιακού RNA με την μορφή ενός ομοδιμερούς μορίου, αποτελούμενο από δύο όμοια μόρια RNA ενώ συγχρόνως οι πρόδρομες πολύπρωτεΐνες Gag και Gag/Pol υφίστανται ωρίμανση (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις) από την ενεργότητα πρωτεάσης που εμπεριέχεται στην πρωτεΐνη Pol. Για τον σχηματισμό των ψευδοϊκών σωματίων απαιτείται η συμβολή της πρωτεΐνης Gag ενώ για την επιτυχή εγκαψιδίωση του ρετροτρανσποζονιακού mRNA είναι απαραίτητες οι ακολουθίες που εντοπίζονται στο σήμα πακεταρίσματος Ψ. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μαζί με το mRNA εγκαψιδιώνεται και το κατάλληλο (συμβατικό) πριμοδοτικό μόριο tRNA του κυττάρου, το οποίο θα εκκινήσει την αντίστροφη μεταγραφή του ρετροτρανσποζονιακού RNA. Το επόμενο στάδιο του μηχανισμού ρετρομετάθεσης των LTR-ρετροτρανσποζονίων περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφή του ρετροτρανσποζονιακού μεταγραφήματος και τη μετατροπή του σε DNA διπλής έλικας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στο εσωτερικό των ψευδοϊκών σωματιδίων και κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η αντίστροφη μεταγραφάση, ένα πολυλειτουργικό ένζυμο που κατέχει ενεργότητες RNA- και DNA- εξαρτώμενης πολυμεράσης καθώς και ενεργότητα ριβονουκλεάσης H.

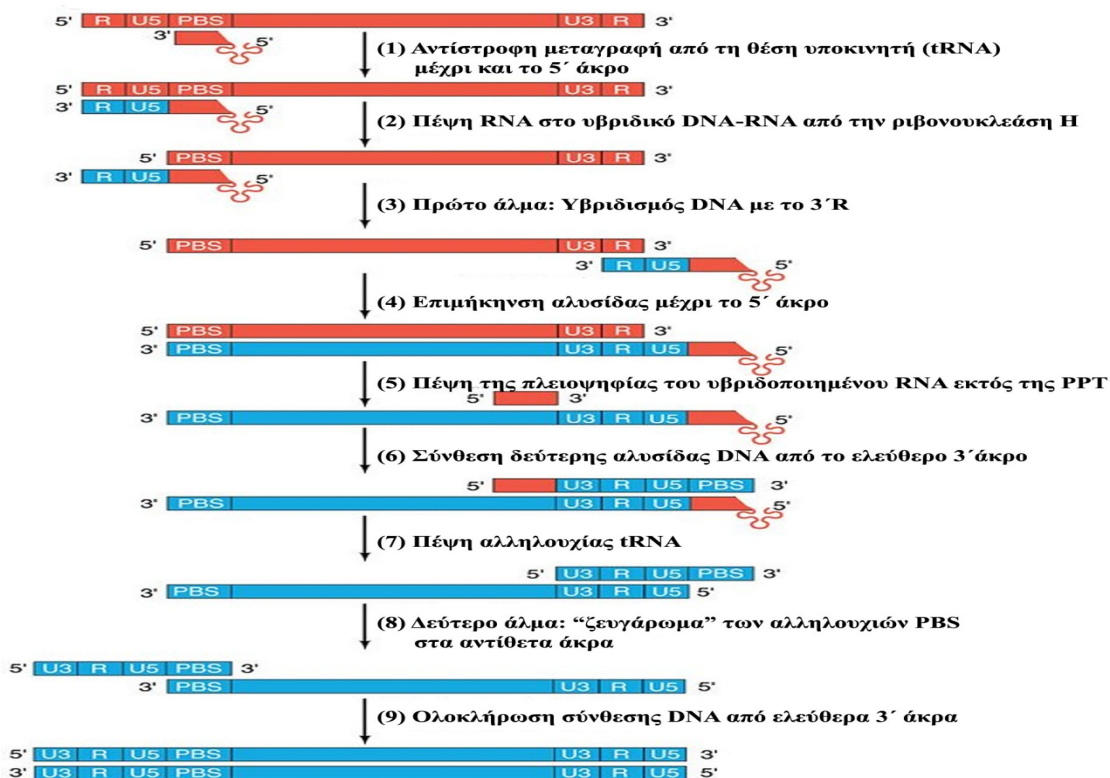


Εικόνα 1.5: Ο μηχανισμός μετάθεσης των LTR ρετροτρανσποζονίων. Τροποποιημένη από (28)

Τα αρχικό στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνει το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της αντίστροφης μεταγραφής μεταξύ του κυτταρικού προμοδοτικού tRNA και του ρετροτρανσποζονιακού RNA υποστρώματος στην ακολουθία PBS που εντοπίζεται καθοδικά και πλησίον του 5'LTR. Στο σημείο αυτό εκκινείται από την αντίστροφη μεταγραφάση η σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας DNA του ρετροτρανσποζονίου, μέσω επέκτασης του 3' άκρου του πρωμοδοτικού μορίου tRNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το προεξέχον 5' άκρο της θετικής αλυσίδας του ρετροτρανσποζονιακού RNA (εικόνα 1.6). Εν συνεχεία το παραγόμενο ατελές cDNA μεταφέρεται στο 3'LTR και συγκεκριμένα υβριδοποιείται με την ακολουθία R του 3' άκρου, μία διαδικασία γνωστή ως πρώτη μεταφορά αλυσίδας (first strand transfer), προκειμένου να συντεθεί η αρνητική αλυσίδα του στοιχείου. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας DNA, το RNA υπόστρωμα αποδομείται από την ενεργότητα ριβονουκλεάσης H, αφήνοντας ανέπαφη την πολυουρινική περιοχή PPT του ρετροτρανσποζονιακού RNA που βρίσκεται ανοδικά του 3' LTR και η οποία λειτουργεί ως πρωμοδότης για την σύνθεση της θετικής αλυσίδας του στοιχείου. Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται ακόμη μια μεταφορά αλυσίδας (second strand transfer) ώστε να αντιγραφεί πλήρως η συμπληρωματική αλυσίδα DNA και να παραχθεί το πλήρους μεγέθους αντίγραφο DNA (28), (29).

Το τελευταίο στάδιο του μηχανισμού ρετρομετάθεσης των LTR-ρετροτρανσποζονίων προβλέπει την ενσωμάτωση του παραγόμενου από την αντίστροφη μεταγραφάση δίκλωνου DNA του στοιχείου στο γένωμα και απαιτεί την ενεργότητα ιντεγκράσης που παρέχεται από το γονίδιο pol. Πριν την τελική ενσωμάτωση, το δίκλωνο DNA αναδιπλώνεται μέσω ομολογίας βάσεων των LTR αποκτώντας μία κυκλική δομή (εντός των ψευδοϊκών σωματίων) και η ιντεγκράση, αναγνωρίζοντας ειδικές ακολουθίες στα άκρα

των LTR, σχηματίζει ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Στη συνέχεια το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο εισέρχεται στον πυρήνα και δεσμεύεται στη θέση-στόχο του γενωμικού DNA. Η επιλογή της θέσης στόχου για τα LTR-ρετροτρανσποζόνια δεν χαρακτηρίζεται από ειδικότητα ακολουθίας και διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ρετροτρανσποζονίων. Τέλος, πραγματοποιείται η πλήρωση των κενών μεταξύ του ρετροτρανσποζονιακού και του γενωμικού DNA, πιθανώς από την αντίστροφη μεταγραφάση. Το αποτέλεσμα αυτής της ενσωμάτωσης είναι η δημιουργία βραχείων ευθείων επαναλήψεων εκατέρωθεν του ενσωματωμένου ρετροτρανσποζονίου, οι οποίες προκύπτουν από τον διπλασιασμό της θέσης-στόχου κατά την πλήρωση των κενών DNA και το μέγεθος διαφέρει ανάλογα και καθορίζει το είδος του ρετροτρανσποζονίου.



Εικόνα 1.6: Μηχανισμός αντίστροφης μεταγραφάσης ρετροϊών και LTR ρετρομεταθετών στοιχείων. Τροποποιημένη από (30).

1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ

Ο αρχικός ισχυρισμός του συνόλου σχεδόν της επιστημονικής κοινότητας ότι τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν άχρηστο (junk DNA), παρασιτικό (parasite DNA) ή εγωιστικό DNA (selfish DNA) εγκαταλείφθηκε οριστικά με την ολοκλήρωση του Human Genome Project, οπότε και αποκαλύφθηκε ότι το 50% του ανθρώπινου γενώματος συνίσταται από μεταθετά στοιχεία. Σήμερα έχει καταστεί ευρέως αποδεκτή η παραδοχή ότι τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν θεμελιώδη συστατικά του ανθρώπινου γενώματος που συνεισφέρουν στη δομική και λειτουργική εξέλιξή του. Τα στοιχεία αυτά αλληλεπιδρούν άμεσα με τις αλληλουχίες του ξενιστή και προσδίδουν πλαστικότητα και σταθερότητα στο γένωμα.

Τα ρετροτρανσποζόνια μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες πρόκλησης (1) γενωμικής αστάθειας, (2) γενωμικών αναδιαμορφώσεων και (3) μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης.

1.4.1 Γενωμική αστάθεια

Σε επίπεδο γενώματος τα ρετροτρανσποζόνια δύνανται να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια με ποικίλους τρόπους, οι κυριότεροι εκ των οποίων παρατίθενται ακολούθως:

Ενθετική μεταλλαξινέργεια: Ο πλέον άμεσος τρόπος με το οποίο τα ρετροτρανσποζόνια μπορούν να μεταβάλουν την δομή και λειτουργία του γενώματος είναι μέσω ένθεσής τους σε κωδικοποιές για πρωτεΐνες αλληλουχίες ή ρυθμιστικές περιοχές αυτών. Εξαιτίας των άμεσα ανιχνεύσιμων επιπτώσεων τέτοιων ενθέσεων στον κυτταρικό φαινότυπο, ήταν και οι πρώτες που αναγνωρίστηκαν από τις διάφορες επιστημονικές εργασίες (31). Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 65 μονογονιδιακές ασθένειες που οφείλονται σε *de novo* ενθέσεις των στοιχείων L1, Alu και SVA με πιο χαρακτηριστικές τις αιμορροφυλία, κυστική ίνωση, σύνδρομο Apert, νευροϊνωμάτωση, β-θαλασσαιμία, υπερχοληστεριναίμια, καθώς και περιπτώσεις καρκίνου μαστού και παχέος εντέρου (32), (33), (34) (Πίνακας 1.1).

Στοιχείο	Γονίδιο	Ασθένεια	Αναφορά
LINE-1	Παράγοντας VIII	Αιμοροφιλία A	(31)
	APC	Καρκίνος ορθού	(35)
	Δυστροφίνη	Μυϊκή δυστροφία	(36)
	β-σφαιρίνη	β-Θαλασσαιμία	[33]
	RP2	Μελαγχρωματική αμφιβληστροειδίτιδα	(37)
	CYBB	Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος	[33]
HERV-K15	Εισαγωγικός πολυμορφισμός	Σχιζοφρένεια	(38)
SVA	FcMB	Οικογενής μυϊκή Fukuyama δυστροφία τύπου	(39)
	α-Σπεκτρίνη	Κληρονομική ελλειπτοκύτωση	(40)
Alu (I/II)	NF1	Νευροϊνωμάτωση	(41)
	BCHE	αχολιστεναιμία	(42)
	Παράγων IX	Αιμοροφιλία B	(43)
	CASR	Οικογενής υπερασβεστιουρική- ασβεστιαίμια	(44)
	BRCA2	Καρκίνος μαστού	(45)
	APC	Κληρονομική ινώδης νόσος	(46)
	BTK	X-συνδεδεμένη α-γ-σφαιριναίμια	(47)
	IL2RG	X-οξεία συνδιασμένη ανοσοανεπάρκεια	(48)
	EYA1	Σύνδρομο BOR	(49)
	FGFR2	Σύνδρομο Apert	(50)
	ADD1	Νόσος Huntington	(51)
GK	Ανεπάρκεια κινάσης της γλυκερόλης	(52)	

Πίνακας 1.1: Ασθένειες του ανθρώπου προσκληθείσες από την ένθεση ή την έκφραση ρετρομεταθετών στοιχείων

Συνολικά εκτιμάται ότι το 0.3% περίπου όλων των καταγεγραμμένων κληρονομικών ανθρώπινων μεταλλάξεων οφείλονται σε *de novo* ενθέσεις ρετρομεταθετών στοιχείων σε

γαμετικά κύτταρα (53), γεγονός που μεταφράζεται σε 1 γεγονός ρετρομετάθεσης ανά 20, 100 και 900 γεννήσεις για τα Alu, τα L1 και τα SVA, αντίστοιχα (54), (55), (56). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πλειονότητα των L1 ενθέσεων φαίνεται να λαμβάνει χώρα στο χρωμόσωμα X (32), (33), (34) επιδεικνύοντας κάποιο είδος επιλεκτικότητας η οποία ενδεχομένως σχετίζεται με την προτεινόμενη συμβολή των εν λόγω μεταθετών στοιχείων στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (57). Στον Πίνακα 1.1 παρτίθενται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα ασθενειών που προκαλούνται από ενθετικά μεταλλαξιγόνα γεγονότα ρετρομετάθεσης στο ανθρώπινο γένωμα.

Θραύσεις διπλής αλύσου DNA – Επιδιόρθωση θραύσεων διπλής αλύσου DNA: Έχει πρόσφατα αποδειχθεί σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών ότι ο αριθμός των θραύσεων διπλής αλύσου DNA (DNA Double Stand Breaks, **DSBs**) που προκαλούνται από την δραστηριότητα ενδονουκλεάσης της πρωτεΐνης ORF2 των στοιχείων L1, είναι κατά πολύ υψηλότερος από εκείνον που προκύπτει από αυτά καθ' αυτά τα ενθετικά γεγονότα των εν λόγω μεταθετών στοιχείων (58). Τα DSBs ως παράγοντες πρόκληση γενωμικής αστάθειας θεωρούνται γεγονότα εξαιρετικά μεταλλαξιγόνα και επιρρεπή σε ανασυνδιασμούς. Στον αντίποδα, έχει αποδειχθεί ότι η ρετρομετάθεση των L1, που μπορεί να είναι σε σπάνιες περιπτώσεις και ανεξάρτητη της δράσης ενδονουκλεάσης (ένθεση μη-πριμοδοτούμενη από αλληλουχία-στόχο), δύναται να λάβει χώρα σε γενωμικές περιοχές που φέρουν DSBs, με αποτέλεσμα της επιδιόρθωσή τους. Προς αυτή την κατεύθυνση, έχει προταθεί ότι η ανεξάρτητη-ενδονουκλεάσης ρετρομετάθεση των στοιχείων L1, που χρησιμοποιούνταν από τα μεταθετά αυτά στοιχεία στο παρελθόν (πριν αποκτήσουν ενεργότητα ενδονουκλεάσης), αποτελεί έναν αρχέγονο μηχανισμό επιδιόρθωσης των μη-λειτουργικών χρωμοσωμικών τελομερών που έχει αναπτύξει το κύτταρο-ξενιστής για να υπεραμύνεται της γενωμικής του ακεραιότητας (59), (60). Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν αποκαλύψει ότι ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 0.5- έως 0.7% όλων των ρετροτρανσποζονιακών ενθέσεων των L1 και Alu έχουν προκύψει από γεγονότα ρετρομετάθεσης-ανεξάρτητης ενδονουκλεάσης, γεγονός που καθιστά την δράση των μεταθετών στοιχείων ως έναν πιθανό κυτταρικό μηχανισμό «υπεράσπισης» της γενωμικής ακεραιότητας στον άνθρωπο (61), (62).

Πηγές μικροδορυφόρων: Εξαιτίας της ευρείας αφθονίας των μεταθετών στοιχείων στο ανθρώπινο γένωμα καθώς και του γεγονότος ότι φέρουν ομοπολυμερικές περιοχές, τα ρετροτρανσποζόνια μπορούν να δημιουργήσουν μικροδορυφόρους σε πολυάριθμες περιοχές εντός του γενώματος. Οι προαναφερθείσες ομοπολυμερικές επαναλήψεις που φέρουν στις ακολουθίες τους τα ρετροτρανσποζόνια μπορούν να υποστούν μεταλλάξεις, όπως για παράδειγμα νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, οι οποίες με τη σειρά τους δίνουν γένεση σε μικροδορυφόρους, ποικίλου μήκους και πολυπλοκότητας. Το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί διεξοδικότερα σε ρετροτρανσποζόνια Alu (63), για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν θέσεις εντοπισμού τέτοιων μικροδορυφόρων σε ποσοστό 20% επί του συνολικού τους αριθμού στο γένωμα του ανθρώπου και του χιμπατζή (64).

1.4.2 Γενωμικές αναδιοργανώσεις

Επιπροσθέτως της γενωμικής αστάθειας, τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να προκαλούν γενωμικές ανακατατάξεις όπως απαλοιφές, διπλασιασμούς και αναστροφές. Πιο κάτω αναφέρονται οι μηχανισμοί με τους οποίους τα ρετροτρανσποζόνια παράγουν δομικές παραλλαγές στο ανθρώπινο γένωμα.

Απαλοιφές διαμεσολαβούμενες από ενθετικά γεγονότα: Η ένθεση μεταθετών στοιχείων σε νέες θέσεις εντός του γενώματος, κάποιες φορές μπορεί να προκαλέσει απαλοιφή

παρακείμενων σε αυτά γενωμικών περιοχών. Έχει αποδειχθεί ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων L1 μπορεί να προκαλέσει στο σημείο ένθεσή τους την απαλοιφή γενωμικής ακολουθίας με μήκος κυμαινόμενο από 1 kb μέχρι και μεγαλύτερο των 130 kb (65). Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση, έχει προταθεί ότι η ανεπάρκεια της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (pyruvate dehydrogenase complex deficiency) συνδέεται με μία γενωμική απαλοιφή μεγέθους 46 kb του γονιδίου PDHX (Pyruvate Dehydrogenase Complex, Component X), η οποία προκλήθηκε από ένα L1 ενθετικό γεγονός (66).

Εκτοπικός ανασυνδιασμός: Τα ρετροτρανσποζόνια ακόμα και αν έχουν εντεθεί στο γένωμα χωρίς να προκαλέσουν βλάβη, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού αντιγράφων και της ισχυρής ομολογίας τους σε αυτό, μπορούν να προκαλέσουν γενωμικές ανακατατάξεις σε μετα-ενθετικό στάδιο καθώς λειτουργούν ως σημεία τέλεσης μη αλληλομορφικών ομόλογων ανασυνδιασμών. Ο εκτοπικός ανασυνδιασμός των ρετρομεταθετών στοιχείων δύναται να οδηγήσει σε ποικίλους τύπους γενωμικών ανακατατάξεων όπως απαλοιφές, διπλασιασμούς και αναστροφές. Έχει βρεθεί ότι γειτονικά στοιχεία Alu με αντίθετο προσανατολισμό μπορεί να δημιουργήσουν προϋποθέσεις για ανασυνδιασμό (67). Γεγονότα ανασυνδιασμού εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων περιπτώσεων καρκίνου. Συγκεκριμένα, γεγονότα ανασυνδιασμού Alu/Alu στα γονίδια MLH και BRCA1 συνδέονται με καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού, αντίστοιχα.

Μεταγωγή γενωμικών πλευρικών περιοχών: Κάποιες φορές τα ρετροτρανσποζόνια εντίθενται σε νέες θέσεις «κουβαλώνοντας» ανοδικά ή καθοδικά τους γενωμικές πλευρικές ακολουθίες που προέρχονται από την πρότερη θέση εντοπισμού τους στο γένωμα. Το φαινόμενο αυτό προκύπτει κατά την μεταγραφή του στοιχείου στην οποία ο μεταγραφικός μηχανισμός υπερπηδά το ασθενές ρετροτρανσποζονιακό σήμα πολυαδενυλίωσης και τερματίζει την μεταγραφή του ρετροτρανσποζονίου σε κάποιο εναλλακτικό πολυαδενυλικό σήμα που εντοπίζεται καθοδικά της γενωμικής 3' πλευρικής περιοχής (3' μεταγωγή). Εναλλακτικά, η 5' μεταγωγή μπορεί να λάβει χώρα όταν η μεταγραφή του ρετροτρανσποζονίου εκκινεί από κάποιον υποκινητή που εντοπίζεται ανοδικά του, με αποτέλεσμα ο μεταγραφικός μηχανισμός να συμπαρασύρει και γενωμικό τμήμα που εντοπίζεται καθοδικά του υποκινητή και ανοδικά του ρετροτρανσποζονίου (68), (69). Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, το τελικό μεταγράφημα που περιλαμβάνει τόσο την ακολουθία του ρετροτρανσποζονίου, όσο και το πλευρικό γενωμικό τμήμα, ενσωματώνεται σε μία νέα θέση στο γένωμα μέσω της ρετρομετάθεσης. Το 10% των L1 και SVA ενθέσεων συνδέεται με γεγονότα 3' μεταγωγής (54).

1.4.3 Ο αντίκτυπος των ρετροτρανσποζονίων στην γονιδιακή έκφραση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί πιο πάνω, τα ρετροτρανσποζόνια έχουν επηρεάσει δραματικά την εξέλιξη του ανθρώπου σε επίπεδο DNA. Εξίσου σημαντική όμως είναι και η συνεισφορά του στην διαμόρφωση της ανθρώπινης εξέλιξης και σε επίπεδο RNA, μέσω των μηχανισμών που αναφέρονται πιο κάτω.

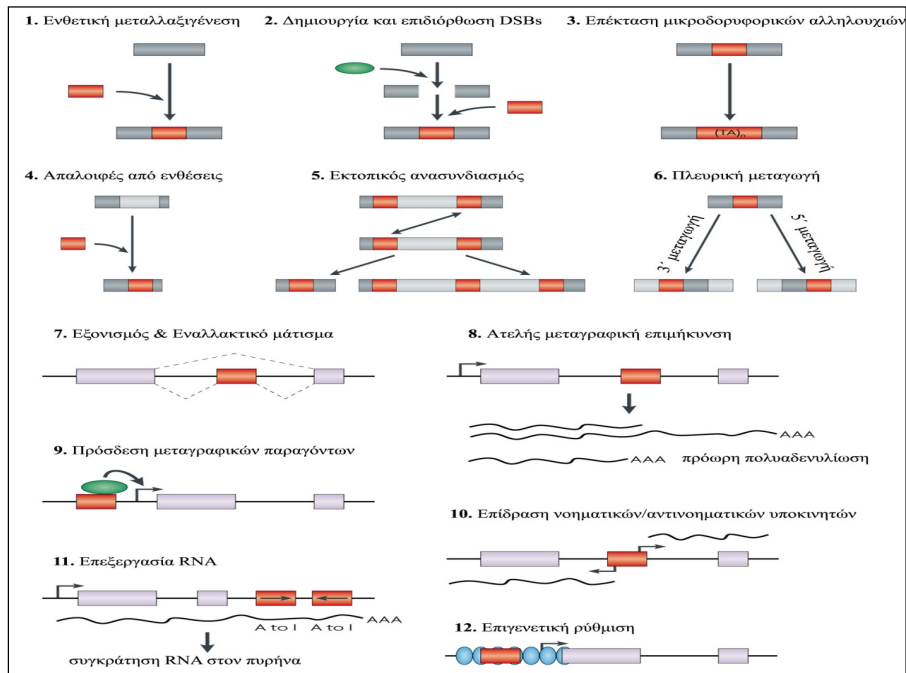
Τροποποίηση γονιδιακής έκφρασης – Επεξεργασία RNA (RNA Editing): Τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την έκφραση παρακείμενων σε αυτά γονιδίων μέσα από ένα εύρος διαφορετικών μηχανισμών. Καθώς είναι γνωστό ότι τα ρετρομεταθετά στοιχεία φέρουν θέσεις δότη και δέκτη ματίσματος εντός της αλληλουχίας τους, η ένθεσή τους σε ιντρόνια μπορεί να οδηγήσει σε εναλλακτικό μάτισμα εντός του ρετροτρανσποζονίου και την ενσωμάτωση τμήματος της αλληλουχίας του στο

mRNA, φαινόμενο που καλείται εξονισμός (exonization) (70), (71). Επιπλέον, τα ρετροτρανσποζόνια είναι δυνατό να παρέχουν σήματα πολυαδενυλίωσης τερματίζοντας πρόωρα την μεταγραφή των γονιδίων και οδηγώντας ενδεχομένως στη παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών (72), (73). Επιπρόσθετα, δύνανται να λειτουργήσουν ως ιστο-ειδικοί ή μη ενισχυτές ή καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης (74), (75). Οι αλληλουχίες των ρετρομεταθετών στοιχείων περιλαμβάνουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και μπορούν να επηρεάσουν την μεταγραφή (76), (77). Μάλιστα ενδεικτικό της σημασίας των μεταθετών στοιχείων στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι το γεγονός ότι το 25% όλων των υποκινητών των γονιδίων του ανθρώπου φέρουν αλληλουχίες που προέρχονται από αυτά (78). Τα ρετροτρανσποζόνια αποτελώντας θέσεις πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης II, (79), (80) μπορούν να παρέμβουν στην μεταγραφική επιμήκυνση των γονιδίων-ξενιστών τους. Τέλος, οι λειτουργικοί υποκινητές (δύο κατευθύνσεων, σε αρκετές περιπτώσεις) που εμπεριέχονται στις ακολουθίες των ρετρομεταθετών στοιχείων μπορούν να εκκινήσουν την νοηματική ή αντι-νοηματική μεταγραφή γειτονικών σε αυτά γονιδίων (81), (11).

Η απαμίνωση καταλοίπων αδενοσίνης προς ινιδίνη αποτελεί έναν ιστο-ειδικό μετα-μεταγραφικό μηχανισμό επεξεργασίας δίκλωνων μορίων RNA. Η RNA επεξεργασία αδενοσίνης προς ινιδίνη (A(denosine) to I(nosine) Editing) είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στον άνθρωπο, και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι το 90% όλων των υποκαταστάσεων A προς I λαμβάνουν χώρα σε ακολουθίες των στοιχείων Alu, οι οποίες εμπεριέχονται στα υπό επεξεργασία mRNA (82), (83). Η επεξεργασία αυτή μπορεί να εξαλείψει τις θέσεις ματίσματος και ως εκ τούτου να παρέμβει δραστικά σε φαινόμενα εναλλακτικού ματίσματος εξονισμένων (exonized) ακολουθιών Alu. Επιπλέον, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η απαμίνωση αδενοσίνης προς ινιδίνη που λαμβάνει χώρα σε ζεύγη αναστραμμένων Alu στοιχείων εντός των 3' UTR των mRNA, παρεμποδίζει την έκφραση του μεταγράφου μέσω συγκράτησής του στον πυρήνα του κυττάρου (84). Με αυτό τον τρόπο αποσιωπάται το γονίδιο στο οποίο έχουν εντεθεί δύο ανεστραμμένα στοιχεία Alu.

Επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης: Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι πλούσια σε αλληλουχίες δινουκλεοτιδίων γουανίνης-κυτοσίνης, οι οποίες τα καθιστούν εξαιρετικά πιθανούς στόχους μεθυλίωσης με απώτερο σκοπό την καταστολή της έκφρασής τους ή/και κινητοποίησής τους εντός του γενώματος (85). Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, η ένθεση των ρετροτρανσποζονίων σε γενωμικές θέσεις πλησίον γονιδίων μπορεί να επιφέρει την παθητική μεθυλίωση αυτών και συνεπώς την αποσιώπησή τους (86).

Στην εικόνα 1.7 δίδονται σχηματικά όλοι οι άνωθεν μηχανισμοί επίδρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων στη δομή του γενώματος και την γονιδιακή ρύθμιση.



Εικόνα 1.7: Επίδραση ρετρομεταθετών στοιχείων (κόκκινο χρώμα) στην δομή του γενώματος (σκούρο γκρι χρώμα) και την γονιδιακή (ανοιχτό γκρι χρώμα) έκφραση. Τροποποιημένη από (87).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία πολλές φορές παρέχουν στον ξενιστή ενεργότητες που δε θα διέθετε υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι ενεργότητες αυτές αφορούν σε δομικές και δεσμευόμενες σε νουκλεϊκά οξέα πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο πακετάρισμα του RNA, καθώς και πρωτεΐνες με δραστηριότητες dUTPάσης (88), πρωτεάσης (89), ιντεγκράσης (90), αντίστροφης μεταγραφάσης (91). Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις οι ενεργότητες των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη, με χαρακτηριστικότερη την περίπτωση των προϊόντων των γονιδίων ενν των στοιχείων HERV-W και του αυξητικού παράγοντα πλειοτροπίνη που είναι απαραίτητα για το φυσιολογικό σχηματισμό και λειτουργία του πλακούντα (92), (93). Στην περίπτωση μάλιστα των ενδογενών ρετροϊών, ένα επιπλέον πλεονέκτημα που προσφέρει η έκφραση των προϊκόν πρωτεϊνών στους ξενιστές είναι η μερική ανθεκτικότητα στη μόλυνση από τους αντίστοιχους εξωγενείς ρετροϊούς (94).

1.5 ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ-ΞΕΝΙΣΤΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ

Φυσιολογικά η συχνότητα ρετρομετάθεσης σε ένα κύτταρο είναι εξαιρετικά χαμηλή εξαιτίας των διαφόρων μηχανισμών που αυτό έχει αναπτύξει για την προστασία της γενωμικής ακεραιότητάς του έναντι των ζημιολογικών επιπτώσεων της ρετρομετάθεσης. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν την επιγενετική ρύθμιση των ρετρομεταθετών στοιχείων που συνίσταται σε κληρονομικές τροποποιήσεις μέσω της διαδικασίας της μείωσης ή μίτωσης, οι οποίες όμως είναι αντιστρεπτές και δεν επιφέρουν μεταβολή στην ακολουθία του DNA. Οι τρεις κυριότεροι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης είναι η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης (μέσω ομοιοπολικών τροποποιήσεων των ιστονικών ουρών) και ο μηχανισμός RNA παρέμβασης. Με αυτούς τους μηχανισμούς το κύτταρο διατηρεί την ομοιόστασή του και ταυτόχρονα αποτρέπει τις συνέπειες της έκφρασης αλληλουχιών επαναλαμβανόμενου DNA όπως είναι τα ρετροτρανσποζόνια

1.5.1 Η μεθυλίωση του DNA στη μεταγραφική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης

Η πιο ενδελεχώς μελετημένη επιγενετική τροποποίηση στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση, η οποία αναφέρεται στην ομοιοπολική προσθήκη μίας μεθυλομάδας στο 5' άτομο άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης, που εντοπίζεται κυρίως σε δινουκλεοτίδια CpG (ή νησίδες CpG). Οι νησίδες CpGs εντοπίζονται κοντά σε υποκινητές γονιδίων και σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία όπως είναι τα ρετροτρανσποζόνια (95). Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται μεθυλοτρασφεράσες (DNA methylotransferases, DNMTs). Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί πέντε μέλη της οικογένειας των DNMTs, οι DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b και DNMT3L, οι οποίες στοχοποιούν υπομεθυλιωμένες νησίδες CpGs και τις μεθυλιώνουν *de novo* (96). Σε γενικές γραμμές η μεθυλίωση νησίδων CpGs επιφέρει μεταγραφική αποσιώπηση.

Η μεθυλίωση του DNA περιορίζει τη δυνατότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων να ενεργοποιούνται, να μεταγράφονται και να συμμετέχουν στο φαινόμενο του ανασυνδιασμού (97). Η ρύθμιση των ρετροτρανσποζονίων πραγματοποιείται τόσο συνολικά, όπως καταμαρτυρεί το γεγονός της έντονης παρουσίας τους σε περιοχές ετεροχρωματίνης, όσο και πιο εντοπισμένα σε κάθε ρετροτρανσποζόνιο ξεχωριστά (98). Παρότι λοιπόν η πλειοψηφία των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι μεθυλιωμένα σε μεγάλο βαθμό στα σωματικά κύτταρα, ένα ποσοστό αυτών, της τάξης του 10-15%, είναι μη μεθυλιωμένο (99).

Μεταξύ των προαναφερθέντων πρωτεϊνών που καταλύουν την μεθυλίωση του DNA, ενεργό ρόλο στην αποσιώπηση των ρετροτρανσποζονίων διαδραματίζει η DNA μεθυλοτρασφεράση DNMT3L, η οποία είναι κρίσιμης σημασίας για την μεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (100), (101). Επιπλέον, ένας συνεχώς αυξανόμενος όγκος δεδομένων επιβεβαιώνει την συσχέτιση μεταξύ γενωμικής υπομεθυλίωσης και ενεργοποίησης των LTR ρετροτρανσποζονίων. Μελέτες σε διαγονιδιακούς επίμυες με μεταλλαγμένη την DNMT1 (*Dnmt1^{-/-}*) απέδειξαν την πρόκληση εκτεταμένης απομεθυλίωσης στα ρετροτρανσποζόνια MoMLVs και IAPs, ενώ η έκφραση των δευτέρων αυξήθηκε κατά 100 φορές συγκριτικά με τα άγριου τύπου ποντίκια (102). Προς επιβεβαίωση των άνωθεν συμπερασμάτων, μία δεύτερη μελέτη σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα με αποσιωπημένες τις πρωτεΐνες DNMT3a και DNMT3b, απέδειξε αδυναμία μεθυλίωσης των νέων ενθέσεων MoMLV (103). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η ενδογενής μεθυλίωση μειώνει την απόδοση της RNA πολυμεράσης II (104), γεγονός που προτείνει ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης των ρετροτρανσποζονίων μπορεί να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση.

Κατά κοινή ομολογία, το DNA των περισσότερων όγκων επιδεικνύει μία καθολική υπομεθυλίωση, που έχει συσχετιστεί σε πολλές έρευνες με την μεταγραφική ενεργοποίηση ρετρομεταθετών στοιχείων ή/και την επακόλουθη κινητοποίησή τους. Εν προκειμένω, έκφραση των ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊών λόγω υπομεθυλίωσής τους έχει ανιχνευθεί σε δείγματα καρκίνου του στήθους (105), των ωοθηκών (106), σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (107) καθώς και σε καρκινώματα των νεφρικών κυττάρων και κυττάρων του ουροποιητικού συστήματος (108). Επιπρόσθετα, υψηλή μεταγραφική έκφραση των στοιχείων HERV-K ανιχνεύθηκε και σε περιπτώσεις τερατοκαρκινώματος (109) και μελανώματος (110). Σε μία άλλη έρευνα αποδείχθηκε ότι ένα συγκεκριμένο στοιχείο HERV-H που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X επιδεικνύει επιλεκτική μεταγραφική ενεργότητα στο 60% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου, και ακόμα περισσότερο σε μεταστατικούς καρκίνους του εντέρου (111). Υπομεθυλίωση στον υποκινητή του L1 έχει αναφερθεί στο πολλαπλό μυέλωμα (112), στη χρόνια μυελοειδή λευχαιμία (CML) (113) και την χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία προτείνοντας ότι τα L1 μπορεί να μεταγράφονται σε αυτούς τους καρκίνους (114). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι

περιπτώσεις CML με υπομεθυλιωμένο τον υποκινητή των L1, τείνουν να είναι επιθετικά νεοπλάσματα με φτωχή πρόγνωση παρόλο που δεν είναι γνωστή η άμεση σύνδεση των L1 με την επιθετικότητα (113).

1.5.2 Ιστονικές τροποποιήσεις στη μεταγραφική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης

Η χρωματίνη αποτελεί την συμπυκνωμένη μορφή ενός νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου που απαρτίζεται από το DNA και τις ιστόνες, και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η δομική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, που αποτελείται από ένα οκταμερές πρωτεϊνών, τις ιστόνες, γύρω από τις οποίες περιελίσσονται 147 ζεύγη βάσεων του DNA. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος συγκροτείται από ένα ετεροτετραμερές των ιστονών H3/H4 και δύο ετεροδιμερή των ιστονών H2A/H2B που σχηματίζουν μία σωληνοειδή δομή γύρω από την οποία περιελίσσεται η διπλή έλικα του DNA. Τα προκύπτοντα νουκλεοσώματα αποτελούν τις θεμελιώδεις, επαναλαμβανόμενες μονάδες της χρωματίνης (115). Κάθε ιστόνη περιέχει μία ευέλικτη αμινοτελική ουρά η οποία προεκβάλλει από την πλευρική επιφάνεια του ιστονικού οκταμερούς και υπόκειται σε ένα σημαντικό αριθμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Οι καλύτερα χαρακτηρισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που συναντώνται στα αμινοξέα των ιστονών είναι: η ακετυλίωση λυσίνης, η μεθυλίωση λυσίνης και αργινίνης, η φωσφορυλίωση σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης καθώς και η ουβικιτινυλίωση λυσίνης (116). Καθεμία από αυτές τις ιστονικές τροποποιήσεις είναι δυνατό να μεταβάλλει την δομή της χρωματίνης και ως εκ τούτου να την καταστήσει μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή.

Η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης ρυθμίζεται από την δράση δύο πρωτεϊνών, της ακετυλομεταφοράσης των ιστονών (**H**istone **A**cetyl-**T**ransferase, **HAT**) και της από-ακετυλάσης των ιστονών (**H**istone **D**e**A**Cetylase, **HDAC**). Η ακετυλίωση εξουδετερώνει το θετικό φορτίο της λυσίνης και ως εκ τούτου αποδυναμώνει την πρόσδεση του DNA με τις ιστονικές ουρές. Συνεπώς, η ακετυλίωση σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η από-ακετυλίωση είθισται να συνδέεται με μεταγραφική καταστολή. Η μεθυλίωση των ιστονών συνήθως λαμβάνει χώρα στις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης και επηρεάζει την δραστηριότητα μεταγραφικών πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με την ιστονική ακετυλίωση η οποία συνδέεται με ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, η ιστονική μεθυλίωση μπορεί είτε να ενεργοποιήσει (π.χ. H3K4me2, H3K4me3), είτε να καταστείλει (π.χ. H3K9me2, H3K27me3) την μεταγραφή, ανάλογα με την θέση στην οποία πραγματοποιείται (117), (118), (119).

Αρκετοί μηχανισμοί τροποποίησης της δομής της χρωματίνης εμπλέκονται στην μεταγραφική αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων των ιστονικών ουρών, μεθυλίωσης του DNA και μεταβολών στο πακετάρισμα και την συμπύκνωση της χρωματίνης. Τα νουκλεοσώματα που συσχετίζονται με ρετροτρανσποζόνια παρουσιάζουν ισχυρή μεθυλίωση της ιστόνης H3 στην λυσίνη 9 (H3K9) που συνεπάγεται μεταγραφική καταστολή και ετεροχρωματινοποίηση (120), (121). Μεταλλάξεις σε γονίδια που απαιτούνται για τροποποιήσεις των ιστονικών ουρών συσχετιζόμενες με μεταγραφική αποσιώπηση (ετεροχρωματινοποίηση), επιφέρουν ενεργοποίηση των μεταθετών στοιχείων. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο *Suv39* της μεθυλοτρανσφεράσης που καταλύει την μεθυλίωση της ιστόνης H3 (H3K9me), οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ρετροτρανσποζονιακών μεταγράφων σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (121). Η έντονη παρουσία των ρετρομεταθετών στοιχείων σε περιοχές ετεροχρωματίνης είναι το αποτέλεσμα αποσιωπητικών ιστονικών τροποποιήσεων (98). Εν προκειμένω, τα στοιχεία Alu είναι αποσιωπημένα μέσω τριμεθυλίωσης H3K9

(122), ενώ τα LINEs αποσιωπούνται μέσω τριμεθυλίωσης H3K9 και H4K20 μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από τις πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος (123).

1.5.3 Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις στη ρύθμιση της ρετρομετάθεσης

Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναπτύξει το οπλοστάσιό τους για την προστασία της γενωμικής τους ακεραιότητας από την δράση των ρετροτρανσποζονίων με μηχανισμούς RNA παρέμβασης (RNA-interference, **RNAi**) που αποσκοπούν στην εξάλειψη των ρετροτρανσποζονιακών μεταγράφων αφού αυτά έχουν παραχθεί στο κύτταρο ξενιστή διαφεύγοντας από τους μηχανισμούς μεταγραφικής τους αποσιώπησής. Με τον όρο “RNA παρέμβαση” αναφερόμαστε σε έναν θεμελιώδη βιολογικό μηχανισμό κυτταρικής ρύθμισης της γονιδιακής σίγασης μετα-μεταγραφικά. Η εκκίνηση του γίνεται από πρόδρομα δίκλινα μόρια RNA (double-stranded RNA-dsRNA) των οποίων το μέγεθος και η προέλευση ποικίλει. Τα μόρια αυτά αρχικά εξελίσσονται ταχύτατα σε μικρά δίκλινα μόρια RNA με μήκος περίπου από 21 έως 28 νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια συμμετέχουν στην αναγνώριση των συμπληρωματικών τους μονόκλωνων μορίων RNA και οδηγούν είτε στη διάσπαση ή τη μεταφραστική καταστολή των τελευταίων. Στους στόχους του μηχανισμού της RNAi συμπεριλαμβάνονται RNAs ιών και μεταθετών στοιχείων, καθώς και μόρια RNA με ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη, και στην τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, συμβάλλοντας έτσι στην ακεραιότητα του γονιδιώματος.

Στην αποσιώπηση των ρετρομεταθετών στοιχείων μέσω του μηχανισμού RNA παρέμβασης, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα RNAs-σχετιζόμενα με τις πρωτεΐνες Piwi (Piwi-interacting RNAs, piRNAs), τα οποία ανακαλύφθηκαν αρκετά πρόσφατα και το όνομά τους οφείλεται στην πρόσδεσή τους στις πρωτεΐνες Piwi, που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Ago. Η συμβολή τους στην αποσιώπηση των ρετροτρανσποζονίων έχει κατανοηθεί αποτελεσματικότερα στα γαμετικά κύτταρα της *Drosophila* (εικόνα 1.8).

Τα piRNAs έχουν μήκος 25-33 νουκλεοτίδια και προέρχονται από ευδιάκριτες συστοιχίες ακολουθιών piRNAs, η πλειονότητα των οποίων σχετίζονται με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ρετροτρανσποζονίων. Τα piRNAs εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα της γαμετικής σειράς όπως για παράδειγμα κατά την σπερματογένεση όπου διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην αποσιώπηση ρετροτρανσποζονίων και άλλων επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (124). Στους όρχεις των ποντικών οι υποκινητές των ρετροτρανσποζονίων L1 και IAP είναι έντονα μεθυλιωμένοι. Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες PIWI οδήγησαν σε αδυναμία μεθυλίωσης των υποκινητών L1 και IAP με αποτέλεσμα την δραματική αύξηση της έκφρασης των εν λόγω ρετροτρανσποζονίων και την πρόκληση στειρότητας στα πειραματόζωα (125), (126). Προς την ίδια κατεύθυνση, μία άλλη έρευνα απέδειξε ότι η πρόκληση μεταλλάξεων στο μονοπάτι piRNA-PIWI οδήγησε σε πλειορύθμιση των ρετροτρανσποζονίων και σε αυξημένο αριθμό θραύσεων διπλής αλύσου DNA, σε γαμετικά κύτταρα ωοθηκών του οργανισμού *Drosophila* (127). Συνεπώς οι πρωτεΐνες PIWI είναι κρίσιμης σημασίας για την *de novo* εγκαθίδρυση ενός φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσης των μεταθετών στοιχείων στα γαμετικά κύτταρα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί η ύπαρξη πρωτεϊνών PIWI και piRNAs και σε σωματικά κύτταρα (128), ενώ σε καρκινικά κύτταρα προστάτη έχει βρεθεί δραματική μείωση (>9-fold) των PIWI-L1 εν συγκρίσει με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα προστάτη με ταυτόχρονη δράση της ORF2p πρωτεΐνης, γεγονός που υποστηρίζει το ρόλο των PIWI στην αποσιώπηση ρετρομετάθεσης των L1 (129). Η θέσπιση του μηχανισμού της piRNA

Ένας επιπρόσθετος μηχανισμός μετα-μεταγραφικής ρύθμισης των ρετροτρανσποζονίων που έχει αναπτύξει το κύτταρο για την προστασία της γενωμικής του ακεριότητας εμπλέκει και το φαινόμενο της αυτοφαγίας. Σε αυτό το συμπέρασμα οδήγησαν μελέτες που απέδειξαν ότι μετάγραφα των L1 και Alu εσωκλείονται σε ανθρώπινα αυτοφαγοσώματα τα οποία τελικά οδηγούν στη αποδόμησή τους, Πράγματι, σε ποντίκια που έχουν απολέσει τα κρίσιμης σημασίας γονίδια αυτοφαγίας Atg6/Beclin 1, παρατηρείται μία σημαντική αύξηση τόσο στην έκφραση ρετροτρανσποζονιακών μεταγράφων, όσο και στον αριθμό των γενωμικών τους ενθέσεων (132).

Τέλος, σε πολλές έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι η ρετρομετάθεση, ιδίως των στοιχείων L1, περιορίζεται σημαντικά, τόσο σε σωματικά, όσο και σε γαμετικά κύτταρα, από την δράση πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των απαμινασών της κυτιδίνης APOBEC (133), (134).

1.6 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ HERV-K(10) ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΡΕΤΡΟΪΩΝ

Τα ανθρώπινα χρωμοσώματα φέρουν πολυάριθμες ρετροϊκές ακολουθίες που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της γενετικής μας κληρονομιάς. Συνολικά, οι ακολουθίες των ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊών πιστεύεται ότι αποτελούν περίπου το 8% του γενώματός και απαντούν σε 500.000 αντίγραφα. Τα στοιχεία αυτά προέρχονται από αρχέγονες μολύνσεις εξωγενών ρετροϊών σε κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς που έλαβαν χώρα πριν από 2-40 εκατομμύρια χρόνια. Με βάση αυτό, οι ενδογενείς ρετροϊοί που εντοπίζονται στο γένωμα όλων των σπονδυλωτών ζώων θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως μουσεία αρχέγονων ρετροϊών. Όλοι οι γνωστοί προϊοί του ανθρώπινου γενώματος έχουν υποστεί μετα-ενθετικές μεταλλάξεις, απαλοιφές και ανασυνδιασμούς που τους κατέστησαν μη-μολυσματικούς.

Μελέτες φυλογενετικής ανάλυσης έχουν επιτρέψει την ταξινόμηση αυτών των στοιχείων σε διακριτές ομάδες οι οποίες αναφέρονται ως οικογένειες. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ταξινόμησής των HERVs, με την πιο πρόσφατη από αυτές να χρησιμοποιεί (για τον διαχωρισμό τους) την αμινοξική ειδικότητα του tRNA που εκκινεί την αντίστροφη μεταγραφή από την θέση PBS (135). Εξαιτίας όμως της σύγχυσης που προκαλείται όταν δύο διαφορετικά στοιχεία HERV χρησιμοποιούν το ίδιο tRNA για την έναρξη τη αντίστροφης μεταγραφής τους, κρίθηκε αναγκαία η εγκαθίδρυση και άλλων κριτηρίων που θα επιτρέπουν την ταξινόμησή τους. Με βάση αυτό, ένας επιπλέον τύπος ταξινόμησή τους χρησιμοποιεί την ομολογία της αλληλουχίας των HERVs με αυτή των αντίστοιχων εξωγενών ρετροϊών. Έτσι λοιπόν υπάρχουν 1) οι τάξης I HERVs, που εμφανίζουν αλληλουχική ομολογία με τους ιούς MLV (*Murine Leukemia Viruse*, **MLV**) και BaEV (*Baboon Endogenous Virus*, **BaEV**), και ανήκουν στην κατηγορία των Γάμμα ρετροϊών, 2) οι τάξης II HERVs που εμφανίζουν ομολογία με τον MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*, **MMTV**), και ανήκουν στην κατηγορία των Βήτα ρετροϊών (136), (137) και τέλος 3) οι τάξης III HERVs, που ανήκουν στην κατηγορία των αφρωδών ρετροϊών. Στον πίνακα 1.2 παραθέτονται αντιπροσωπευτικές οικογένειες HERV καθώς και οι επιδράσεις τους (επιβλαβείς ή ωφέλιμες) στο ανθρώπινο γένωμα.

Οικογένεια HERV	Αριθμός αντιγράφων (solo LTR)	Επίδραση
Γάμμα ρετροϊοί (Τάξη I)		
HERV-E	250 (1.000)	Σύνδρομο Oritz
HERV-W	40 (1.100)	Σχηματισμός πλακούντα
HERV-FRD	50 (2.000)	Σχηματισμός πλακούντα
HERV-H	1.000 (1.000)	Γονιδιακή έκφραση
Βήτα ρετροϊοί (Τάξη II)		
HERV-K (HML-2)	60 (2.500)	Καρκινογένεση
Αφρώδεις ρετροϊοί (Τάξη III)		
HERV-L	580 (6.000)	Περιορισμός Fv-1 στους μύες

Πίνακας 1.2: Αντιπροσωπευτικές οικογένειες HERV και επιβλαβείς ή ωφέλιμες επιδράσεις τους στο γένωμα. Δίνονται ο αριθμός αντιγράφων, καθώς και ο αριθμός solo LTR (αναφέρεται στην παρένθεση)

Οι πιο πρόσφατα ενσωματωθέντες και καλύτερα συντηρημένοι ρετροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των HERV-K στοιχείων (138). Η οικογένεια των HERV-K προϊόντων διαχωρίζεται περαιτέρω σε 10 υπο-οικογένειες, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων αποτελεί η χρήση του tRNA που παρουσιάζει ειδικότητα για την λυσίνη, ως εκκινήτη για την αντίστροφη μεταγραφή. Η ταξινόμησή των HERV-K στις προαναφερθείσες 10 υπο-οικογένειες γίνεται βάσει διαφορών στην αλληλουχία της συντηρημένης περιοχής που κωδικοποιεί για την αντίστροφη μεταγραφή. Επιπλέον οι οικογένειες αυτές αναφέρονται και ως HML- 1 έως 10 (Human MMTV-like), χάριν της ομολογίας τους με τον βήτα ρετροϊό MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) (139), (140).

Αναφορικά με την υπερ-οικογένεια των HERV-K10 στοιχείων, φαίνεται πως ενσωματώθηκαν στα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς πριν από περίπου 30 εκατομμύρια χρόνια, πριν από τον εξελικτικό διαχωρισμό των ανθρωποειδών (hominoids, πίθηκοι στους οποίους συγκαταλέγεται και ο άνθρωπος) και των κερκοπιθηκοειδών (ή μαϊμούδες του Παλαιού Κόσμου, Old World monkeys). Ωστόσο, υπάρχουν αποδείξεις για την πραγματοποίηση μίας συνεχούς ενίσχυσης των HERV-K (HML-2) ακολουθιών στα ανθρωποειδή και τον άνθρωπο, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και στοιχεία τα οποία είναι ειδικά για τον άνθρωπο (141), (142). Ο νεότερος HERV-K προίος που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα είναι ο HERV-K113, η ηλικία του οποίου υπολογίζεται στα <200.000 χρόνια (143).

Υπάρχουν περίπου 550 αντίγραφα HERV-K στο ανθρώπινο γένωμα, από τα οποία μόλις 30-50 είναι πλήρους μήκους, ενώ εντοπίζονται επιπλέον 6.400 μονήρη LTR (solo LTR). Τα πλήρους μήκους στοιχεία διαθέτουν δύο LTR εκατέρωθεν, μήκους περίπου 1Kb η κάθε μία (25), οι οποίες αποτελούν τον υποκινητή και το σήμα πολυαδενυλίωσης, αντίστοιχα, ενώ αρκετά από αυτά περιέχουν άθικτα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες (144), (145), (146). Η οικογένεια HERV-K αποτελεί την πιο ενεργή οικογένεια HERV σε μεταγραφικό επίπεδο στο ανθρώπινο γονιδίωμα, και μάλιστα έχουν ανιχνευθεί διαφορετικά επίπεδα έκφρασης HERV-K μεταξύ διαφόρων ιστών, καρκινικών (147), (148), (149), (150) και φυσιολογικών (137). Επιπλέον, έχει ανιχνευθεί και παραγωγή ψευδοϊικών σωματιδίων (145), γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι πιθανώς υπάρχουν ενεργές μορφές τους στο ανθρώπινο γένωμα.

Η οικογένεια HERV-K10 είναι πιθανότατα ο πιο καλά μελετημένος υποπληθυσμός των HERV, κι αντιστοιχούν στο 1-2% του ανθρώπινου γενώματος. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 60 αντίγραφα HERV-K10 στον άνθρωπο και περίπου 2.500 solo LTR.

Ο πρωτότυπος HERV-K10 (HERV-K101) προϊός έχει μέγεθος 9,469 bp και η αλληλουχία του είναι αντιπροσωπευτική ολόκληρης της τάξης (25).

1.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

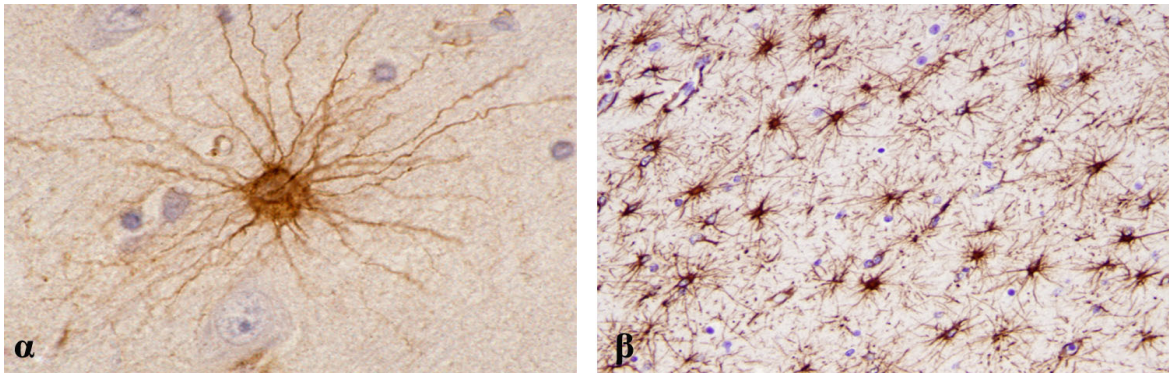
Το νευρικό σύστημα απαρτίζεται από δύο βασικές κατηγορίες κυττάρων: τους νευρώνες και την γλοία. Οι δύο αυτές κύριες τάξεις κυττάρων διαχωρίζονται σε υποτάξεις που διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στο βιοχημικό τους χαρακτήρα και στη λειτουργία τους. Οι νευρώνες αν και δεν είναι η πολυπληθέστερη κατηγορία κυττάρων του νευρικού συστήματος, δεδομένου ότι τα κύτταρα της γλοίας υπερτερούν σε αριθμό κατά δέκα φορές, είναι ωστόσο η καλύτερα μελετημένη εξαιτίας των λειτουργικών τους ιδιοτήτων που διαμορφώνουν την πολυπλοκότητα και λειτουργία του νευρικού συστήματος. Τα κύτταρα της γλοίας υποδιαιρούνται σε:

1.7.1 Αστροκύτταρα: Τα αστροκύτταρα αποτελούν αριθμητικά τον κυρίαρχο κυτταρικό τύπο της γλοίας καθώς καταλαμβάνουν περίπου το ήμισυ του εγκεφάλου των θηλαστικών (151). Τα αστροκύτταρα επιτελούν ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), μεταξύ των οποίων, η λήψη και ανακύκλωση του γλουταμινικού οξέος και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος, η διατήρηση του εξωκυττάρου ιοντικού περιβάλλοντος (μέσω της λήψης ιόντων καλίου που απελευθερώνονται κατά την νευρωνική δραστηριότητα), η δομική και μεταβολική στήριξη των νευρώνων και η βιοχημική στήριξη των ενδοθηλιακών κυττάρων που διαμορφώνουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Τα αστροκύτταρα μπορούν να επουλώσουν τραύματα του ΚΝΣ σχηματίζοντας στο σημείο της βλάβης μία αστρογλοιακή ουλή (glial scar) μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται γλοίωση ενώ πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι δύνανται να δια-διαφοροποιηθούν σε νευρώνες αποκαθιστώντας με αυτό τον τρόπο το τοπικό νευρικό δίκτυο (152).

Τα αστροκύτταρα διαθέτουν όπως υπαινίσσεται και το όνομά τους, αστεροειδές σχήμα λόγω των πολλαπλών κυτταρικών αποφυάδων τους που καταλαμβάνουν τον περισσότερο χώρο μεταξύ των νευρώνων. Οι διάφορες λειτουργίες των εν λόγω κυττάρων επιτελούνται μέσω αυτών των εκτεταμένων κυτταροπλασματικών προεκβολών οι οποίες προσεγγίζουν όλες τις βασικές περιοχές της νευρωνικής ανατομίας (κυτταρικό σώμα, άξονας, δενδρίτες και συνάψεις) και επιπλέον, εκτείνονται μέχρι την επιφάνεια του εγκεφάλου κάτω από την χοριοειδή μήνιγγα, όπου και δημιουργούν ένα αφοριστικό πέταλο ή αφοριστική γλοία (glial limiting membrane ή glial limitans). Οι αποφυάδες των αστροκυττάρων έρχονται σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων, σχηματίζοντας τα τελικά αγγειακά πόδια, τα οποία μαζί με τα σχεδόν αδιαπέραστα ενδοθηλιακά κύτταρα απαρτίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος προστατεύει το ΚΝΣ από τη συστηματική κυκλοφορία (153).

Τα αστροκύτταρα διακρίνονται γενικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την μορφολογία τους και την περιοχή στην οποία εντοπίζονται. Στην φαιά ουσία είναι πιο εμφανή τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα με πολλές λεπτές αποφυάδες ενώ στη λευκή ουσία υπερτερούν τα ινώδη αστροκύτταρα με λίγες μακρές αποφυάδες. Μείζονος σημασίας στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου είναι τα ακτινωτά αστροκύτταρα (radial astrocytes) τα οποία λειτουργούν σαν ικρίωμα που καθοδηγεί την μετανάστευση των νευρώνων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Επιπλέον, τα ακτινωτά

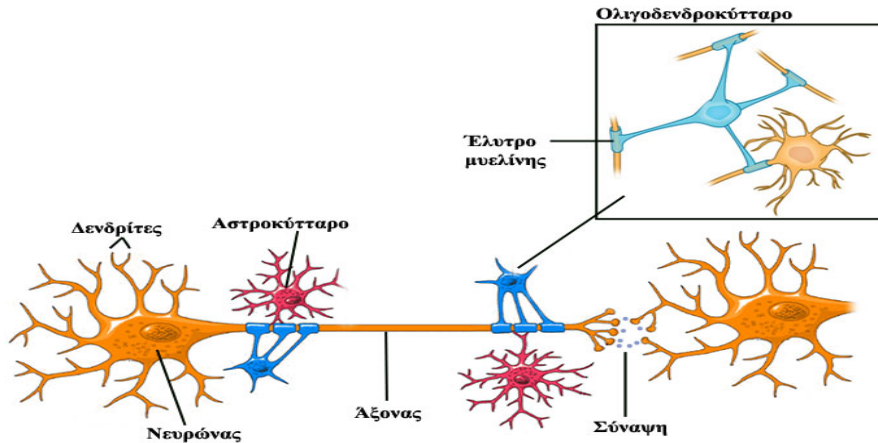
αστροκύτταρα λειτουργούν και ως προγονικά κύτταρα ικανά να διαφοροποιούνται σε κύτταρα τόσο της γλοιακής, όσο και της νευρωνικής γενεαλογίας (153).



Εικόνα 1.9: (154) Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης GFAP: **α)** Αστροκύτταρο με χαρακτηριστική αστεροειδή μορφολογία λόγω των πολλαπλών αποφυάδων που εκτείνονται μακριά από το κυτταρικό του σώμα. **β)** Ενεργά αστροκύτταρα της λευκής ουσίας κατά την διαδικασία της γλοΐωσης σε βρέφος με περικοιλιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια.

Ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός των αστροκυττάρων γίνεται με ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα ειδικά προς την όξινη γλοιακή ινιδική πρωτεΐνη (**Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP**). Η GFAP αποτελεί μια ειδική μορφή ενδιάμεσου νηματίου του κυτταροσκελετού των αποφυάδων που χαρακτηρίζει αποκλειστικά τα αστροκύτταρα (εικόνα 1.9) (153).

1.7.2 Ολιγοδενδροκύτταρα: Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα αστροκύτταρα και έχουν βραχύτερες και λιγότερες αποφυάδες από αυτά. Εντοπίζονται τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία. Αποτελούν τον πολυπληθέστερο τύπο γλοιακού κυττάρου της λευκής ουσίας και παρατάσσονται ανάμεσα και κατά μήκος της πορείας που ακολουθούν οι άξονες των νευρικών κυττάρων (εικόνα 1.10). Στη φαιά ουσία εντοπίζονται πολύ κοντά στα σώματα των νευρώνων και γι' αυτό τον λόγο αποκαλούνται δορυφόρα ολιγοδενδροκύτταρα, όπου θεωρείται ότι έχουν κυρίως στηρικτικό ρόλο και επηρεάζουν το βιοχημικό περιβάλλον των νευρώνων. Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την δημιουργία του ελύτρου μυελίνης που επενδύει και μονώνει του άξονες των νευρικών κυττάρων επιτρέποντας την φυσιολογική μετάδοση των νευρικών ώσεων μεταξύ των. Στο περιφερικό νευρικό σύστημα η μυελίνωση των νευρικών κυττάρων επιτελείται από τα κύτταρα Schwann. Κάθε κύτταρο Schwann παράγει μυελίνη για ένα μόνο εμμύελο νευράξονα, σε αντίθεση με τα ολιγοδενδροκύτταρα του ΚΝΣ που διαμορφώνουν τα έλυτρα μυελίνης για πολλαπλούς νευράξονες.



Εικόνα 1.10: Τα ολιγοδενδροκύτταρα φέρουν κυτταρικές αποφυάδες οι οποίες περιελίσσονται γύρω από τους νευράζονες προκειμένου να διαμορφώσουν τα έλυτρα μυελίνης που επενδύουν τα νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ.

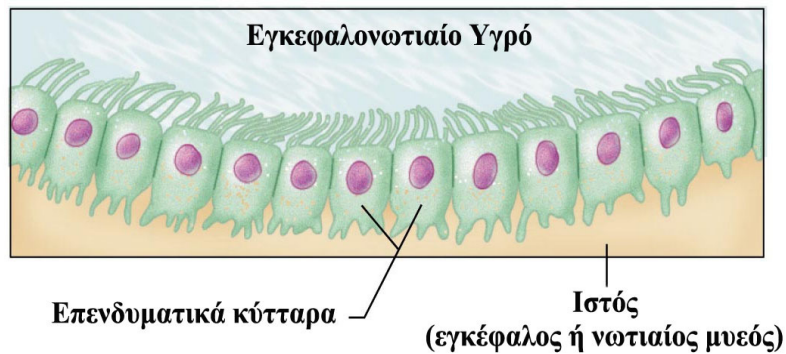
Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των ολιγοδενδροκυττάρων γίνεται με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις ειδικές, για τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, πρωτεΐνες MAG (Myelin Associated Glycoprotein) και MBP (Myelin Basic Protein) (153).

1.7.3 Επενδυματικά κύτταρα: Τα επενδυματικά κύτταρα του ΚΝΣ διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

α) Τα επενδυμοκύτταρα (εικόνα 1.11) είναι τα κύτταρα εκείνα που καλύπτουν τις εγκεφαλικές κοιλίες και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Είναι επιθηλιακά κύτταρα με κυβοειδές ή κυλινδρικό σχήμα και φέρουν κροσσούς οι οποίοι διευκολύνουν την διακίνηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) εντός των κοιλιών, ενώ η έλλειψη αποφρακτικών ζωνών επιτρέπει στις ουσίες του ΕΝΥ να διέρχονται στον υποκείμενο νευρικό ιστό.

β) Ένας ιδιαίτερος τύπος επενδυματικού κυττάρου εντοπίζεται αποκλειστικά στο έδαφος (κάτω μέρος) της τρίτης κοιλίας και ονομάζεται τανυκύτταρο. Τα κύτταρα αυτά φέρουν μία μακριά αποφυάδα που εκτείνεται στα αγγειακά τριχοειδή καθώς και σε νευρώνες που βρίσκονται μακριά από την κοιλία. Τα τανυκύτταρα δεν διαθέτουν κροσσούς και συνδέονται στενά μεταξύ τους. Πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά χημικών μορίων όπως είναι οι ορμόνες από το ΕΝΥ προς περιοχές κάτωθεν του επενδύματος.

γ) Μία τρίτη κατηγορία επενδυμοκυττάρων, είναι εκείνα που εντοπίζονται στο χοριοειδές πλέγμα και συμμετέχουν στην παραγωγή του ΕΝΥ. Η στενή σύνδεση μεταξύ αυτών των κυττάρων αποτρέπει την διαρροή ουσιών από την κυκλοφορία του αίματος προς το ΕΝΥ και τελικά προς τις κοιλίες του εγκεφάλου.



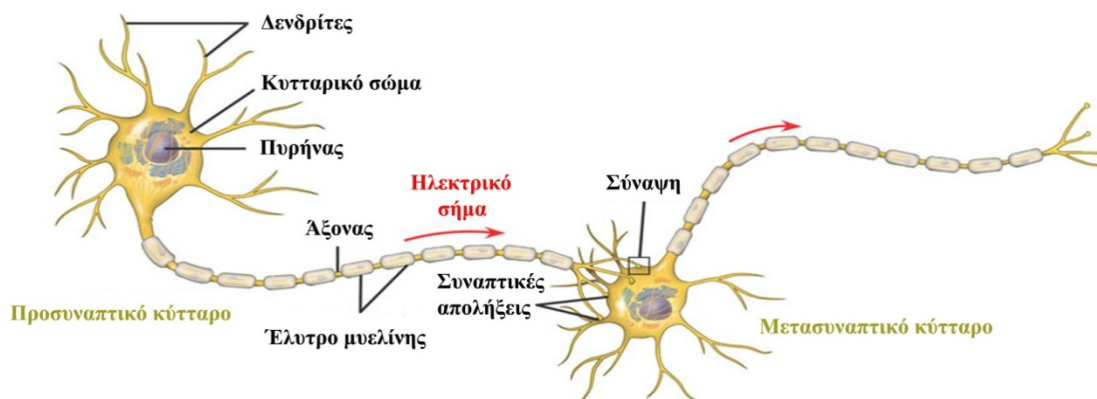
Εικόνα 1.11: Τα επενδυματικά κύτταρα περιβάλλουν τις κοιλότητες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Τα κύτταρα αυτά φέρουν κινητούς κροσσούς οι οποίοι ελέγχουν την διάχυση του ΕΝΥ προς τον υποκείμενο ιστό. Μέσω αυτής της διαδικασίας μεταφέρουν θρεπτικά συστατικά και νευροδιαβιβαστές στους νευρώνες ενώ παράλληλα φιλτράρουν και απομακρύνουν ουσίες βλαβερές προς αυτούς.

1.7.4 Μικρογλοία: Τα κύτταρα της μικρογλοίας αποτελούν το 5-20% των γλοιακών κυττάρων. Είναι εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα (μακροφάγα) του Κ.Ν.Σ και ο ρόλος τους συνίσταται στην απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και νεκρών νευρώνων από το νευρικό ιστό μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Όπως οι νευρώνες και τα κύτταρα της μακρογλοίας, έτσι και η μικρογλοία αντιπροσωπεύει έναν εξαιρετικά ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό. Η ονομασία τους προέρχεται από το γεγονός ότι έχουν μικρότερο μέγεθος από τα υπόλοιπα κύτταρα της γλοίας. Εμβρυολογικά, προέρχονται από το μεσέγχυμα και διηθούν το Κ.Ν.Σ στα τελικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Εμφανίζουν επίμηκες σχήμα και φέρουν πολλές και λεπτές δενδριτικές αποφυάδες. Τα κύτταρα της μικρογλοίας θεωρούνται δενδριτικά αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα με χαμηλό επίπεδο φαγοκυτταρικής δραστηριότητας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι λίγα σε αριθμό, όμως σε παθολογικές καταστάσεις ενεργοποιούνται και αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος (μικρογλοίωση). Η μικρογλοία ενεργοποιείται σε συνθήκες φλεγμονής του Κ.Ν.Σ η οποία μπορεί να προκαλείται από νευρο-εκφυλιστικές παθήσεις όπως είναι η νόσος του Alzheimer ή από λοιμώδεις παθήσεις όπως είναι η νόσος Creutzfeldt-Jakob (153).

1.7.5 Νευρώνες: Ενδεικτική της πολυπλοκότητας του ανθρώπινου εγκεφάλου είναι η εκτίμηση της ύπαρξης 100 δισεκατομμυρίων νευρώνων και ακόμα περισσότερων γλοιακών κυττάρων σε αυτόν. Οι νευρώνες χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια σε σχέση με το μέγεθος και το σχήμα τους. Επιπλέον, ταξινομούνται και ανάλογα με τους νευροδιαβιβαστές που απελευθερώνουν σε χολινεργικούς, γλουταμινεργικούς και γ-αμινοβουτυρικούς (GABA) νευρώνες. Οι νευρώνες αποτελούν τη δομική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος και είναι υπεύθυνοι για τη λήψη, την επεξεργασία και την διαβίβαση πληροφοριών και ερεθισμάτων (153).

Οι νευρώνες αποτελούνται από τρία διακριτά μέρη: το σώμα, τον άξονα και τους δενδρίτες (εικόνα 1.12). Το σώμα είναι το μεταβολικό κέντρο του κυττάρου και συνιστά το κεντρικό, σφαιρικό τμήμα του νευρώνα το οποίο περιλαμβάνει τον πυρήνα και άλλα κυτταρικά οργανίδια (μιτοχόνδρια, σύστημα Golgi, λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο). Ο νευράξονας αποτελεί μία μοναδική κυλινδρική αποφυάδα με σταθερή διάμετρο και μπορεί να εκταθεί σε πολύ μεγάλη απόσταση. Μέσα στον άξονα δεν συντίθενται πρωτεΐνες όμως αυτές μεταφέρονται κατά μήκος του από το σώμα, μέσω μίας διαδικασίας που καλείται αξονική μεταφορά. Ο άξονας έχει την ικανότητα μεταφοράς μηνυμάτων σε μεγάλη απόσταση από το κυτταρικό σώμα προς άλλους και συχνά πολλαπλούς στόχους,

μέσω των πολυάριθμων διακλαδώσεων που φέρει στο άκρο του. Οι διακλαδώσεις αυτές καταλήγουν σε εξειδικευμένες απολήξεις που ονομάζονται προσυναπτικές απολήξεις. Αυτές έρχονται σε επαφή με τις δεκτικές επιφάνειες ενός ή περισσοτέρων νευρικών κυττάρων οι οποίες ονομάζονται μετασυναπτικές απολήξεις. Η προσυναπτική απόληξη με τη μετασυναπτική απόληξη και το διάστημα που τις χωρίζει (συναπτική σχισμή) αποτελούν τη σύναψη. Η σύναψη είναι υπεύθυνη για την μετατροπή ενός ηλεκτρικού σήματος σε χημικό που ονομάζεται νευροδιαβιβαστής και απελευθερώνεται από την προσυναπτική μεμβράνη. Κατόπιν ο νευροδιαβιβαστής δεσμεύεται από την μετασυναπτική μεμβράνη όπου μετατρέπεται και πάλι σε ηλεκτρικό σήμα στο κύτταρο-δέκτη. Τέλος, οι λεπτές διακλαδιζόμενες αποφυάδες που προεκβάλλουν από το σώμα ονομάζονται δενδρίτες και ο ρόλος τους είναι να προσλαμβάνουν τα χημικά σήματα που φτάνουν μέσω των συνάψεων από τους άξονες άλλων νευρώνων και να τα μεταφέρουν στο σώμα του κυττάρου.



Εικόνα 1.12: Νευρώνας και σύναψη

Μεταξύ των πιο διαδεδομένων ανοσοϊστοχημικών δεικτών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των νευρωνικών κυττάρων είναι οι πρωτεΐνες των νευρωνικών μικροσωληνίσκων β III-τουμπουλίνη και MAP2 (Microtubule Associated Protein 2). Επιπλέον, καλά χαρακτηρισμένους δείκτες των νευρώνων αποτελούν και οι πρωτεΐνες των νευρονηματίων, NeuN (Neuronal Nuclear Antigen), και NSE (Neuron-Specific Enolase)

1.8 Η ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο ενήλικος εγκέφαλος των θηλαστικών περιλαμβάνει αυτό-ανανεούμενα πολυδύναμα νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cells, NSCs), τα οποία είναι υπεύθυνα για την διαδικασία της νευρογένεσης που λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες περιοχές του ενήλικα εγκεφάλου και ως εκ τούτου συνεισφέρουν στην πλαστικότητα του νευρικού ιστού. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, το αγγειακό δίκτυο, κύτταρα της γλοίας καθώς και νευρωνικά κύτταρα, συνθέτουν την φωλεά βλαστικών κυττάρων (niche) ή νευρογενετική ζώνη, στην οποία διαμένουν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα. Αυτό το μικροπεριβάλλον που περιβάλλει τα σωματικά βλαστικά κύτταρα αποτελεί την πηγή εξωγενών σημάτων που καθοδηγούν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα προς την κατεύθυνση είτε της αυτό-ανανέωσης, είτε της διαφοροποίησης των. Επιπρόσθετα, παράγοντες όπως η ενδοκυττάρια επιγενετική κατάσταση και η ρετρομεταθετική ενεργότητα των NSCs, επηρεάζουν την πορεία διαφοροποίησής τους προς γλοιοκύτταρα ή νευρώνες. Εξωγενείς και ενδογενείς

παράγοντες συνθέτουν ένα περίπλοκο σηματοδοτικό δίκτυο, το οποίο δεν είναι απόλυτα κατανοητό μέχρι σήμερα, και αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της νευρογένεσης.

Τα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs), φέρουν τις ιδιότητες της αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης σε νευρωνικά και γλοιακά κύτταρα (κυρίως αστρογλοία και ολιγοδενδρογλοία). Στο ανεπτυγμένο νευρικό σύστημα, τα NSCs, προερχόμενα πιθανώς από εμβρυονικά κύτταρα της νευρικής πλάκας, εντοπίζονται στον ιππόκαμπο και την πλευρική κοιλία του ενήλικου εγκέφαλου (155), (156). Τα NSCs δύνανται να διαφοροποιηθούν προς προγονικά νευρικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν σε πιο ειδικές περιοχές του εγκεφάλου όπου λαμβάνουν χώρα η πλήρης διαφοροποίησή τους προς ώριμους νευρώνες και η τελική ενσωμάτωσή τους στο τοπικό νευρικό δίκτυο (157) (158). Η επιλογή μεταξύ πολυδυναμίας και εξειδίκευσης που επιτυγχάνεται μέσω κυτταρικής διαφοροποίησης, υπαγορεύεται από το μεταγραφικό πρόγραμμα του νευρικού βλαστικού κυττάρου, σε απόκριση εξωγενών και ενδογενών σημάτων. Η νευρογενετική ζώνη καθώς και η επιγενετική κατάσταση των NSCs, αποτελούν βασικούς ρυθμιστές μεταγραφικών τροποποιήσεων που καθορίζουν την πορεία και τον βαθμό διαφοροποίησής των. Κύτταρα που δεσμεύονται προς την νευρωνική γενεαλογία, μεταβάλλουν τους επιγενετικούς τους δείκτες, μέσω τροποποίησης της δομής της χρωματίνης τους, επιτρέποντας με αυτή τη διαδικασία την έκφραση νευροειδικών γονιδίων (159).

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες μελέτες οι οποίες αποδεικνύουν ότι ο ειδικός μεταγραφικός μηχανισμός που ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην νευρωνική ωρίμανση, δύναται να ενεργοποιήσει και την έκφραση ενδογενών ρετροτρανσποζονίων του γενώματος, τα οποία μέχρι πρότινος θεωρούνταν “άχρηστο” DNA (160). Το αποτέλεσμα της μετάθεσης αυτών των γενετικών στοιχείων, που επιτυγχάνεται μέσω μεταγραφής, αντίστροφης μεταγραφής και ενσωμάτωσης του προκύπτοντος cDNA σε μία νέα θέση εντός του γενώματος (17), (161), μπορεί να είναι η ένθεσή τους πλησίον γονιδίων και η μεταβολή της έκφρασης αυτών, δίνοντας γένεση σε κύτταρα τα οποία φέρουν ένα μοναδικό γενωμικό και μεταγραφικό αποτύπωμα (160), (162).

1.8.1 Η νευρογενετική ζώνη (Neurogenic Niche)

Η νευρογενετική ζώνη στην οποία εντοπίζονται τα ενήλικα NSCs αποτελεί ένα μικροπεριβάλλον το οποίο διασφαλίζει την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και πολυδυναμίας των εν λόγω κυττάρων. Αυτό το περίπλοκο και καλά συντονισμένο σηματοδοτικό δίκτυο ελέγχει το μεταγραφικό προφίλ των NSCs έτσι ώστε είτε να διατηρεί τα κύτταρα αυτά σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση, είτε να πυροδοτεί την διαφοροποίησή τους σε δεδομένο χρόνο που συντελείται η νευρογένεση.

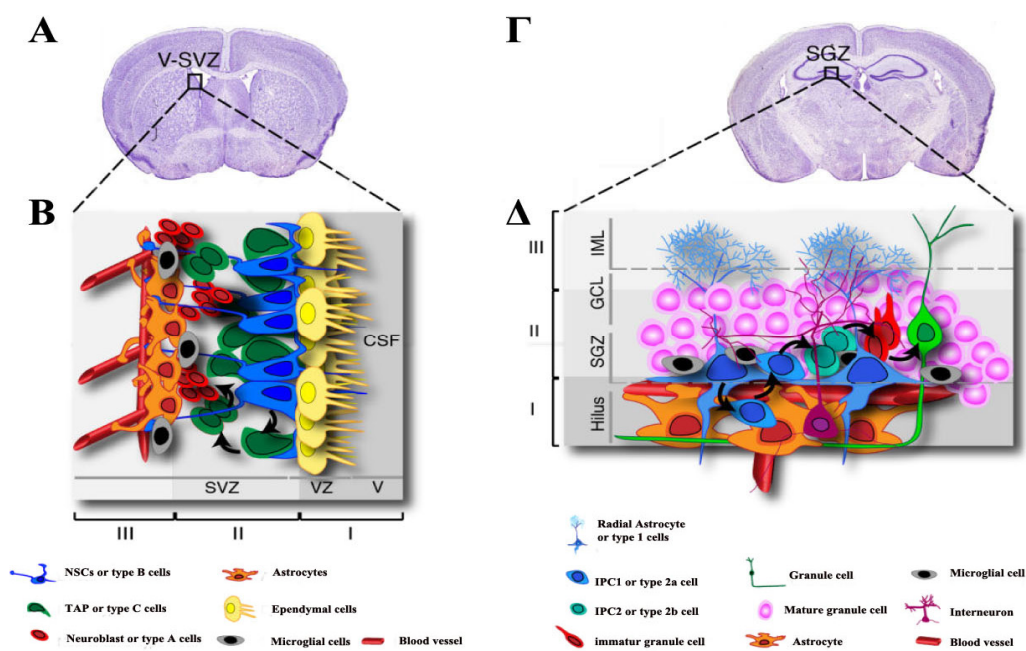
Οι δύο νευρογενετικές περιοχές εντοπίζονται στην υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ) των πλάγιων κοιλιών (lateral ventricles) του προσθιεγκεφάλου, και στην υποκοκκιώδη ζώνη (subgranular zone, SGZ) της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus) του ιππόκαμπου στον ενήλικα εγκέφαλο των θηλαστικών (163). Σε αυτές τις ζώνες νευρογένεσης, τα NSCs βρίσκονται σε στενή επαφή με ενδοθηλιακά κύτταρα, αστροκύτταρα, επενδυματικά κύτταρα, νευρώνες και προγονικά κύτταρα (163). Όλοι οι προαναφερθέντες κυτταρικοί τυποί διαδραματίζουν έναν θεμελιώδη ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης της νευρογενετικής ζώνης (βλαστική φωλεά). Εξαιτίας του γεγονότος ότι η ενήλικη νευρογένεση έχει παρατηρηθεί συγκεκριμένα σε αυτές τις περιοχές του εγκεφάλου, οι περισσότερες έρευνες που γίνονται στο πεδίο των NSCs, έχουν επικεντρωθεί στην ιστολογική και κυτταρολογική μελέτη αυτών των βλαστικών ζωνών.

Τα NSCs της υποκοιλιακής ζώνης είναι στην ουσία ειδικά αστροκύτταρα, τα οποία φέρουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, εμφανίζονται θετικά στην έκφραση της πρωτεΐνης

GFAP και χαρακτηρίζονται από αργούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού. Έχει διαπιστωθεί ότι αυτά τα <<εφησυχάζοντα>>, θετικά σε GFAP, NSCs (κύτταρα **τύπου Β**) μπορούν να δώσουν γένεση σε έναν κυτταρικό πληθυσμό που απαρτίζεται από παροδικά διαιρούμενα προγονικά κύτταρα (Transient Amplifying Progenitor, TAP ή κύτταρα **τύπου C**) τα οποία χάνουν την έκφραση της πρωτεΐνης GFAP αλλά είναι θετικά στην έκφραση των πρωτεϊνών Dlx2 (homeobox proteins) και EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Τα κύτταρα TAP μπορούν με τη σειρά τους να δημιουργήσουν και έναν άλλον κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος απαρτίζεται από νευροβλάστες (κύτταρα **τύπου Α**) οι οποίοι μεταναστεύουν στον οσφρητικό βολβό, όπου και διαφοροποιούνται σε τουλάχιστον έξι διαφορετικούς υπότυπους διάμεσων νευρώνων (158), (164), (165). Τα εφησυχάζοντα NSCs ή αλλιώς κύτταρα τύπου Β εφάπτονται σε μία μονοστοιβάδα επενδυματικών κυττάρων (κύτταρα **τύπου Ε**) που επενδύει το εσωτερικό της πλάγιας κοιλίας του εγκεφάλου. Επιπλέον τα Β τύπου κύτταρα διατηρούν την κορυφαιο-βασική πολικότητα των εμβρυονικών προκατόχων τους (κύτταρα της ακτινωτής γλοίας, radial glia), εκτείνοντας τις κυτταρικές τους προεκβολές κατά μήκος και των τριών περιοχών της κοιλίας (υποκοιλιακή ζώνη ή SVZ, κοιλιακό τοίχωμα ή VZ, κοιλιακή περιοχή ή V), προσεγγίζοντας με αυτό τον τρόπο το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Cerebrospinal fluid, CSF) που κυκλοφορεί εντός του κοιλιακού συστήματος, (166), (167). Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά συνίστανται από μία κορυφαία απόληξη που διαπερνά το κοιλιακό τοίχωμα φτάνοντας μέχρι το εσωτερικό της πλευρικής κοιλίας και μία μακριά βασική απόληξη στον αντίθετο πόλο που εφάπτεται με τα γειτονικά αγγεία. Η κορυφαία αποφυάδα διαπερνά την στοιβάδα των επενδυματικών κυττάρων τα οποία φέρουν κινητούς κροσσούς οι οποίοι διαμορφώνουν στην υποκοιλιακή ζώνη μία κατάλληλη διαβάθμιση μορίων που προσλαμβάνουν από το CSF (168), (167), (169). Με αυτό τον τρόπο τα NSCs εκτίθενται σε διάφορους παράγοντες που κυκλοφορούν στα αιμοφόρα αγγεία και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, οι οποίοι παρέχουν θρεπτικά συστατικά και σηματοδοτικά μόρια που εκκινούν την διαδικασία της διαφοροποίησης (170).

Η δεύτερη νευρογενετική ζώνη του ενήλικου εγκέφαλου η οποία και είναι υπεύθυνη για τις λειτουργίες της μάθησης και της μνήμης, είναι η υποκοκκιδώδης στοιβάδα του οδοντωτού γύρου του ιππόκαμπου (171), (172), (173). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται στο μεσοδιάστημα μεταξύ της κοκκιδώδους στοιβάδας (Granular Cell Layer, GCL) και της πολυμορφικής κυτταρικής στοιβάδας (hilus) που περιβάλλει την οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου. Στην SGZ απαντώνται NSCs τα οποία ονομάζονται ακτινωτά αστροκύτταρα (Radial Astrocytes, RA) ή αλλιώς **προγονικά κύτταρα τύπου 1 (type-1 progenitors)** (174). Τα εν λόγω κύτταρα πολλαπλασιάζονται σχετικά αργά και είναι GFAP-θετικά. Η διαφορά τους ως προς τα κύτταρα Β τύπου που απαντώνται στην SVZ, έγκειται στο ότι τα RAs εντοπίζονται βαθύτερα στο παρέγχυμα του εγκεφάλου χωρίς να προσεγγίζουν το CSF (168). Ωστόσο αυτοί οι δύο κυτταρικοί τύποι μοιράζονται και κάποιες κοινά χαρακτηριστικά όπως είναι η έκφραση αστρογλοιακών δεικτών (π.χ GFAP), η δομική τους ομοιότητα με τα αστροκύτταρα του εγκεφάλου (168) και το γεγονός ότι αμφότεροι φέρουν μακριές αποφυάδες οι οποίες εκτείνονται μακριά από το κυτταρικό σώμα και εισχωρούν σε διαφορετικά διαμερίσματα της εκάστοτε νευρογενετικής περιοχής (175). Πιο συγκεκριμένα, τα RAs εμφανίζουν και αυτά πολικότητα σχηματίζοντας δύο διακριτές περιοχές, μία ακραία και μία βασική, που εκτείνονται από την πολυμορφική κυτταρική στοιβάδα (εγγύς περιοχή), μέχρι την εσωτερική μοριώδη στοιβάδα (Inner Molecular Layer, IML, ακραία περιοχή) (168). Το κορυφαίο τμήμα των RAs έρχεται σε επαφή με γειτονικά RAs, προγονικά κύτταρα, αστροκύτταρα και κυρίως αιμοφόρα αγγεία μέσω των οποίων προσλαμβάνουν σημαντικά μόρια όπως είναι ο VEGF, IGF και BDNF που είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και

διαφοροποίησης των NSCs. Τα RAs δίνουν γένεση σε μη ακτινωτά προγονικά κύτταρα τα οποία ονομάζονται **τύπου 2 (type-2 progenitors)**, τα οποία πολλαπλασιάζονται ταχύτερα και είναι GFAP-αρνητικά. Τα προγονικά κύτταρα τύπου 2 διαφοροποιούνται με τη σειρά τους σε ανώριμα κοκκιώδη κύτταρα (**Immature Granule Cells, IGC**) ή αλλιώς νευροβλάστες, οι οποίοι κατά την ωρίμανσή τους μεταναστεύουν από την SGZ στην GCL. Εκεί τελικώς διαφοροποιούνται σε ώριμα κοκκιώδη κύτταρα τα οποία εκτείνουν τον νευράξονά τους στην πολύμορφη κυτταρική στοιβάδα της οδοντωτής έλικας και τους διακλαδιζόμενους δενδρίτες στην μοριώδη στοιβάδα. Κάποιοι από αυτούς τους νεογέννητους νευρώνες θα επιβιώσουν και θα δώσουν μόνιμους διεγερτικούς κοκκιώδεις νευρώνες οι οποίοι θα ενισχύσουν το νευρικό δίκτυο του ιππόκαμπου (176), (177) (εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση των SVZ και SGZ του ενήλικου εγκεφάλου. [Από το βιβλίο “Neural Stem Cells - New Perspectives”, 2013] (A) και (Γ) στεφανιαίες τομές ενήλικου εγκεφάλου ποντικού όπου απεικονίζονται οι περιοχές των SVZ και SGZ του ιππόκαμπου. (B) και (Δ) απεικόνιση της κυτταρικής σύστασης των SVZ (B) και SGZ της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου (D) στον ενήλικα εγκεφαλο των θηλαστικών. Στην νευρογενετική περιοχή της υποκοιλιακής ζώνης των πλευρικών κοιλιών (SVZ) τα NSCs ή αλλιώς B1 τύπου κύτταρα εκτείνονται από το εσωτερικό της κοιλίας (V, περιοχή I, σκούρο γκρι) μέχρι την απομακρυσμένη περιοχή (περιοχή III, ανοιχτό γκρι). Στην κοιλιακή ζώνη τα B1 κύτταρα έρχονται σε επαφή με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF), μέσω ενός πρωτογενούς κροσσού (**primary cilium**) που εκτείνουν στο κέντρο της “ροζέτας” κροσσοτών επενδυματικών κυττάρων (κίτρινο χρώμα). Με αυτό τον τρόπο προσλαμβάνουν ποικίλα σηματοδοτικά μόρια που κυκλοφορούν στο CSF. Στην απομακρυσμένη περιοχή τα NSCs έρχονται σε επαφή με αιμοφόρα αγγεία (κόκκινο χρώμα) μέσω των εξειδικευμένων κυτταρικών απολήξεων που φέρουν. Στην ενδιάμεση περιοχή ή αλλιώς υποκοιλιακή ζώνη (SVZ, περιοχή II), τα B1 κύτταρα δίνουν γένεση σε ενδιάμεσα προγονικά κύτταρα ή αλλιώς κύτταρα τύπου C (πράσινο), τα οποία με την σειρά τους διαφοροποιούνται σε νευροβλάστες ή αλλιώς τύπου A κύτταρα (κόκκινο). Επιπλέον, σε αυτή την περιοχή τα NSCs επικοινωνούν με αστροκύτταρα (πορτοκαλί) και κύτταρα της μικρογλοίας (γκρι). (Δ) Στην νευρογενετική περιοχή της SGZ, τα NSCs ονομάζονται ακτινωτά αστροκύτταρα (RA,) ή αλλιώς τύπου 1 κύτταρα (μπλε). Τα κύτταρα αυτά εκτείνονται από την πολύμορφη κυτταρική στοιβάδα (hilus, περιοχή I, σκούρο γκρι) μέχρι την εσωτερική μοριώδη στοιβάδα (IML, περιοχή III, ανοιχτό γκρι). Τα RAs ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα που δέχονται από το μικροπεριβάλλον της περιοχής I μέσω ενός πρωτογενούς κροσσού. Επιπλέον, έρχονται σε επαφή και με κύτταρα όπως γειτονικά RAs, ενδιάμεσα προγονικά κύτταρα (IPCs, μπλε), αστροκύτταρα (πορτοκαλί), και αιμοφόρα αγγεία (κόκκινο). Στην πιο απομακρυσμένη περιοχή (III), τα RAs εκτίθενται σε

σήματα που παράγονται από γειτονικά γλοιακά και νευρωνικά κύτταρα. Τα RAs δίνουν γένεση σε ενδιάμεσα προγονικά κύτταρα (IPCs), τα οποία με την σειρά τους διαφοροποιούνται σε ανώριμα κοκκιώδη κύτταρα (IGC, κόκκινο). Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης τα IPCs μεταναστεύουν από την πολύμορφη κυτταρική στοιβάδα (περιοχή I), στην ενδιάμεση περιοχή (περιοχή II), η οποία συνίσταται από την υποκοκκιώδη ζώνη (SGZ) και την κοκκιώδη στοιβάδα (GCL). Στην περιοχή αυτή προσλαμβάνουν σήματα από άλλα προγονικά κύτταρα, γειτονικά NSCs, διάμεσους νευρώνες (μωβ) και την μικρογλοία (γκρι). Τελικά τα IGCs διαφοροποιούνται σε ώριμα κοκκιώδη κύτταρα (GC, πράσινο), τα οποία εκτείνουν τον νευράξονά τους στην πολύμορφη κυτταρική στοιβάδα και τους διακλαδιζόμενους δενδρίτες στην μοριώδη στοιβάδα. Ελάχιστοι από αυτούς τους νεοσχηματισθέντες νευρώνες θα επιβιώσουν και θα διαμορφώσουν μόνιμους διεγερτικούς κοκκιώδεις νευρώνες.

Η σημασία του ρόλου των αστροκυττάρων στην νευρογενετική βλαστική ζώνη αποκαλύφθηκε από πειράματα συγκαλλιέργειας ενήλικων NSCs και αστροκυττάρων που είχαν απομονωθεί από διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Αστροκύτταρα απομονωθέντα από νευρογενετικές περιοχές του εγκεφάλου ήταν σε θέση να ενεργοποιήσουν την διαφοροποίηση των NSCs σε νευρώνες. Αντίθετα, αστροκύτταρα απομονωθέντα από μη νευρογενετικές περιοχές του εγκεφάλου απέτυχαν στην επαγωγή της νευρωνικής διαφοροποίησης των NSCs και αντ' αυτού επήγαγαν την διαφοροποίησή τους προς άλλους κυτταρικούς τύπος σε καλλιέργεια (178), (179), (180). Τα αστροκύτταρα που είναι σε θέση να επάγουν νευρωνική διαφοροποίηση εκκρίνουν τον νευρογενετικό παράγοντα Wnt, ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην εν λόγω διαδικασία. Ο Wnt είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο το οποίο υπερεκφράζεται στον ενήλικα ιππόκαμπο και προκαλεί νευρωνική διαφοροποίηση (181). Επιπρόσθετες αποδείξεις για την σπουδαιότητα των αστροκυττάρων στην νευρωνική διαφοροποίηση αποκάλυψαν πειράματα κατά τα οποία η αναστολή της ικανότητάς των να εκκρίνουν νευρογενετικούς παράγοντες, οδήγησε σε σημαντική μείωση του δυναμικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των NSCs (182). Μία μεγάλης κλίμακας πρωτεομική ανάλυση του θρεπτικού μέσου στο οποίο καλλιιεργήθηκαν αστροκύτταρα, ικανά να εκκρίνουν νευρογενετικούς παράγοντες, συγκριτικά με αντίστοιχες καλλιέργειες αστροκυττάρων στα οποία είχε ανασταλεί αυτή η ιδιότητα, αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης 60 πρωτεϊνών, εκ των οποίων οι 7 εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των NSCs (183).

Κρίσιμης σημασίας συστατικό της νευρογενετικής ζώνης αποτελεί και το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων που περιβάλλει την υποκοιλιακή και υποκοκκιώδη ζώνη. Η κυτταρική πρόσφυση μεταξύ των NSCs και των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία διαμεσολαβείται από υποδοχείς λαμινίνης των NSCs, συνεισφέρει στον πολλαπλασιασμό και την διατήρησή τους *in vivo* (166). Η επαφή μεταξύ αυτών των δύο κυτταρικών τύπων είναι διαπερατή, επιτρέποντας σε διαλυτά μόρια του αίματος να προσεγγίζουν τα NSCs (166), (183). Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν σημαντικούς παράγοντες που συντελούν στην διαφοροποίηση και διατήρηση των NSCs. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), ο οποίος επάγει τόσο την αγγειογένεση, όσο και την νευρογένεση, και ο PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor, PEDF), ο οποίος συμβάλει και αυτός με την σειρά του στην αυτό-ανανέωση των NSCs (184), (185).

Τα επενδυματικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν επίσης ένα θεμελιώδες κυτταρικό συστατικό της νευρογενετικής περιοχής όπου εδράζονται τα NSCs. Τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν τον PEDF ο οποίος συνεισφέρει στην περεταίρω ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης των NSCs, καθώς και το πολυπεπτίδιο Noggin που μπορεί να ενισχύσει την νευρογένεση αναστέλλοντας την γλοιογένεση μέσω ενός αναδραστικού μηχανισμού (feedback mechanism) (185), (186). Επιπρόσθετα, τα κύτταρα αυτά φέρουν παλλόμενους κροσσούς (cilia) οι οποίοι διαμορφώνουν μία κατάλληλη διαβάθμιση από παράγοντες που

εμπλέκονται στην μετανάστευση των νευροβλαστών (169). Τέλος, οι νευρώνες των SVZ και SGZ συμμετέχουν και αυτοί στην ρύθμιση των συγκεκριμένων περιοχών. Ο τρόπος με τον οποίο συνεισφέρουν στην ρύθμιση αυτή, είναι μέσω έκκρισης κατάλληλων νευροδιαβιβαστών όπως γ-αμινοβουτυρικό οξύ, σεροτονίνη, ντοπαμίνη και γλουταμινικό που επάγουν την νευρωνική διαφοροποίηση.

1.8.2 Η επιγενετική των NSCs

Η εκκίνηση της διαδικασίας διαφοροποίησης των NSCs πυροδοτείται από εξωγενείς παράγοντες που παρέχει η νευρογενετική περιοχή στην οποία εδράζονται τα εν λόγω κύτταρα, αλλά και από ενδογενείς παράγοντες οι οποίοι συνίστανται σε αλληλουχίες DNA και επιγενετικές τροποποιήσεις αυτών (187), (162). Ως επιγενετική ορίζεται η οποιαδήποτε δομική αλλαγή που συντελείται σε μια γενωμική περιοχή και έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης (188). Τέτοιες τροποποιήσεις μπορεί να είναι κληρονομικές μέσω της διαδικασίας της μείωσης ή μίτωσης, χωρίς να επιφέρουν όμως μεταβολή στην ακολουθία του DNA. Οι τέσσερις κύριοι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης είναι η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης (μέσω ομοιοπολικών τροποποιήσεων των ιστονικών ουρών), μη-κωδικά μόρια RNA (nc RNA) και μηχανισμός RNA παρέμβασης (RNAi) (189), (190), (191), (192), (193), (194).

Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησής τους, τα NSCs μεταβάλουν το εσωτερικό μεταγραφικό τους πρόγραμμα ώστε να μεταβούν από την κατάσταση αυτό-ανανέωσης στη κατάσταση δέσμευσης προς μία συγκεκριμένη κυτταρική γενεαλογία. Η μετάπτωση αυτή καθοδηγείται από μία καθολική αλλαγή του μεταγραφικού προφίλ των NSCs (162). Το γένωμα των προγονικών κυττάρων φέρει σημαντικά αναπτυξιακά γονίδια τα οποία στις ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών τους έχουν κατάλληλους κατασταλτικούς ή ενεργοποιητικούς μεταγραφικούς δείκτες (195), (196). Όταν λαμβάνει χώρα η διαδικασία της διαφοροποίησής τους, ενεργοποιούνται μεταγραφικοί δείκτες οι οποίοι πλειορυθμίζουν συγκεκριμένα αναπτυξιακά γονίδια, ενώ χάνονται κατασταλτικοί μεταγραφικοί παράγοντες που εμποδίζουν την διαφοροποίηση (197), (198), (199), (200).

Οι επιγενετικοί δείκτες που καθορίζουν την μεταγραφική ενεργότητα, ελέγχονται κυρίως από μηχανισμούς τροποποίησης των ιστονών και μεθυλίωσης του DNA. Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται σε δινοκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης (CpG), και επιφέρει την μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων-στόχων (187). Η πρωτεΐνη methyl CpG binding protein 2 (MeCP2), με την περιοχή πρόσδεσης του μεθυλίου (methyl binding domain, MBD), δεσμεύεται στη μεθυλιωμένη δινοκλεοτιδική αλληλουχία CpG του DNA, αλληλεπιδρά με ένζυμα από-ακετυλίωσης των ιστονών και προκαλεί επιγενετικές αλλαγές, με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης γονιδίων (201). Η φωσφορυλίωση του MeCP2 ελαττώνει την μεθυλίωση του γονιδίου BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) επάγοντας την παραγωγή του νευροτροφικού παράγοντα BDNF, που σχετίζεται με την νευρωνική διαφοροποίηση.

Ένα καλά μελετημένο σύστημα καταστολής της νευρωνικής διαφοροποίησης που λαμβάνει χώρα σε αδιαφοροποίητα προγονικά κύτταρα καθώς και σε μη νευρωνικά κύτταρα, είναι το σύμπλεγμα REST (RE-1 Silencing transcription Factor) / RE-1. Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας REST προσδένεται στις ακολουθίες RE-1 των υποκινητών διαφόρων νευρικών γονιδίων. Το σύμπλεγμα που διαμορφώνεται από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - DNA ακολουθίας οδηγεί στην μεταγραφική αποσιώπηση των εν λόγω γονιδίων στα NSCs. Συνεπώς οι μεταγραφικοί παράγοντες, συνεπικουρούμενοι από την δομή της χρωματίνης και την μεθυλιωτική κατάσταση των

γονιδίων, υπαγορεύουν με εξαιρετική ακρίβεια την εξειδίκευση και τον χρόνο που θα λάβει χώρα η μεταγραφή των εν λόγω γονιδίων.

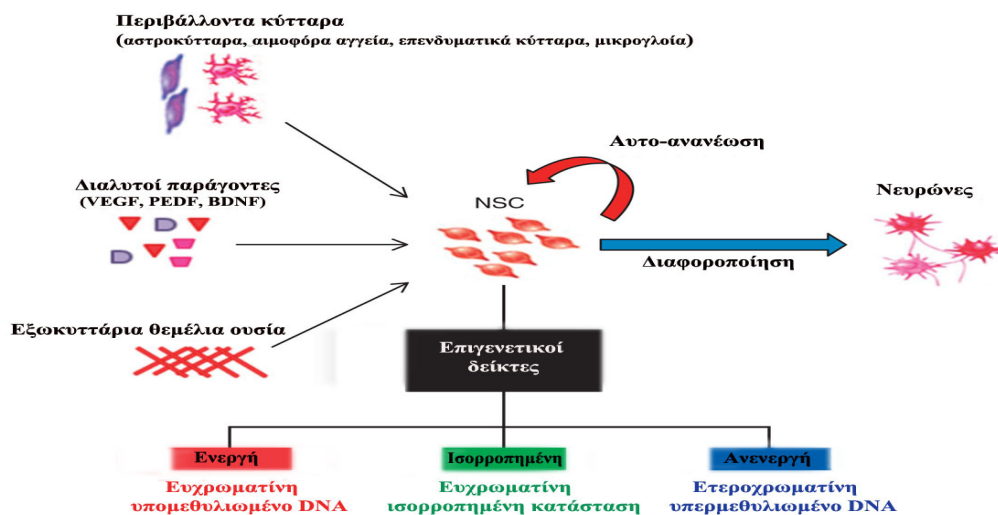
Τα μη κωδικά RNA (nc RNAs) έχουν πρόσφατα προταθεί ως ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας επιγενετικού ελέγχου. Τα micro-RNA (mi-RNAs) είναι μικρές ακολουθίες (18 έως 25 νουκλεοτίδια) μη-κωδικού RNA με σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Ο μεταγραφικός παράγοντας REST που αναφέρθηκε προηγουμένως, φαίνεται πως εκτός από την έκφραση κωδικουόντων γονιδίων, ελέγχει και την έκφραση διαφόρων mi-RNAs, μεταξύ των οποίων τα τα mir-9, mir-124a και mir-132. Το mir-9 σχηματίζει με το σύμπλεγμα REST μία θηλειά αναδραστικής (ή ανατροφοδοτικής) αναστολής (negative feedback loop) η οποία ρυθμίζει την έκφραση του mir-9 και αμοιβαία ρυθμίζεται από το mir-9. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλεγμα REST καταστέλλει μεταγραφικά το mir-9. Κατά τη διάρκεια όμως της νευρωνικής διαφοροποίησης, το mir-9 στοχοποιεί υπομονάδες του συμπλέγματος REST απελευθερώνοντας τελικά την έκφραση τόσο του ίδιου όσο και των νευρικών γονιδίων που προηγουμένως υπόκεινταν σε αρνητικό (ανασταλτικό) έλεγχο από το σύμπλεγμα REST. Επιπλέον, σε αυτή την δυναμική ισορροπία έρχεται να προστεθεί και το mir-132, το οποίο με την σειρά του στοχοποιεί την πρωτεΐνη MeCP2 η οποία αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα REST προοθώντας την γονιδιακή αποσιώπηση. Η ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων των mi-RNAs μπορεί να παρέμβει και να μεταβάλλει το τρέχον μεταγραφικό πρόγραμμα των NSCs. Η σημασία του ρόλου των mi-RNAs στη νευρογένεση καταδεικνύεται εντονότερα από το mir-124a το οποίο εκφράζεται ειδικά στον εγκέφαλο και αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% όλων των mi-RNAs που ανιχνεύονται σε αυτόν (202). Το mir-124a φτάνει στα υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του κατά την διάρκεια της νευρογένεσης και διατηρείται και στους ώριμους νευρώνες (191), (194). Συνεπώς η υπερέκφρασή του σε ανθρώπινα κύτταρα μη νευρικής προέλευσής μεταβάλλει την γονιδιακή τους έκφραση προς μία νευρο-ειδική κατεύθυνση (203).

Μόλις ενεργοποιηθεί η διαδικασία διαφοροποίησης των NSCs, το πρόγραμμα δέσμευσής τους σε μία συγκεκριμένη κυτταρική γενεαλογία μεταβάλλει τους επιγενετικούς τους δείκτες, συμπεριλαμβανομένης σε αυτούς και την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Η προσβασιμότητα της χρωματίνης σε μεταγραφικούς παράγοντες τους επιτρέπει να αλληλεπιδράσουν με ακολουθίες-στόχους (204). Για παράδειγμα, ο μεταγραφικός παράγοντας Ascl1 (γνωστός και ως Mash 1) παραμένει ανενεργός στα NSCs και η έκφρασή του υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ο μεταγραφικός καταστολέας HES1 (Hairly and Enhancer of Split-1), ο οποίος ενεργοποιείται στο μονοπάτι Notch, διαμορφώνει ένα σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη TLE1 (Transducin – Like Enhancer of Split-1) το οποίο επιστρατεύει αποακετυλάσες των ιστονών (HDAC), οδηγώντας τελικά στην καταστολή του Ascl1 (205). Ο παράγοντας Ascl1 εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυτταρικού πυρήνα και αντιγράφεται αργά κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου των NSCs. Η αργή αντιγραφή του οφείλεται στην εξαιρετικά συμπυκνωμένη δομή της χρωματίνης. (206), (207). Ωστόσο, κατά την διάρκεια της νευρωνικής διαφοροποίησης ο Ascl1 μετατίθεται στο εσωτερικό του πυρήνα. Η πρωτεΐνη PARP 1 (Poly ADP-ribose Polymerase) αποτελεί συστατικό στοιχείο του συμπλέγματος καταστολής HES1/TLE1, και λειτουργεί ως αισθητήρας ανίχνευσης του PDGF στην νευρογενετική ζώνη. Η δράση της PARP 1 έγκειται στην απομάκρυνση του TLE1 από το σύμπλεγμα καταστολής που έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της HES1. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση ακετυλασών των ιστονών, την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τελικά την μεταγραφική ενεργοποίηση του Ascl1.

In vivo, το γονίδιο Ascl1 φαίνεται πως συνεισφέρει με διαφορετικούς τρόπους στην διαφοροποίηση των NSCs, ανάλογα με την νευρογενετική περιοχή που εντοπίζεται. Στην

SVZ εκφράζεται έντονα στα προγονικά κύτταρα που είναι δεσμευμένα στην νευρωνική γενεαλογία. Αντίθετα στην SGZ ο *Ascl1* εκφράζεται πολύ ισχυρά σε προγονικά κύτταρα που πρόκειται να διαφοροποιηθούν σε ολιγοδενδροκύτταρα (208). Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το γεγονός ότι σε *in vitro* πειράματα δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο, καθώς προγονικά κύτταρα απομονωθέντα από την SGZ διαφοροποιούνται σε νευρώνες ακόμα και όταν στην καλλιέργεια υπερεκφράζεται ο *Ascl1*. Αυτή η παρατήρηση ισχυροποιεί την άποψη ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρογενετικής ζώνης και επιγενώματος είναι αυτές που καθορίζουν την πορεία διαφοροποίησης που ακολουθούν τα NSCs.

Η διαδικασία της διαφοροποίησης ενός προγονικού κυττάρου προς την νευρωνική γενεαλογία προκαλεί μεγάλης κλίμακας αλλαγές στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης, με αποτέλεσμα οι νευρώνες να αποκτούν μία πιο συμπαγή ετεροχρωματίνη, που συνεπάγεται την αποσιώπηση γονιδίων που εκφράζονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (159), (209). Επιπλέον, η νευρογενετική ζώνη επάγει έναν καταρράκτη μεταγωγής σημάτων που προσλαμβάνονται μέσω των κυτταρικών υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης, και καθορίζουν με την σειρά τους την δράση των μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα (210). Η τελική απόφαση που αφορά στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και την καταστολή άλλων, βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων και επιγενώματος του κυττάρου σε μία δεδομένη χρονική στιγμή (εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14: Τροποποιημένη από (211) Σηματοδοτικό δίκτυο ρύθμισης των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ εξωγενών και ενδογενών σημάτων που ρυθμίζουν τις διαδικασίες της αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης των NSCs

1.8.3 Ρετρομετάθεση και νευρογένεση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα L1s αποτελούν περίπου το 20% του DNA των θηλαστικών και ένα πλήρους μήκους L1 στοιχείο προσεγγίζει τις 6 κιλοβάσεις (7, 212). Τα μεταθετά αυτά στοιχεία μελετήθηκαν αρχικά σε κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς αλλά πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξή τους σε νευρικά προγονικά κύτταρα ποντικού αλλά και ανθρώπου (160), (213). Οι αρχικές αυτές παρατηρήσεις γέννησαν το ερώτημα μιας ενδεχόμενης συνεισφοράς της ρετρομετάθεσης στο νευρικό σύστημα. Η γενική αρχή που ισχύει για την πλειοψηφία των L1 στοιχείων είναι ότι παραμένουν μεταγραφικά ανενεργά εξαιτίας θραυσμάτων που φέρουν στο 5' άκρο τους, επιγενετικής αποσιώπησής τους μέσω μηχανισμών όπως η μεθυλίωση και μεταλλάξεων που έχουν

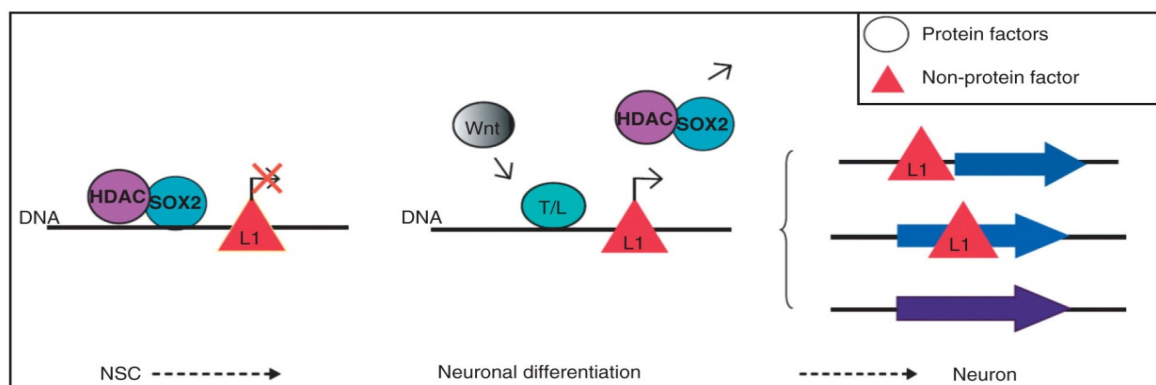
συσσωρεύσει στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσής τους (9), (7). Ωστόσο, ανάμεσα στα πλήρους μήκους αντίγραφα των L1, περίπου τα 150 θεωρούνται ενεργά στον άνθρωπο (7).

Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι ο εγκέφαλος των θηλαστικών συνιστά ένα σωματικό μωσαϊκό καθώς αποτελείται από τρισεκατομμύρια νευρικά κύτταρα και νευρικές συνάψεις τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη γενετική ετερογένεια (214). Συγκεκριμένα ο ανθρώπινος εγκέφαλος συνίσταται από 80 – 100 δισεκατομμύρια νευρώνες. Ο συνολικός αριθμός συνάψεων στον ανθρώπινο νεοφλοιό εκτιμάται πως είναι $0,15 \times 10^{15}$, ενώ ένας τυπικός νευροφλοιϊκός νευρώνας φέρει κατά μέσο όρο 7.000 συνάψεις. Συνεπώς το ερώτημα που εγείρεται είναι ο τρόπος με τον οποίο καθίσταται εφικτή αυτή η τεράστια ετερογένεια και πολυπλοκότητα όταν είναι γνωστό πως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι μόλις 30.000. Η γενετική ετερογένεια των νευρώνων οφείλεται σε χρωμοσωμικές ανευploυδίες (προσθήκη ή έλλειψη ολόκληρου χρωμοσώματος) (215), (216), γενωμικές παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (genomic copy number variations CNVs, εκτεταμένες περιοχές του γονιδιώματος που εμφανίζονται σε περισσότερα ή λιγότερα αντίγραφα από το κανονικό) (217), και σε ενεργά μεταθετά στοιχεία (218), (160). Τα τελευταία χρόνια έχει ανοίξει ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο συζήτησης στον τομέα της νευρολογίας που επιχειρεί να συσχετίσει την ρετρομετάθεση των L1 στοιχείων με αυτή την διευρυμένη και μοναδική γενετική ετερογένεια που παρουσιάζει ο νευρικός ιστός του εγκεφάλου των θηλαστικών. Επιπλέον, προτείνεται ότι γεγονότα ρετρομετάθεσης πραγματώνονται *de novo* σε προγονικά νευρικά κύτταρα και δύνανται να επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση και τελικά την νευρική λειτουργία. Ο μηχανισμός της ρετρομετάθεσης θα μπορούσε να ερμηνεύσει και το μεγάλο εύρος διαφοροποίησης που παρατηρείται στην συμπεριφορά ισογονιδιακών ζώων όπου θα αναμενόταν να είναι γενετικά πανομοιότυπα, καθώς και των μονοζυγωτικών διδύμων. Όταν πραγματοποιούνται γεγονότα ρετρομετάθεσης σε ένα κύτταρο ή μία κυτταρική γενεαλογία κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, προκύπτουν διακριτά μεταξύ τους γενώματα τα οποία αναφέρονται ως σωματικός μωσαϊκισμός. Τα στοιχεία L1 κινητοποιούνται στα αρχικά στάδια σχηματισμού του κεντρικού νευρικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση και αργότερα κατά την διάρκεια της ενήλικης νευρογένεσης. Η κινητοποίηση αυτή εμφανίζεται να λαμβάνει χώρα συχνά και ανεξάρτητα σε μεμονωμένα προγονικά κύτταρα, οδηγώντας στο σχηματισμό νευρώνων οι οποίοι φέρουν έναν σημαντικό αριθμό νέων αντιγράφων των μεταθετών στοιχείων L1 (218), (160), (219).

Η ιδέα ότι τα L1 ρετρομεταθετά στοιχεία μπορεί να εμπλέκονται στην νευρική ανάπτυξη γεννήθηκε από μία μεγάλης κλίμακας ανάλυση του μεταγραφώματος μέσω μικροσυστοιχιών που έδειξε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ενδογενών L1 κατά την διάρκεια *in vitro* διαφοροποίησης ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων που είχαν προηγουμένως απομονωθεί από τον ιπόκαμπο εγκεφάλου αρουραίου (160). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στην συνέχεια και με περαιτέρω πειράματα στα οποία διαμολύνθηκαν τα προαναφερθέντα κύτταρα με ένα L1 στοιχείο, σημασμένο με την EGFP φθορισμογόνο πρωτεΐνη. Ο σχεδιασμός της κατασκευής αυτού του σημασμένου EGFP/L1 στοιχείου διασφαλίζει πως η έκφραση της EGFP επιτυγχάνεται μόνο και αφού προηγηθεί ένα γεγονός ρετρομετάθεσης. Ύστερα από επτά ημέρες καλλιέργειας των κυττάρων, ανιχνεύτηκε με κυτταρομετρία ροής μια μικρή αλλά σημαντική έκφραση της EGFP (0.75% θετικά κύτταρα), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να υποστηρίξουν την ρετρομετάθεση των L1 στοιχείων. Ωστόσο η έκφραση της EGFP πρωτεΐνης αυξήθηκε σημαντικά όταν κλώνοι των ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων υποβλήθηκαν με την επίδραση ειδικών ερεθισμάτων σε νευρωνική διαφοροποίηση. Αντίστοιχα υψηλά επίπεδα έκφρασης της EGFP δεν παρατηρήθηκαν όταν

τα ίδια κύτταρα διαφοροποιήθηκαν προς αστροκύτταρα ή ολιγοδενδροκύτταρα, γεγονός που επιβεβαιώνει την δράση των L1 ειδικά στην νευρωνική διαφοροποίηση που συντελείται στον ενήλικο εγκέφαλο. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι το σημασμένο L1 στοιχείο ρετρομετατίθεται και *in vivo* στον εγκέφαλο μύς. Ανιχνεύτηκαν κύτταρα θετικά στην EGFP πρωτεΐνη σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου των μυών όπως για παράδειγμα στον εγκεφαλικό φλοιό, τον υποθάλαμο, την παρεγκεφαλίδα, τις κοιλίες, τον υπόκαμπο και την αμυγδαλή. Μάλιστα η συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού απέδειξε συνεντοπισμό της έκφρασης της EGFP με τον νευρωνικό δείκτη NeuN, αλλά όχι και με αντίστοιχους δείκτες της γλοίας, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η ρετρομετάθεση των L1 συντελέστηκε σε νευρικά και όχι σε γλοιακά προγονικά κύτταρα (160), (220).

Έχει προταθεί ότι η κινητοποίηση των L1 στους αναπτυσσόμενους νευρώνες ρυθμίζεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt (221). Το επικρατέστερο μοντέλο ρύθμισης των L1 στον εγκέφαλο προτείνει ότι τα μεταθετά αυτά στοιχεία παραμένουν ανενεργά εξαιτίας της σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 σε ακολουθίες που εντοπίζονται εντός του υποκινητή της 5' αμετάφραστης περιοχής (5' UTR) των L1. Η δράση του Sox2 είναι σημαντική για την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης των αδιαφοροποίητων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και στην περίπτωση της ρετρομετάθεσης των L1 φαίνεται πως διαδραματίζει έναν ανασταλτικό ρόλο ως προς αυτήν. Η ενεργοποίηση του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού επάγει την νευρογένεση μέσω ενεργοποίησης του νευρικού μεταγραφικού παράγοντα NeuroD1 (221). Πιο ειδικά, η ενεργοποίηση του Wnt προκαλεί την μετατόπιση των μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor, TCF/LEF) από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου ανταγωνίζονται με τον Sox2 για τις κοινές, αλληλο-επικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης που μοιράζονται σε διάφορες γενωμικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένης και αυτής του υποκινητή των L1. Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η αποδέσμευση του Sox2 από τον υποκινητή των L1 στοιχείων και η επαγωγή της έκφρασης τους, η οποία συμπίπτει χρονικά με την ταυτόχρονη έκφραση του νευρο-ειδικού παράγοντα NeuroD1 (εικόνα 1.15), υποδεικνύοντας τον ρόλο της ρετρομετάθεσης στην νευρογένεση.



Εικόνα 1.15: Ενεργοποίηση της ρετρομετάθεσης κατά την διάρκεια της νευρωνικής διαφοροποίησης. Στα αδιαφοροποίητα νευρικά βλαστικά κύτταρα τα ρετρομεταθετά στοιχεία L1 παραμένουν ανενεργά εξαιτίας της συμπυκνωμένης δομής της χρωματίνης και της ανασταλτικής δράσης των πρωτεϊνών Sox2 και HDAC (αποακετυλάση 1 των ιστονών της χρωματίνης). Κατά την νευρωνική διαφοροποίηση η δομή της χρωματίνης αναδιαμορφώνεται και μεταπίπτει από ανενεργή (ετεροχρωματίνη) σε ενεργή (ευχρωματίνη) κατάσταση. Στο στάδιο αυτό, η πρωτεΐνη Wnt που απελευθερώνεται από τα αστροκύτταρα διεγείρει την μετατόπιση των πρωτεϊνών TCF/LEF (T/L) από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Οι θέσεις πρόσδεσης των T/L και Sox2 επικαλύπτονται σε αρκετές γενωμικές θέσεις, συμπεριλαμβανομένης και αυτής του υποκινητή των L1. Η αποδέσμευση των L1 από την ανασταλτική δράση του Sox2 και η συνακόλουθη έκφρασή τους, έχει ως αποτέλεσμα την πραγματοποίηση *de novo* ενθέσεων των μεταθετών αυτών στοιχείων σε διάφορες θέσεις εντός

*του γενώματος που δυνητικά μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση νευρικών γονιδίων-στόχων όπως το *NeroD1*, που ρυθμίζουν την νευρωνική διαφοροποίηση [211].*

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε νευρικά προγονικά κύτταρα απομονωθέντα από εγκέφαλο ανθρώπινων εμβρύων ή προερχόμενα από ανθρώπινες σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, τα οποία επίσης αποδείχθηκε ότι υποστηρίζουν την ρετρομετάθεση των L1. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε ένας ασυνήθιστα υψηλότερος αριθμός L1 αντιγράφων σε δείγματα νευρικού ιστού, προερχόμενα από ανθρώπινο εγκέφαλο, συγκριτικά με αντίστοιχα δείγματα διαφορετικών σωματικών ιστών όπως για παράδειγμα καρδιάς ή ήπατος (218). Η συχνότητα ρετρομετάθεσης των L1 στους αναπτυσσόμενους νευρώνες συντελείται σε ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά καθώς εκτιμάται ότι λαμβάνουν χώρα περίπου 80 με 800 νέες ενθέσεις ανά κύτταρο σε συγκεκριμένες περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου.

Τα άνωθεν αποτελέσματα είναι εξαιρετικά σημαντικά για δύο κυρίως λόγους: Πρώτον, αποδεικνύεται πλέον ότι ο μηχανισμός της ρετρομετάθεσης δεν περιορίζεται μόνο στα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς αλλά λαμβάνει χώρα και σε σωματικούς ιστούς όπως είναι ο εγκέφαλος. Δεύτερον, η ρετρομετάθεση των L1 που αποδεδειγμένα συντελείται σε νευρικά προγονικά κύτταρα, αμφισβητεί το μέχρι πρότινος αδιαμφισβήτητο δόγμα ότι όλοι οι νευρώνες αποτελούν γενετικά σταθερές και αμετάβλητες οντότητες.

Υπάρχουν συνεπώς βάσιμες ενδείξεις ότι ο μηχανισμός της ρετρομετάθεσης συνεισφέρει στην γενετική ετερογένεια των νευρικών κυττάρων και ως εκ τούτου στην πλαστικότητα του νευρικού ιστού που συνδέεται με τις λειτουργίες της μάθησης και συμπεριφοράς. Από την άλλη πλευρά ο μηχανισμός της ρετρομετάθεσης θα μπορούσε να αποτελέσει και αιτιολογικό παράγοντα αρνητικών επιπτώσεων στην νευρωνική λειτουργία, αυξάνοντας τον κίνδυνο πρόκλησης νευρολογικών παθήσεων.

1.9 ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Οι πρωτοπαθείς όγκοι του εγκεφάλου αποτελούν το 1,5% των κακοήθων νεοπλασματικών παθήσεων και ευθύνονται για το 2,5% των θανάτων από καρκίνο ετησίως. Το γλοιώμα, είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου στο ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα), αποτελώντας περίπου το 80% όλων των περιπτώσεων πρωτογενών εγκεφαλικών όγκων στον άνθρωπο (222).

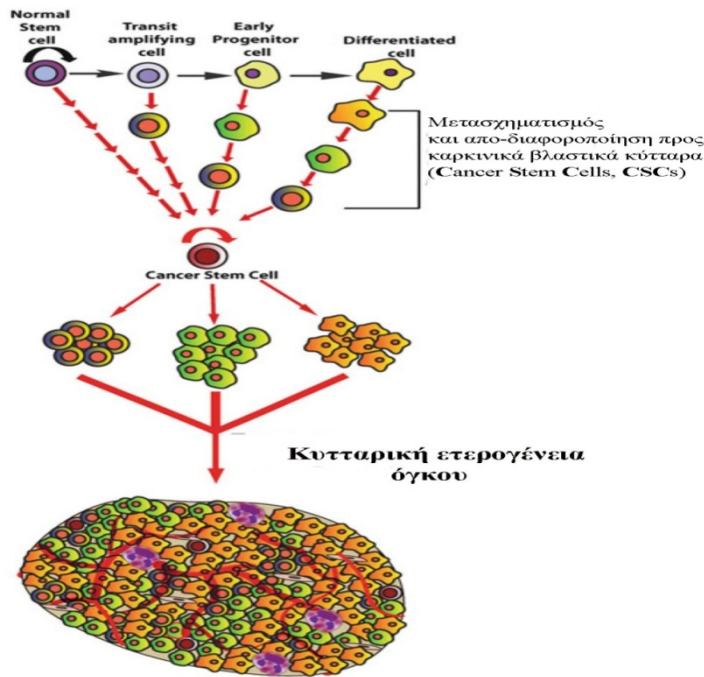
Τα γλοιώματα αντιπροσωπεύουν μία εξαιρετικά ετερογενή ομάδα ενδοκρανιακών όγκων τα οποία ιστολογικά ομοιάζουν με τα κύτταρα της γλοίας. Ανάλογα με τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά και τον βαθμό κακοήθειας ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες ή βαθμούς σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Υγείας (βαθμοί I έως IV) (222). Το γλοιώμα βαθμού I, ή αλλιώς πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα, εμφανίζεται συχνότερα στις νεαρές ηλικίες, δεν έχει την προδιάθεση να εξελίσσεται επιθετικά ενώ η πλήρης εξαίρεσή του συνεπάγεται ίαση. Το γλοιώμα βαθμού II (αστροκύτωμα, επενδύωμα, ολιγοδενδρογλοιώμα) αντιπροσωπεύει όγκους χαμηλής κακοήθειας οι οποίοι είναι καλά διαφοροποιημένοι και αργά αναπτυσσόμενοι. Ωστόσο, εμφανίζουν διάχυτη διήθηση, γεγονός που καθιστά την χειρουργική εξαίρεσή τους δύσκολη και σε βάθος χρόνου μπορεί να εξελιχθούν στις πιο κακοήθεις μορφές, III και IV. Τα γλοιώματα υψηλής κακοήθειας (βαθμός III: αναπλαστικό αστροκύτωμα και βαθμός IV: πολύμορφο γλοιοβλάστωμα) αντιστοιχούν σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης και υψηλής κυτταροβριθείας. Χαρακτηρίζονται από πολύ φτωχή πρόγνωση και οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, σπάνια επιμηκύνουν τον χρόνο ζωής του ασθενούς για περισσότερο του ενός έτους (223).

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αποτελεί το 60% των γλοιωμάτων. Συνήθως, σε ποσοστό άνω του 90%, αναπτύσσεται *de novo* και αποτελεί πρωτογενή όγκο, ενώ λιγότερο συχνά είναι αποτέλεσμα εξέλιξης προϋπάρχοντος γλοιώματος χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας (δευτερογενές). Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα εμφανίζει σημαντική ποικιλομορφία. Παρουσιάζει μεγάλη κυτταροβρίθεια και αποτελείται από χαμηλής διαφοροποίησης, συχνά πολύμορφα, νεοπλασματικά κύτταρα με σημαντική κυτταρική ατυπία και ισχυρή μιτωτική δραστηριότητα (224).

Υπάρχουν πολλά επίπεδα ετερογένειας που σχετίζονται με τον καρκίνο, αποτελώντας ίσως το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα της εν λόγω παθογένειας. Η γενετική ετερογένεια που απαντάται στην πλειονότητα των καρκίνων οφείλεται στην γενωμική αστάθεια των καρκινικών κυττάρων τα οποία επιπρόσθετα υπόκεινται και σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Η φαινοτυπική ετερογένεια των κυττάρων που συνιστούν έναν όγκο αντανακλάται στην έκφραση διαφόρων δεικτών που χαρακτηρίζουν διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Η έκφραση αυτών των δεικτών καθώς και οι λειτουργικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων μεταβάλλονται κατά την διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου. Η ανίχνευση ειδικών επιφανειακών κυτταρικών δεικτών επιτρέπει την ταυτοποίηση διαφόρων κυτταρικών υποπληθυσμών εντός του ίδιου όγκου, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα καρκινικά κύτταρα απαντώνται σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης (225).

Είναι πλέον γνωστό πως οι όγκοι αποτελούν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων όσον αφορά το φαινότυπο και το δυναμικό τους να πολλαπλασιάζονται, ενώ μόνο ένα μικρό κυτταρικό κλάσμα έχει την ικανότητα να δημιουργεί τον όγκο, να συντηρεί την αύξησή του και να δίνει μεταστάσεις. Πολλοί τύποι καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου γλοιώματος, αναπτύσσονται από έναν μικρό υποπληθυσμό καρκινικών κυττάρων με βλαστικές ιδιότητες (Cancer Stem Cells), τα οποία μπορούν να αυτο-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται δίνοντας γένεση σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που συνιστούν τον όγκο. Αποτελούν στην ουσία έναν βιολογικά διακριτό κυτταρικό υποπληθυσμό με απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού ο οποίος εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα στις θεραπευτικές μεθόδους όπως είναι η χημειοθεραπεία και ακτινοβολία (226). Το ιεραρχικό μοντέλο οργάνωσης του καρκίνου, προτείνει ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από μετασχηματισμό φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων του ιστού εξαιτίας της συσσώρευσης μεταλλάξεων, ευθύνονται για την μεγάλη κυτταρική ετερογένεια που χαρακτηρίζει συνήθως έναν όγκο (227).

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι δεν υπακούουν όλοι οι τύποι καρκίνου σε αυτό το μονοκαντευθυντικό ιεραρχικό μοντέλο οργάνωσης, και έχουν εισάγει την έννοια της κυτταρικής πλαστικότητας η οποία προτείνει ότι προγονικά ή ακόμη και τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα ενός ιστού μπορούν να από-διαφοροποιηθούν και να αποκτήσουν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων τα οποία εν συνεχεία συσσωρεύουν μεταλλάξεις και οδηγούν στο σχηματισμό καρκινικών βλαστικών κυττάρων (εικόνα 1.16).

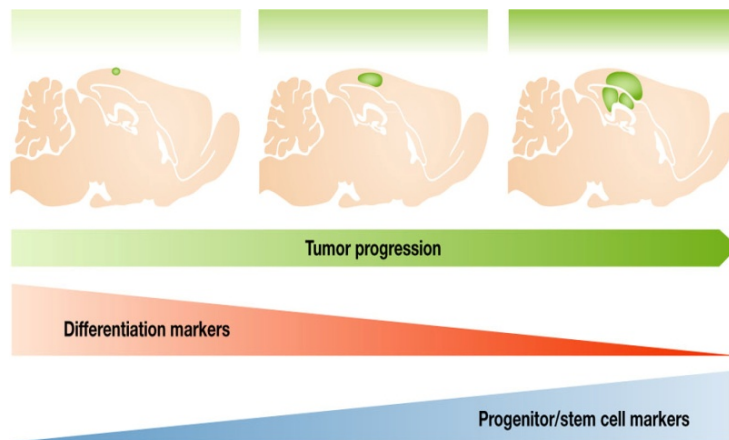


Εικόνα 1.16: Το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι από την γενεαλογική ιεραρχία ενός ιστού μπορούν να υποστούν ογκογενετικό μετασηματισμό και να μετατραπούν σε καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα που μπορεί να προκύψουν από μετασηματισμό είτε φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων είτε από προγονικά ή ακόμα και τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία υπόκεινται σε απο-διαφοροποίηση, δίνουν γένεση σε εξαιρετικά ετερογενείς κυτταρικά όγκους. [Από το βιβλίο “Epigenetics: Development and Disease”].

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα μπορεί να προέλθει από διάφορα κύτταρα του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων και των τελικώς διαφοροποιημένων φλοιϊκών αστροκυττάρων και νευρώνων (228). Συγκεκριμένα, πριν μία δεκαετία, ο Ronald DePinho και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι ο συνδυασμός της αποσιώπησης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών $p16^{\text{INK4a}}$ και $p19^{\text{ARF}}$ με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση του EGFR επάγει την αποδιαφοροποίηση ώριμων αστροκυττάρων. Επιπλέον, απέδειξαν ότι τόσο τα NSCs με αποσιωπημένους τους γενετικούς τόπους INK4a και ARF, όσο και τα τελικά διαφοροποιημένα αστροκύτταρα με ενεργοποιημένο τον EGFR, ήταν αμφότερα σε θέση να παράγουν γλοιώματα υψηλής κακοήθειας (229). Τα ευρήματα αυτά υπέδειξαν και τους δύο προαναφερθέντες κυτταρικούς τύπους (NSCs και αστροκύτταρα) ως το ίδιο πιθανούς υποψήφιους για την εκκίνηση ογκογενετικών φαινομένων. Η ανίχνευση του νευρωνικού δείκτη βIII -τουμπουλίνης σε γλοιοματικούς όγκους (προερχόμενους από νεοπλασματικά αστροκύτταρα) υποδεικνύει ότι η κυτταρική από-διαφοροποίηση που συντελέστηκε μπορεί να ήταν τόσο εκτεταμένη, ώστε να οδήγησε στο σχηματισμό πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων με δυναμικό διαφοροποίησης τόσο προς γλοιοκύτταρα όσο και νευρώνες.

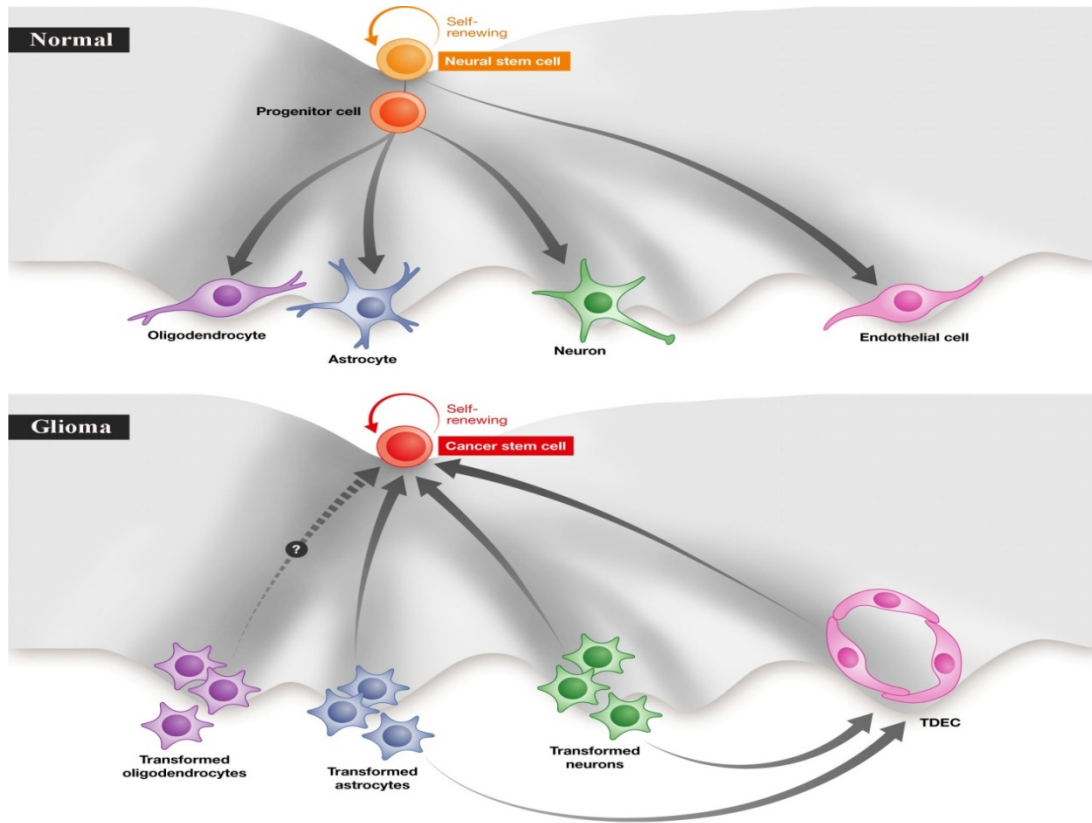
Πρόσφατα, μία δεύτερη ερευνητική ομάδα απέδειξε ότι η εισαγωγή συγκεκριμένων ογκογονιδίων σε αστροκύτταρα ή νευρώνες προκαλεί αποδιαφοροποίησή τους προς ένα βλαστικό/προγονικό στάδιο και εν συνεχεία σχηματισμό γλοιωμάτων σε ποντικούς. Επιπλέον, η μελέτη της κινητικής της έκφρασης συγκεκριμένων δεικτών διαφοροποίησης του νευρικού ιστού κατά την διάρκεια της εξέλιξης μιας κακοήθειας, απέδειξε ότι στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του όγκου εκφράζονται πιο έντονα δείκτες διαφοροποίησης όπως είναι η GFAP και η βIII -τουμπουλίνη. Προοδευτικά όμως, κατά την εξέλιξη του όγκου, η έκφραση των προαναφερθέντων πρωτεϊνών χάνεται και αντικαθίσταται από την

έκφραση πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν τα νευρικά προγονικά/ βλαστικά κύτταρα, όπως είναι η Sox2 και η Νεστίνη (228) (εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17: Η κινητική της έκφρασης χαρακτηριστικών δεικτών διαφοροποίησης του νευρικού ιστού κατά την εξέλιξη του όγκου. Ο ογκογενετικός μετασχηματισμός νευρωνικών ή γλοιακών κυττάρων στον εγκεφαλικό φλοιό μινών οδηγεί στο σχηματισμό γλοιοματικών όγκων οι οποίοι εκφράζουν στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τους δείκτες διαφοροποίησης όπως είναι η βIII-τουμπολίνη και η GFAP, αντίστοιχα. Κατά την εξέλιξη τους, οι όγκοι σταδιακά χάνουν την έκφραση των πρωτεϊνών διαφοροποίησης και αποκτούν αυξανόμενη ανοσοαντιδραστικότητα σε πρωτεΐνες προγονικών/νευρικών βλαστικών κυττάρων όπως είναι η Sox2 και η Νεστίνη (228).

Προτείνεται συνεπώς ότι: 1) η επαγωγή ογκογενετικής αποδιαφοροποίησης ώριμων κυττάρων του εγκεφάλου προς μία προγονική/βλαστική κατάσταση οδηγεί σε εξαιρετικά ετερογενείς κυτταρικά γλοιοματικούς όγκους και 2) η γενετική πλαστικότητα που αποκτούν αυτά τα κύτταρα επιτρέπει την εξέλιξη και διατήρηση της κακοήθειας του όγκου ενώ μπορεί να προκαλέσει ακόμα και τον σχηματισμό δικών του αιμοφόρων αγγείων μέσω δια-διαφοροποίησής τους (trans-differentiation) (230). Συνεπώς, η μετάπτωση ενός οποιουδήποτε κυττάρου σε καρκινικό βλαστικό κύτταρο υπαγορεύεται από την απορρύθμιση συγκεκριμένων γενετικών μονοπατιών οδηγώντας στον σχηματισμό εξαιρετικά ετερογενών φαινοτυπικά γλοιομάτων (229). Τα δεδομένα αυτά θέτουν υπό αμφισβήτηση το ιεραρχικό μοντέλο οργάνωσης του καρκίνου που προτείνει ότι ένα αρχικό κύτταρο με βλαστικές ιδιότητες (cell of origin) προκαλεί την ογκογένεση και αντιπαραβάλλουν την έννοια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού κατά τον οποίο ογκογενετικές τροποποιήσεις γονιδίων μπορεί να οδηγήσουν στην αποδιαφοροποίηση κυττάρων προς καρκινικά βλαστικά ή ακόμα και στην δια-διαφοροποίησή τους προς έναν εντελώς διαφορετικό κυτταρικό τύπο (εικόνα 1.18).



Εικόνα 1.18: Προτεινόμενο μοντέλο γένεσης κακοήθους γλιοβλαστώματος. Ο φυσιολογικός μηχανισμός της νευρικής διαφοροποίησης συντελείται από τα νευρικά βλαστικά κύτταρα τα οποία δύνανται να αυτό-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται, μέσα από ενδιάμεσα προγονικά στάδια, στους τρεις βασικούς κυτταρικούς τύπους του νευρικού συστήματος (ολιγοδενδροκύτταρα, αστροκύτταρα, νευρώνες). Στη περίπτωση του κακοήθους γλιοβλαστώματος, μετασχηματισμένα αστροκύτταρα, νευρώνες και πιθανώς ολιγοδενδροκύτταρα που έχουν υποστεί ογκογενετικές μεταλλάξεις, αποδιαφοροποιούνται/επαναπρογραμματίζονται σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα τα οποία συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται στους προαναφερθέντες κυτταρικούς τύπους. Τα μετασχηματισμένα αστροκύτταρα ή νευρώνες μπορούν επιπλέον να δια-διαφοροποιηθούν προς ενδοθηλιακά κύτταρα (*Transformed Endothelial Cells, TDEC*), που με την σειρά τους και αυτά μπορούν να αποδιαφοροποιηθούν προς καρκινικά βλαστικά (231)

1.9.1 Δείκτες βλαστικών κυττάρων σε γλοιωματικούς όγκους

Οι πιο διαδεδομένοι κυτταρικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων (και συνεπώς και των καρκινικών βλαστικών κυττάρων) είναι ο επιφανειακός δείκτης CD133 και η Νεστίνη. Η αξιοποίησή τους στο ερευνητικό πεδίο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων υπήρξε θεμελιώδης και συνεισέφερε σημαντικά στον χαρακτηρισμό των γλοιωματικών βλαστικών κυττάρων καθώς και την κατανόηση λειτουργιών τους που σχετίζονται με την εξέλιξη του όγκου και την ανθεκτικότητά του στην ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία.

α) CD133: Ο επιφανειακός δείκτης CD133 ή αλλιώς prominin-1 είναι μία κυτταρική μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία φέρει πέντε διαμεμβρανικές περιοχές και αρχικά ανιχνεύθηκε σε νευροεπιθηλιακά βλαστικά κύτταρα ποντικού (232). Στον άνθρωπο η prominin-1 απομονώθηκε από βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει και δεσμεύεται ειδικά στον πρωτεϊνικό επίτοπο AC133. Εν συντομία, ο CD133 απαντάται σε διάφορους τύπους βλαστικών κυττάρων καθώς και σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου ενώ η έκφρασή του μειώνεται στα διαφοροποιημένα

κύτταρα (233). Κύτταρα που απομονώθηκαν από γλοιοματικούς όγκους ασθενών και βρέθηκαν θετικά στην έκφραση του CD133 (CD133+ cells) επιδείκνυαν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων *in vitro* και ήταν σε θέση να εκκινήσουν και να συντηρήσουν την ανάπτυξη και εξέλιξη όγκων *in vivo* (234), (235). Επιπλέον, τα CD133+ κύτταρα παρουσιάζουν ισχυρή ανθεκτικότητα σε φάρμακα που οφείλεται στην έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας των ABC μεταφορέων (ABC transporters), την αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA και τις αντιαποπτωτικές τους ιδιότητες (236). Ισχυρή ανθεκτικότητα παρουσιάζουν επίσης και στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως είναι η τεμοζολομίδη και το ετοποσίδιο. Μία εκτεταμένη συγκριτική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα σε CD133+ και CD133- γλοιοματικά κύτταρα απέδειξε ότι τα πρώτα εκφράζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τους πρωτεϊνικούς μεταφορείς φαρμάκων BCRP1/ABCG2 και MGMT, τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, FLIP, BCL-XL καθώς και μία σειρά από IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP) (237).

Νεστίνη: Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των ενδιάμεσων ινιδίων (Intermediate Filaments, IF) και παράγεται στα προγονικά/βλαστικά κύτταρα του ΚΝΣ των θηλαστικών κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Αποτελεί δείκτη χαρακτηρισμού των πολλαπλασιαζόμενων και μεταναστευόντων κυττάρων του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου. Τα IFs, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η βιμεντίνη, η GFAP και τα νευρονημάτια, αποτελούν μία εξαιρετικά ετερογενή ομάδα ενδο-κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και επιδεικνύουν κυτταρική εξειδίκευση στην έκφρασή τους. Τα IFs αποτελούν συστατικά στοιχεία του κυτταροσκελετού και εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής μορφολογίας, προσκόλλησης και πολλαπλασιασμού. Όταν λαμβάνει χώρα η κυτταρική διαφοροποίηση, μειώνεται η έκφραση της νεστίνης και αυξάνεται κατ' αντιστοιχία η έκφραση άλλων IFs όπως για παράδειγμα των νευρονηματίων στην περίπτωση δέσμευσης των βλαστικών κυττάρων στην νευρωνική γενεαλογία. Στον φυσιολογικό ενήλικα εγκεφαλο, η νεστίνη εκφράζεται κυρίως στα βλαστικά κύτταρα της SVZ και σε μικρότερο βαθμό στο χοριοειδές πλέγμα αν και κάποια κύτταρα θετικά στην εν λόγω πρωτεΐνη εντοπίζονται και σε άλλες περιοχές του προσθεγκεφάλου. Αυξημένη έκφραση της νεστίνης συχνά συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως είναι για παράδειγμα το εγκεφαλικό τραύμα, η ισχαιμία, η φλεγμονή και οι νεοπλασματικές παθήσεις. Η νεστίνη ανιχνεύεται επίσης σε εγκεφαλικούς όγκους, συμπεριλαμβανομένου και του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος και αποτελεί προγνωστικό δείκτη του βαθμού κακοήθειας. Η έκφραση της νεστίνης σε καρκινικά κύτταρα συνδέεται με αυξημένη κυτταρική κινητικότητα, υψηλό διηθητικό δυναμικό, και χαμηλή διαφοροποίηση.

1.9.2 Η πλαστικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων: Κυτταρικός επαναπρογραμματισμός και Δια-διαφοροποίηση

Η διαδικασία κατά την οποία ένας διαφοροποιημένος κυτταρικός τύπος Α μετατρέπεται σε έναν άλλο κυτταρικό τύπο Β περιγράφεται από μια σειρά διαφορετικών ορολογιών όπως η δια-διαφοροποίηση (transdifferentiation) ή ο επαναπροσδιορισμός (transdetermination). Η διαδικασία αυτή μπορεί να λάβει χώρα άμεσα ή με την μεσολάβηση ενδιάμεσων πολυδύναμων καταστάσεων. Πρόσφατα δεδομένα έχουν αποδείξει ότι τα σωματικά βλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν διαφοροποιημένα κύτταρα και άλλων ιστών πέραν του ιστού προέλευσής τους, εμφανίζουν δηλαδή αναπτυξιακή πλαστικότητα (developmental plasticity). Η θεωρία της πλαστικότητας των βλαστικών κυττάρων προτείνει πως η δέσμευσή τους σε κάποια κυτταρική γενεαλογία δεν είναι διαδικασία αυστηρά καθορισμένη και μη αντιστρεπτή,

αντιθέτως χαρακτηρίζεται από ευελιξία επιτρέποντας στα βλαστικά κύτταρα να ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον που σχετίζονται με ιστική αναγέννηση. Μια σημαντική έρευνα που αποδεικνύει αυτή την θεωρία πραγματοποιήθηκε από τους Douglas A. Melton *et al.* στην οποία κατέστη εφικτή η *in vivo* μετατροπή απανκρεατικών κυττάρων σε β-ενδοκρινή κύτταρα, ικανά να παράγουν ινσουλίνη με αποδόσεις που φτάνουν το 20% μέσα σε τρεις μόνο ημέρες. Ο άμεσος κυτταρικός επαναπρογραμματισμός πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή τριών αναπτυξιακών παραγόντων των β-κυττάρων (Pdx1, Ngn3 και Mafa) στο πάγκρεας ενήλικων ποντικών (238).

Χρησιμοποιώντας παρόμοια μεθοδολογία οι Qian *et al.* απέδειξαν ότι η *in vivo* υπερέκφραση τριών μεταγραφικών παραγόντων (GATA4, Mef2c και Tbx5) μέσω ρετροϊκής διαμόλυνσης στο μυοκάρδιο ποντικών, είχε ως αποτέλεσμα την άμεση μετατροπή καρδιακών ινοβλαστών σε καρδιομυοκύτταρα (239).

Επιπλέον, σε μία άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η μετατροπή αστροκυττάρων σε ώριμους νευρώνες *in situ* ύστερα από έγχυση ανασυνδιασμένου λεντιϊού που έφερε τρεις μεταγραφικούς παράγοντες (Ascl1, Brn2a και Myt1l), στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου ενήλικου ποντικού (240). Ο κοινός παρονομαστής των τριών προαναφερθέντων μελετών είναι πως η κυτταρική δια-διαφοροποίηση επετεύχθη άμεσα χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσων σταδίων.

Ωστόσο υπάρχουν παραδείγματα όπου η μετατροπή ενός κυτταρικού τύπου σε έναν άλλον πραγματοποιείται με την μεσολάβηση ενδιάμεσων προγονικών/βλαστικών σταδίων. Συγκεκριμένα, ο Zhang και οι συνεργάτες του επαναπρογραμματίσαν αστροκύτταρα στο ραβδωτό σώμα ενήλικων ποντικών σε νευροβλάστες (προγονικά νευρικά κύτταρα). Στην μελέτη τους απέδειξαν ότι μόνο ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 επαρκούσε για τον επαναπρογραμματισμό των ενδογενών αστροκυττάρων σε νευροβλάστες μέσω ενός ενδιάμεσου, πολλαπλασιαστικά ενεργού, προγονικού σταδίου. Οι επαγόμενοι νευροβλάστες μπορούσαν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω, με την εξωγενή χορήγηση βαλπροϊκού οξέος (Valproic Acid, VPA), σε ώριμους νευρώνες οι οποίοι έφεραν λειτουργικούς διαύλους νατρίου και σχημάτιζαν συνάψεις με τους ενδογενείς νευρώνες, σηματοδοτώντας την επιτυχή ενσωμάτωσή τους στο τοπικό νευρικό δίκτυο (241).

Η διαδικασία της δια-διαφοροποίησης συναντάται και σε διάφορες μορφές καρκίνου. Συγκεκριμένα, αρκετά εργαστήρια έχουν αποδείξει ότι στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να δια-διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας στο σχηματισμό λειτουργικών αιμοφόρων αγγείων τα οποία τροφοδοτούν και συντηρούν τον όγκο (230), (242), (243). Σε ορισμένες περιπτώσεις πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων στον άνθρωπο, διαπιστώθηκε ότι πάνω από το 70% των ενδοθηλιακών κυττάρων που συνιστούν τα αιμοφόρα αγγεία, προέρχονταν από γλοιοωματικά κύτταρα (243). Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι τα γλοιοωματικά καρκινικά κύτταρα μπορούν να δια-διαφοροποιηθούν και σε περικύτταρα των αιμοφόρων αγγείων (244). Τα δεδομένα αυτά αιτιολογούν και την αυξημένη ανθεκτικότητα του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος σε φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή της αγγειογένεσης, όπως είναι το avastin (245), (246). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι σε νεοπλασματικά μελανοκύτταρα εκφράζονται πρωτεϊνικοί δείκτες της νευρογλοιακής κυτταρικής γενεαλογίας (247), (248). Αρκετές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από μελάνωμα συνεκφράζουν δείκτες καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CD133, ABCG2) και νευρογλοιακών προγονικών καθώς και ώριμων νευρικών κυττάρων (MAP2, δείκτης μετα-μιτωτικών νευρικών κυττάρων), και μπορούν να δια-διαφοροποιηθούν σε αστροκύτταρα ύστερα από καλλιέργεια τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (249).

Έχοντας πλέον αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν την αναπτυξιακή πλαστικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, η προσοχή τώρα στρέφεται στους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν την διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού.

1.9.3 Η ρετρομετάθεση σε φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού

Η τεχνολογία των Επαγόμενων Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) που εισήχθη το 2006 από τον Yamanaka προσέφερε την δυνατότητα της διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό. Με την εισαγωγή τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (OCT3/4, SOX2, KLF4 και c-Myc) σε σωματικά κύτταρα δεσμευμένα σε συγκεκριμένες κυτταρικές γενεαλογίες (π.χ. δερματικοί ινοβλάστες, νευρικά κύτταρα,), κατέστη δυνατή η από-διαφοροποίησή και μετατροπή τους σε πολυδύναμες κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν σχεδόν όμοια χαρακτηριστικά με τα Εμβρυονικά Βλαστικά (ES) κύτταρα που απομονώνονται από τις βλαστοκύστες εμβρύων. Εν συνεχεία, η καλλιέργεια των iPSCs σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με τους κατάλληλους αναπτυξιακούς παράγοντες, οδηγεί στη διαφοροποίησή τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους του οργανισμού (καρδιομυοκύτταρα, νευρικά κύτταρα, β-πανκρεατικά κύτταρα, ντοπαμινεργικοί νευρώνες, λιποκύτταρα, προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα). Μπροστά στην πολλά υποσχόμενη προοπτική της αξιοποίησης των iPSCs στην αναγεννητική ιατρική για την θεραπεία σοβαρών ασθενειών, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην λεπτομερή διερεύνηση της γενωμικής τους ακεραιότητας. Έχοντας παρατηρηθεί φαινόμενα ατελούς διαφοροποίησης σε υπο-πληθυσμούς των iPSCs που αγγίζουν το ποσοστό του 20%, ακόμα και υπό αυστηρές συνθήκες *in vitro* κατευθυνόμενης νευρικής διαφοροποίησης, πραγματοποιήθηκε μεγάλη κλίμακας γενωμική ανάλυση για να διαπιστωθούν πιθανές αποκλίσεις στο γενετικό προφίλ μεταξύ iPSCs με υψηλό και αντίστοιχα χαμηλό δυναμικό διαφοροποίησης. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των LTR ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊών σε iPSCs με μη φυσιολογικό δυναμικό διαφοροποίησης (250), (251).

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι κατά τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό προς iPSCs, παρατηρείται μία παροδική υπερενεργοποίηση των ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊών τύπου H (HERV-Hs) σε επίπεδα υψηλότερα από τα αντίστοιχα που παρατηρούνται στα ESCs. Η ενεργοποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (OCT3/4, SOX2, KLF4), στις μακρές τερματικές αλληλουχίες (LTRs) των HERV-H, και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη στα αρχικά στάδια του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού προκειμένου αυτός να ολοκληρωθεί επιτυχώς. Μετά την ολοκλήρωσή του, τα επίπεδα έκφρασης των HERV-H μειώνονται σε ποσοστά που προσεγγίζουν τα αντίστοιχα των ESCs. Ωστόσο, σε περίπτωση που τα επίπεδα έκφρασης των HERV-H διατηρηθούν υψηλά και μετά την ολοκλήρωση του επαναπρογραμματισμού, προκύπτουν iPSCs που παρουσιάζουν ατελές, μη φυσιολογικό δυναμικό διαφοροποίησης (252). Συνεπώς, διαφαίνεται ότι η παροδική ενεργοποίηση των HERV-H είναι απαραίτητη για τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων προς ένα πολυδύναμο βλαστικό στάδιο και την εγκαθίδρυση του δυναμικού διαφοροποίησής του.

Σε μία άλλη μελέτη των iPSCs διαπιστώθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης ενός ενδογενούς, πλήρους μήκους L1 στοιχείου καθώς και της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από τον ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1 (ORF1p), που σχετίζονται με μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης στον υποκινητή του L1. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι τα iPSCs μπορούσαν να υποστηρίξουν γεγονότα ρετρομετάθεσης ύστερα από διαμόλυνσή τους με ένα ανασυνδιασμένο L1 στοιχείο, σημασμένο με την EGFP πρωτεΐνη (253).

Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων σχετίζεται με την έκφραση ενδογενών μεταθετών στοιχείων και πιθανώς με *de novo* γεγονότα ρετρομετάθεσής τους.

1.10 Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

Το πρώτο παράδειγμα ανθρώπινης νόσου όπου μελετήθηκαν φαινόμενα διαταραχής των επιγενετικών μηχανισμών, είναι ο καρκίνος. Αρχικά, ο καρκίνος στον άνθρωπο θεωρήθηκε ως ένα αμιγώς γενετικό νόσημα το οποίο προϋποθέτει πολλαπλές μεταλλάξεις γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA, τη φλεγμονή, την κυτταρική προσκόλληση, και έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ωστόσο, αρκετές από τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, όπως η ετερογένεια, η διεισδυτικότητα, η μετάσταση και η ανθεκτικότητα στη θεραπεία δεν μπορούν να αποδοθούν μόνο σε γενετικές διαταραχές. Η πρόοδος στον τομέα της επιγενετικής προτείνει ότι τόσο γενετικές όσο και επιγενετικές εκτροπές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου

α) Η μεθυλίωση του DNA

Η πρώτη επιγενετική διαταραχή που παρατηρήθηκε στο ανθρώπινο γλοίωμα είναι η υπομεθυλίωση επαναλαμβανόμενων ακολουθιών DNA κατά μήκος του γονιδιώματος, κωδικοποιών περιοχών και ιντρονίων, με αποτέλεσμα τη χρωμοσωμική αστάθεια, την ενεργοποίηση μεταθετών στοιχείων και την έκφραση αποτυπωμένων γονιδίων, προωθώντας την ανάπτυξη του καρκινικού κυττάρου. Ο βαθμός υπομεθυλίωσης αυξάνεται καθώς ο καρκίνος γίνεται πιο διεισδυτικός. Στον κακοήθες γλοίωμα όμως παρατηρούνται και φαινόμενα υπερμεθυλίωσης. Η υπερμεθυλίωση νησίδων CpGs στους υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (254), την επιδιόρθωση του DNA (255), την διήθηση (256), (257), την απόπτωση (258), (259) αλλά και ογκοκατασταλτικών γονιδίων (260) (261), έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπησή τους και την συνακόλουθη νεοπλασματική κυτταρική μετατροπή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφόρων βαθμών γλοιώματος (βαθμοί II, III και IV) όπως διαφοροποίηση παρουσιάζει και η ένταση μεθυλίωσης μεταξύ συγκεκριμένων γονιδίων (262).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα στο πεδίο της μεθυλίωσης του DNA οδήγησε στην ανακάλυψη ενός σημαντικού επιγενετικού δείκτη για το ανθρώπινο γλοίωμα. Πιο ειδικά, η μεθυλοτρανσφεράση της O⁶-μεθυλογουανίνης του DNA (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) είναι ένα επιδιορθωτικό ένζυμο που αφαιρεί μία προσαρτημένη αλκυλομάδα από το άτομο οξυγόνου του 6' άνθρακα του δακτυλίου της γουανίνης και την μεταφέρει σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης του ενεργού του κέντρου. Με αυτή τη διαδικασία παρεμποδίζεται ο σχηματισμός της O⁶-αλκυλ-γουανίνης η οποία αφενός προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις και αφετέρου, οδηγεί μέσω διπλασιασμού του DNA στο σχηματισμό δίκλωνων ρηγμάτων στον κλώνο του (263), πυροδοτώντας τελικά τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (264). Παράλληλα όμως με την προστατευτική του δράση απέναντι σε μεταλλαξιγόνα γεγονότα που μπορεί να λάβουν χώρα σε φυσιολογικά κύτταρα, το GMTM προστατεύει και τα καρκινικά κύτταρα από αλκυλιωτικούς κυτταροτοξικούς παράγοντες όπως είναι η τεμοζολομίδη, που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία. Ο βαθμός μεθυλίωσης του υποκινητή του

συγκεκριμένου γονιδίου αποτελεί έναν ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της απόκρισης του ασθενούς στην επικείμενη χημειοθεραπευτική αγωγή που θα λάβει. Έχει βρεθεί ότι υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης του γονιδίου MGMT σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση του ασθενούς και επιτυχέστερη ανταπόκρισή του στη θεραπεία με τεμοζολομίδη, συγκριτικά με εκείνους που φέρουν την υπομεθυλιωμένη μορφή του γονιδίου (265), (223). Ο προσδιορισμός του βαθμού μεθυλίωσης του γονιδίου αυτού συνεπώς έχει καθιερωθεί ως ένας σημαντικός κλινικός δείκτης στην ογκο-νευρολογία και τις κλινικές δοκιμές.

β) Ιστονικές τροποποιήσεις

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι μεταβολές σε επίπεδο ιστονών πιθανώς εμπλέκονται στην γένεση γλοιομάτων. Τέτοιες μεταβολές περιλαμβάνουν τόσο την απορύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στις ιστονικές τροποποιήσεις, όσο και αλλαγές στο πρότυπο των ιστονικών τροποποιήσεων μεμονωμένων γονιδίων. Μία μεγάλης κλίμακας γενωμική ανάλυση δειγμάτων από ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, απέδειξε ότι οι μεταβολές σε επίπεδο ιστονών προέρχονται από μεταλλάξεις ρυθμιστικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των HDACs (HDAC2 και HDAC9), των απομεθυλασών των ιστονών (JMJD1A και JMJD1B) και των μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών (SET7, SETD7, MLL, MLL3 και MLL4) (266). Επιπλέον, μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των HDACs (HDAC1, HDAC2 και HDAC3) που προκαλούνται από άγνωστους μέχρι σήμερα παράγοντες, συνδέονται με φαινόμενα υποτροπής και εξέλιξης του όγκου (267), (268). Μεμονωμένα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση ιστονικών τροποποιήσεων, έχουν αναφερθεί σε αρκετές έρευνες. Για παράδειγμα, μεταβολές στα πρότυπα των ιστονικών τροποποιήσεων προκαλούνται από μειωμένη έκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης RRP22 και της πρωτεΐνης-ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου p21, σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση του προ-πολλαπλασιαστικού μεταγραφικού παράγοντα HOXA9 (269), (270), (271) (πίνακας 1.3). Ωστόσο, ο ακριβής λειτουργικός ρόλος των ιστονικών τροποποιήσεων στο ανθρώπινο γλοίωμα και η δυνατότητα αξιοποίησής τους ως πιθανούς βιοδείκτες ή θεραπευτικούς στόχους αποτελούν σημαντικά πεδία μελλοντικής έρευνας.

Μεθυλίωση DNA

Γονίδια	Μονοπάτι	Αναφορά
GATA4, NDRG2	Ογκο-καταστολή	(260), (261)
MGMT	Επιδιόρθωση DNA	(255)
p14ARF	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	(254)
TMS1/ASC, WWOX	Απόπτωση	(258), (259)
SOCS3, PCDH-gamma-A11	Διήθηση	(256), (257)
Sox2	Μετανάστευση	(272)

Τροποποιήσεις Ιστονών

Μεταλλάξεις

Απο-ακετυλάσες Ιστονών	(HDAC2, HDAC9)	(266)
Απο-μεθυλάσες Ιστονών	(JMJD1A, JMJD1B)	
Μεθυλο-τρανσφεράσες Ιστονών	(SET7, SETD7, MLL, MLL3, MLL4)	

Μεταβολές επιπέδων έκφρασης

Απο-ακετυλάσες Ιστονών	(HDAC1, HDAC2, HDAC3)	
------------------------	-----------------------	--

Τροποποιήσεις μεμονωμένων γονιδίων

RRP22	Μειωμένη έκφραση	(269)
P21	Μειωμένη έκφραση	(270)

HOXA9	Αυξημένη έκφραση	(271)
Απορρύθμιση miRNAs		
Μειορρύθμιση ογκοκατασταλτικών miRNAs		
<i>miRNA</i>	<i>Γονίδιο - στόχος</i>	
miR-34a	c-Met, Notch	(273)
miR-146a	Notch	(274)
miR-7	EGFR	(275)
miR-128	Bmi-1	(276)
miR-195	E2F3, CCND3	(277)
Πλειορρύθμιση ογκογενετικών miRNAs		
miR-21	RECK, TIMP3	(278)
miR-26a	pTEN, RB1	(279), (280)
miR-10b	Αναστολέας κυτταρικού κύκλου	(281)
miR-30e*	IκBa	(282)
miR-221/222	P27Kip1, PTPμ, PUMA	(283), (284), (285)

Πίνακας 1.3: Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις που απαντώνται στο ανθρώπινο γλοίωμα.

γ) Τα micro-RNAs

Τα micro-RNAs (mi-RNAs) είναι μη κωδικά, δίκλιωνα μόρια RNA τα οποία έχουν μήκος περίπου 21-23 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω πρόσδεσής τους στη μη κωδική περιοχή των mRNAs-στόχων που ονομάζεται 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) (286), (287). Τα mi-RNAs ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προωθώντας την αποδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων RNAs. Παρά το γεγονός ότι ποσοστό 3% των γονιδίων του ανθρώπου κωδικοποιεί mi-RNAs, τα ίδια ρυθμίζουν περίπου το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την σημασία τους σε ποικίλα ρυθμιστικά μονοπάτια που αφορούν σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων (288), (289).

Πρόσφατες έρευνες επικεντρώνονται στον ρόλο που διαδραματίζουν τα mi-RNAs σε διάφορες νόσους με σημαντικότερη εκείνη του καρκίνου όπου έχει παρατηρηθεί ότι λειτουργούν τόσο ως ογκοκατασταλτικά μόρια, όσο και ως ογκογονίδια (290), (291). Επιπλέον, μια συνολική υποέκφραση των mi-RNAs παρατηρείται σε πολλούς καρκινικούς ιστούς, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς (292), (293), (294). Η συνολική απορρύθμιση του προτύπου έκφρασης των mi-RNAs που παρατηρείται σε πολλές μορφές καρκίνου μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως: α) επιγενετικές τροποποιήσεις εντός των ρυθμιστικών περιοχών των mi-RNAs, β) γενετικές αλλαγές που προκύπτουν από μεταλλάξεις, γενωμικές απαλοιφές (genomic deletions) ή γονιδιακές ενισχύσεις (gene amplifications) που μπορεί να επηρεάσουν την ωρίμανση των mi-RNAs ή/και τις αλληλεπιδράσεις τους με τα mRNA-στόχους (295), (296), (297).

Στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα μόρια mi-RNAs τα οποία παρουσιάζουν ένα διαφοροποιημένο πρότυπο έκφρασης συγκρινόμενο με εκείνο που χαρακτηρίζει τους φυσιολογικούς ιστούς του εγκεφάλου (279), (281), (298). Αν και ο ακριβής ρόλος των mi-RNAs στην ρύθμιση των πολύπλοκων σηματοδοτικών δικτύων που εμπλέκονται στο ανθρώπινο γλοίωμα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, εντούτοις ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων έχει καταδείξει μεμονωμένα τέτοια μόρια να εμπλέκονται στην γένεση και ανάπτυξη των γλοιοματιτικών όγκων. Για παράδειγμα, τα miRNAs που υποεκφράζονται στο ανθρώπινο γλοίωμα λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά μόρια, αφού

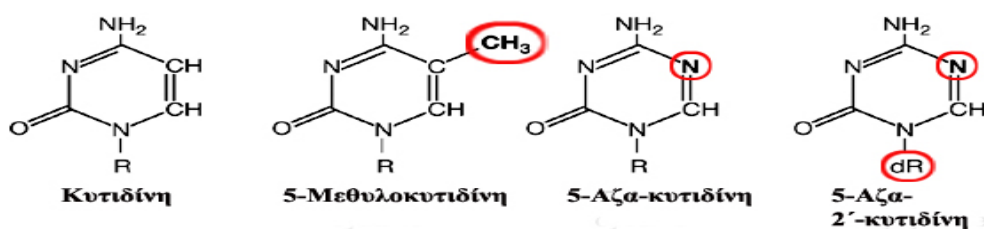
στοχεύουν τα ογκογονίδια c-Met (273), Notch (274), Bmi1 (281), EGFR (275), καθώς και μόρια του κυτταρικού κύκλου (277). Στον αντίποδα, μόρια miRNA που εμφανίζουν ενισχυμένη έκφραση στο ανθρώπινο γλοιώμα λειτουργούν ως ογκογονίδια όπως για παράδειγμα το miR-21 που προωθεί την κυτταρική διήθηση μέσω αναστολής των ρυθμιστικών πρωτεϊνών των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), το miR-26a που στοχοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN (Phosphatase and tensin homolog), τα miR-10b και miR-221 που στοχοποιούν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου και το miR-30e* που καταστέλλει την πρωτεΐνη IκBa (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) (299), (278), (280), (282), (283), (284), (285).

1.10.1 Επιγενετική θεραπεία του γλοιώματος

Μια νέα προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου έρχεται με τη μορφή της επιγενετικής θεραπείας. Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση ενώσεων ή μορίων που ανατρέπουν τις επιγενετικές σηματοδοτήσεις εκτροπών που απαντώνται στα καρκινικά κύτταρα (300). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι επιγενετικές εκτροπές στον καρκίνο επηρεάζουν πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται σε ποικίλες θεμελιώδεις διεργασίες του κυττάρου όπως είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση, η κυτταρική διήθηση και μετάσταση. Σε συμφωνία με την λειτουργική ετερογένεια που χαρακτηρίζει τις επιγενετικές μεταβολές, τα επιγενετικά φάρμακα παρουσιάζουν παρόμοια πλειοτροπική δράση που στοχεύει σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην βιολογία του καρκινικού κυττάρου. Μεταξύ των πιο διαδεδομένων επιγενετικών φαρμάκων που εφαρμόζονται στη θεραπεία του καρκίνου είναι οι αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA και οι αναστολείς των από-ακετυλασών των ιστονών.

α) Αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA

Σε αυτή την κατηγορία επιγενετικών φαρμάκων ανήκουν οι αναστολείς των DNMTs, **5-αζακυτιδίνη (AZA)** και **5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη (DAC)**. Και οι δύο αυτοί παράγοντες αποτελούν νουκλεοσιδικά ανάλογα τα οποία φέρουν έναν τροποποιημένο δακτύλιο κυτοσίνης, προσαρτημένο σε ένα σάκχαρο ριβόζης (AZA) ή ένα σάκχαρο δεοξυριβόζης (DAC) (εικόνα 1.19). Η 5-αζακυτιδίνη είναι ο πρώτος νουκλεοσιδικός υπομεθυλιωτικός παράγοντας που εγκρίθηκε από την Αμερικάνικη Υπηρεσία Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), για την θεραπεία των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Ομοίως, και η 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη έχει φανεί αποτελεσματική σε κακοήθειες της μυελοειδούς σειράς όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία, η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και η χρόνια μυελογενής λευχαιμία. Την δεκαετία του 1980 έγινε γνωστή η υπομεθυλιωτική δράση αυτών των ουσιών που έπεται της ενσωμάτωσής τους στο DNA των μιτωτικά ενεργών καρκινικών κυττάρων (301), (302).



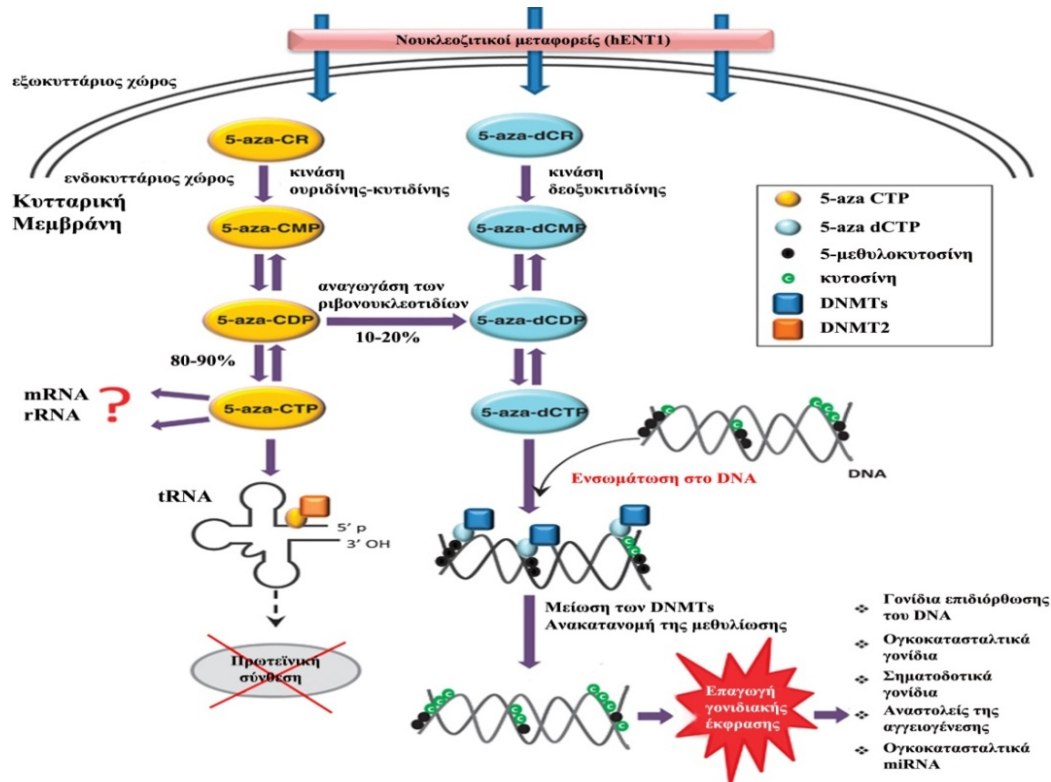
Εικόνα 1.19: Η χημική δομή της κυτιδίνης και των αναλόγων της, 5-μεθυλοκυτιδίνη, 5-Αζα-κυτιδίνη (AZA), 5-Αζα-2'-κυτιδίνη (DAC). dR: δεοξυριβόζη, R: ριβόζη

Οι αναστολείς της μεθυλίωσης έχουν εφαρμοστεί πειραματικά και στην θεραπεία του ανθρώπινου γλοιώματος όπου έχουν επιδείξει υποσχόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η DAC πυροδοτεί την κυτταρική απόπτωση σε ανθρώπινες γλοιοματικές κυτταρικές σειρές, μέσω επαγωγής της έκφρασης αποπτωτικών πρωτεϊνών οι οποίες υπο-εκφράζονται στα γλοιώματα με υψηλό βαθμό κακοήθειας (303). Επιπλέον, επάγει την έκφραση των ενδογενών miR-124 και miR-137 τα οποία αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των γλοιοματικών κυττάρων και εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των ανθεκτικών στη θεραπεία καρκινικών βλαστικών κυττάρων, καθιστώντας πιο αποτελεσματική την θεραπευτική αντιμετώπιση του όγκου (304).

Μόλις οι AZA και DAC μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου μετατρέπονται στις μεταβολικά ενεργές μορφές τους μέσω φωσφορλίωσης που καταλύεται από τα ένζυμα κινάση δεοξυκυτιδίνης και κινάση ουριδίνης-κυτιδίνης, αντίστοιχα. Επειδή η DAC περιέχει δεοξυριβόζη, ενσωματώνεται απευθείας στο DNA, ενώ μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 10-20% της AZA μετατρέπεται σε δεοξυριβονουκλεοτίδιο μέσω της αναγωγής των ριβονουκλεοτιδίων, και προσδένεται στο DNA (εικόνα 1.19). Το μεγαλύτερο ποσοστό, 80-90%, της AZA ενσωματώνεται απευθείας στο RNA (305), (306).

Μόλις τα αζα-νουκλεοτίδια ενσωματωθούν στο DNA, οι DNMT πρωτεΐνες προσδένονται μη-αντιστρεπτά στο 6'-άτομο άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης προκειμένου να επιτελέσουν την μεταφορά της μέθυλο-ομάδας στη συγκεκριμένη θέση. Εξαιτίας της ύπαρξης όμως ενός ατόμου αζώτου στη θέση 5 του τροποποιημένου αζα-νουκλεοτιδικού δακτυλίου, ο ομοιοπολικός δεσμός που δημιουργείται ανάμεσα στην πρωτεΐνη DNMT και το DNA δεν μπορεί να διασπαστεί, με αποτέλεσμα η DNMT να "παγιδεύεται" στο DNA και εν τέλει να οδηγείται σε πρωτεοσωμική αποδόμηση (307), (308). Συνεπώς τα φάρμακα αυτά προκαλούν σταδιακή εξάλειψη των ενδοκυττάρων επιπέδων των μεθυλοτρανσερασών και ως εκ τούτου επιφέρουν παθητική απομεθυλίωση στο DNA των θυγατρικών κυττάρων ύστερα από κάθε κύκλο αντιγραφή του, και τελικά μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων. Πέραν της αναστολής των DNMTs, η AZA ενσωματώνεται σε μόρια tRNA του κυττάρου όπου προκαλεί την αποσυγκρότηση των ριβοσωμικών υπομονάδων παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μετάφραση ογκογόνων πρωτεϊνών (309), (310) (εικόνα 1.20).

Η υπομεθυλιωτική δράση των AZA και DAC είναι πιο ισχυρή όταν εφαρμόζονται μικρές συγκεντρώσεις των εν λόγω φαρμάκων, καθώς αυξημένες συγκεντρώσεις τους προκαλούν έντονα φαινόμενα κυτταροτοξικότητας μέσω δημιουργίας δίκλωνων ρηγμάτων στο DNA που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση (311). Επιπλέον, απαιτείται η ενεργοποίηση της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου προκειμένου τα φάρμακα να ενσωματωθούν επιλεκτικά και αποτελεσματικά στο DNA των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων και ως εκ τούτου να περιοριστεί η υπομεθυλίωση εκείνων των κυττάρων του οργανισμού που υπόκεινται σε φυσιολογικό έλεγχο του κυτταρικού τους κύκλου.



Εικόνα 1.20: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των 5-Αζανουκλεοτιδίων. Τροποποιημένη από (310). Οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων ENT-1 (*Equilibrative Nucleoside Transporter 1, ENT-1*) επιτελούν την ενδοκυττάρια μεταφορά των AZA (5-aza-CR) και DAC (5-aza-Dcr) οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται από τα ένζυμα κινάση ουριδίνης-κυτιδίνης και κινάση δεοξυκυτιδίνης σε μονοφωσφορική 5-αζα-κυτιδίνη (5-aza-CMP) και μονοφωσφορική 5-αζα-2' δεοξυκυτιδίνη, αντίστοιχα (5-aza-dCMP). Ένα ποσοστό της τάξης του 10-20% της διφωσφορικής 5-αζα-κυτιδίνης (5-aza-CDP) μετατρέπεται σε διφωσφορική 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-aza-dCDP), μία αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων. Το 100% της 5-aza-dCMP υπόκειται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις φωσφορύλιωσης προκειμένου να μετατραπεί στην τελική τριφωσφορική μορφή της, 5-aza-dCTP, η οποία πλέον μπορεί να ενσωματωθεί απευθείας στο DNA του κυττάρου. Η ενσωμάτωση των 5-αζανουκλεοτιδίων στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την μη-αντιστρεπτή σύνδεση των DNMTs σε αυτά οδηγώντας στην πρωτεοσωμική αποδόμηση των μεθυλοτρανσφερασών. Η μείωση των ενδοκυττάριων επιπέδων των DNMTs οδηγεί σε σταδιακή και παθητική απομεθυλίωση του DNA των θυγατρικών κυττάρων ύστερα από κάθε κύκλο αντιγραφής του γενωμάτός τους, και τελικά σε επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. Εικάζεται ότι το υπόλοιπο 80-90% της AZA ενσωματώνεται σε μόρια tRNA όπου δύναται να προσδέσει μη-αντιστρεπτά και να “παγιδεύσει” την πρωτεΐνη μεθυλοτρανσφεράση 2 (DNMT2). Δεν έχει διαλευκανθεί ωστόσο αν η AZA ενσωματώνεται σε μόρια mRNA και rRNA και το κατά πόσο η δράση της στα μόρια tRNA οδηγεί σε αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Χάρη στην ιδιότητα του φαρμάκου να ενσωματώνεται τόσο στο DNA, όσο και στο RNA αυξάνεται ο κίνδυνος παρενεργειών σε φυσιολογικά εφησυχάζοντα και πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του οργανισμού. Ωστόσο οι AZA και DAC υδρολύονται γρήγορα σε υδατικά διαλύματα και υπόκεινται σε απαμίνωση από απαμινάσες των κυτοσινών (312). Η αστάθεια, συνεπώς, αυτών των ουσιών αποτελεί μία πρόκληση για την κλινική τους εφαρμογή.

β) Αναστολείς των από-ακετυλασών των ιστονών

Η ακετυλίωση των ιστονών βασίζεται στη δυναμική ισορροπία μεταξύ της δράσης των ιστονικών ακετυλο-τρανσφερασών (*Histone Acetyl Transferases, HATs*) και των από-ακετυλασών των ιστονών (*Histone DeAcetyases, HDACs*). Οι HATs μεταφέρουν μία ακετυλο-ομάδα από το ακετυλο-συνένζυμο A (acetylo-CoA) στην ε-αμινο-ομάδα των

καταλοίπων λυσίνης των ιστονικών πρωτεϊνών οδηγώντας στην από-συμπύκνωση της χρωματίνης και σε καλύτερη προσβασιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτή.

Η αντίστροφη αντίδραση περιλαμβάνει την από-ακετυλίωση των ακετυλιωμένων λυσινών των ιστονών, που διαμεσολαβείται από τις HDACs, και ενισχύει την συμπύκνωση της χρωματίνης (313). Οι αναστολείς των ιστονικών από-ακετυλασών (**H**istone **D**e**A**Cetylase **I**nhibitors, **HDAC** inhibitors) χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: 1) λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, 2) υδροξυαμικά οξέα, 3) κυκλικά τετραπεπίδια και 4) βενζολαμίδια. Καθεμία από αυτές τις κατηγορίες περιλαμβάνει μόρια με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, τελικός στόχος των οποίων είναι η αναστολή της δράσης των ενδοκυττάρων από-ακετυλασών που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ακετυλίωσης των ιστονών.

Το VPA επιδεικνύει πιθανή αντικαρκινική δράση σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε λευχαιμικά κύτταρα καθώς και σε κύτταρα γλοιώματος και νευροβλαστώματος (314), (315), (316), (317), (318), (319). Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο τα φάρμακα αυτά διαμεσολαβούν την αντικαρκινική τους δράση, δεν είναι απολύτως ξεκάθαρος μέχρι σήμερα, παρότι έχουν διατυπωθεί αρκετά μοντέλα που επιχειρούν να τον περιγράψουν. Ένα από αυτά τα μοντέλα προτείνει ότι η επαγωγή της ιστονικής ακετυλίωσης ενεργοποιεί ογκοκατασταλτικά γονίδια και καταστέλλει ογκογονίδια. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι τα επιγενετικά αυτά φάρμακα επάγουν αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, όπως είναι η πρωτεΐνη p21, οι οποίοι καθυλώνουν τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G1 και G2 προκαλώντας διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων και απώλεια του νεοπλασματικού φαινοτύπου (318). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι αναστολείς των HDAC ενεργοποιούν υποδοχείς θανάτου (death receptors) οι οποίοι με τη σειρά τους πυροδοτούν τον αποπτωτικό μηχανισμό (320), (321). Στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού μέσω επαγόμενης ιστονικής ακετυλίωσης, εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες μεταξύ των οποίων ο πυρηνικός παράγοντας κB (Nuclear Factor Kappa Beta, NF-κB) (322), η MAP-κινάση JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (323) και η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL2 (**B**-Cell **L**ymphoma **2**) (324). Επιπλέον, μπορούν να μεταβάλουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην αναστολή της αγγειογένεσης (325) και μετάστασης (326). Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των αναστολέων των HDAC προτείνει ότι η επαγόμενη υπερακετυλίωση των ιστονών προκαλεί γενωμική αστάθεια, η οποία καταλήγει σε ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου κατά τη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, διασφαλίζοντας ότι τα κύτταρα δεν θα εισέλθουν στη φάση της μίτωσης (327). Ακετυλίωση όμως μπορεί να υποστούν και μη ιστονικές πρωτεΐνες όπως για παράδειγμα η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (328) και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (329).

β i) Βαλπροϊκό Οξύ

Το βαλπροϊκό οξύ (Valproic Acid, VPA, 2-propylpentanoic acid) αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο αντισπασμωδικό φάρμακο και σταθεροποιητή διάθεσης και εφαρμόζεται στις κλινικές μεθόδους αντιμετώπισης διαφόρων νευρολογικών παθήσεων. Αρχικά συντέθηκε το 1882, αλλά εισήχθη στη κλινική πράξη μόλις το 1962 όταν και διαπιστώθηκε η αντιεπιληπτική του δράση (330). Έκτοτε το VPA εφαρμόζεται στη θεραπεία μίας σειράς νευρολογικών διαταραχών με κυριότερες εκείνες της επιληψίας και της διπολικής διαταραχής. Το VPA ανήκει στην κατηγορία των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας και εξαιτίας της απλής του δομής μπορεί και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο του ενός λεπτού ύστερα από την ενδοφλέβια χορήγησή του (331). Η αντι-επιληπτική δράση του βαλπροϊκού οξέος σχετίζεται με την επαγωγή

μηχανισμών που μεταβάλουν την διεγερσιμότητα των νευρώνων (332). Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την ενίσχυση της GABAεργικής δραστηριότητας (332), την αναστολή της διεγερτικής νευρο-διαβίβασης μέσω των NMDA υποδοχέων (υποδοχείς του N-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος) (333), (334) και τον αποκλεισμό των εξαρτώμενων από το δυναμικό, διαύλων Na^+ του νευρώνα κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων πυροδοτήσεων (335).

Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν το VPA ως έναν αποτελεσματικό παράγοντα στη θεραπεία της Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας, μίας αυτοσωμικής υπολειπόμενης νόσου, η οποία οφείλεται στην ομοζυγωτική απώλεια του γονιδίου SMN1 (Survival of Motor Neuron) και οδηγεί σταδιακά στον εκφυλισμό των κινητών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Η σφοδρότητα της ασθένειας σχετίζεται και με τα επίπεδα έκφρασης ενός δεύτερου γονιδίου, του SMN2, το οποίο κωδικοποιεί για το 10% περίπου της πρωτεΐνης SMN. Το VPA έχει βρεθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της λειτουργικής SMN πρωτεΐνης, μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου SMN2 (336), (337).

Επιπλέον, έχει προταθεί η θεραπευτική αξία του VPA και στην νόσο του Huntington, όπου διαπιστώθηκε σε πειραματικά μοντέλα της ασθένειας σε διαγονιδιακούς επίμυες, ότι μία συνδυαστική θεραπεία με VPA και λίθιο επιμηκύνει σημαντικά τον μέσο χρόνο ζωής των πειραματόζωων χωρίς την πρόκληση παρενεργειών στην συμπεριφορά και στην εγκεφαλική περιεκτικότητα της ντοπαμίνης (338).

Ένας συνεχώς αυξανόμενος όγκος δεδομένων αποδεικνύει την ικανότητα του συγκεκριμένου φαρμάκου να μεταβάλει τα επίπεδα έκφρασης πολλαπλών γονιδίων. Τις τελευταίες δεκαετίες πολλές μελέτες αναφέρονται στην αντικαρκινική δράση του VPA που έχει διαπιστωθεί πειραματικά σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (339) ενώ έχει αποδειχθεί σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα ότι φέρει και νευροπραστατευτικές ιδιότητες (335). Παρότι ο μοριακός μηχανισμός δράσης του VPA σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις δεν είναι απόλυτα κατανοητός, πρόσφατες έρευνες τον συνδέουν με την αναστολή των ενδοκυττάρων από-ακετυλασών (331), (340).

β ii) Τα βαλπροϊκό οξύ ως αναστολέας των ιστονικών από-ακετυλασών

Το VPA χημικά, αποτελεί ένα μικρό διακλαδισμένο λιπαρό οξύ που περιέχει οχτώ άτομα άνθρακα και το μοριακό του βάρος είναι 141.21 U. Το VPA είναι ισχυρά διαλυτό σε οργανικά οξέα, λιγότερο διαλυτό σε νερό και σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε κυτταρικό επίπεδο το VPA αλληλεπιδρά με αρκετές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων, οι HDACs (341), (342), τα T-τύπου ιοντικά κανάλια ασβεστίου (343), τους εξαρτώμενους από το δυναμικό, διαύλους ιόντων νατρίου (344), την αφυδρογονάση της ηλεκτρικής ημιαλδεΐδης (SSADH) (345), και την κινάση 3β της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK-3β) (346), (347).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει την ειδικότητα του VPA έναντι των διαφόρων υποτάξεων των HDACs. Έχει αποδειχθεί ότι το VPA αναστέλλει τις τάξης I, HDACs 1 και 3 ενώ διεγείρει την ουβικιτινίωση και ακολούθως την πρωτεοσωμική αποδόμηση της HDAC2 σε μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, της τάξης των millimolar. Επιπλέον, στην βιβλιογραφία αναφέρεται και αναστολή των HDACs 4, 5, 7 και 8 σε συγκεντρώσεις όμως που κυμαίνονται πάνω από το ασφαλές θεραπευτικό εύρος του φαρμάκου στο πλάσμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των HDAC 9 και 11 φαίνεται να αυξάνονται ύστερα από την χορήγηση VPA.

Ως συνέπεια της ανασταλτικής του δράσης έναντι των HDACs, το VPA προκαλεί υπερακετυλίωση των αμινο-τελικών ουρών των ιστονών H3 και H4 σε γλοιοματικές κυτταρικές σειρές. Η δράση του VPA επί των HDACs είναι αντιστρεπτή, καθώς οι ιστόνες επιστρέφουν στα πρότερα επίπεδα ακετυλίωσής τους, σε μόλις τρεις ώρες ύστερα από την

αφαίρεση του φαρμάκου. Ομοίως, το VPA επιφέρει υπερακετυλίωση και σε αρκετές μη-ιστονικές πρωτεΐνες όπως είναι για παράδειγμα η p53, όπως έχει αποδειχθεί σε κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος. Επιπλέον, το VPA μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση της δομής της χρωματίνης. Η χορήγηση VPA σε καρκινικά κύτταρα μαστού προκαλεί μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων διαφόρων πρωτεϊνών που ελέγχουν την δομή της χρωματίνης, μεταξύ των οποίων πρωτεΐνες της οικογένειας των SMC (Structural Maintenance of Chromatin), DNA-μεθυλοτρανσφεράσες και ετεροχρωματινικές πρωτεΐνες, προκαλώντας τελικά από-συμπύκνωση της χρωματίνης (347).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (HERVs) θεωρούνται LTR-ρεροτρανσποζόνια, ικανά να εισάγουν νέα αντίγραφα τους στο γένωμα μέσω ενός μηχανισμού RNA μεταγραφής, αντίστροφης μεταγραφής και ενσωμάτωσης. Αποτελούν περίπου 8% του ανθρώπινου γενώματος και δύνανται να επηρεάσουν την χρωμοσωμική ακεραιότητα όπως και την γονιδιακή έκφραση μετά την ρετρομετάθεσή τους. Έχουν συσχετιστεί με μεταλλαξιγόνο δράση, ενώ η ιστο-ειδική έκφραση ορισμένων HERVs έχει ενοχοποιηθεί για αρκετές χρόνιες ασθένειες στον άνθρωπο.

Τα ανθρώπινα γλοιώματα συνιστούν την μεγαλύτερη κατηγορία ενδοκρανιακών όγκων. Αποτελούν όγκους που επιδεικνύουν έντονη ετερογένεια σε πολλαπλά επίπεδα που αφορούν στην διαμόρφωση του φαινοτύπου, στην γενετική και επιγενετική τους σύσταση, στο δυναμικό πολλαπλασιασμού τους, καθώς και στο δυναμικό μεταναστευτικότητας, ογκογενετικότητας και ανθεκτικότητάς τους. Πολλές από αυτές τις ιδιότητες αποδίδονται στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells: CSCs).

Στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- Η εξέταση της ικανότητας ρετρομετάθεσης ενός ανασυνδιασμένου ρετροϊικού στοιχείου HERV-K10 σε ανθρώπινες γλοιωματικές κυτταρικές σειρές.
- Η διερεύνηση πιθανών επιπτώσεων των ρετρομεταθετικών γεγονότων σε μείζονα κυτταρικά φαινόμενα που απαντώνται σε ανθρώπινα γλοιώματα όπως είναι η φαινοτυπική ετερογένεια, το δυναμικό πολλαπλασιασμού, η ογκογενετικότητα και μεταστατικότητα.
- Η μελέτη της πιθανής κινητοποίησης των HERV-K10 και των επιπτώσεων αυτής από παράγοντες που προκαλούν επιγενετικές τροποποιήσεις σε ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα.
- Η μελέτη πιθανούς αναστολής της ρετρομετάθεσης HERV-K10 και των επιπτώσεων αυτής από αναστολείς των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών ή αλκυλιωτικούς παράγοντες σε ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Αναλώσιμα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αναλώσιμα των κάτωθι εταιρειών:

Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας: 10 cm, 60 mm, 35 mm, 6well, 24well, 96well και βακτηριακά τρυβλία: 10 cm, 35 mm (Cellstar®, Greiner Bio-one, Orange Scientific)

Πιπέτες Pasteur: Brand GMBH

Πιπέτες πλαστικές κυτταροκαλλιέργειας: (5 και 10 ml) Corning®

Φυγοκεντρικοί Σωλήνες UNIVERSAL: Greiner Bio-one

Φυγοκεντρικά Σωληνάκια (ependorfs): Cellstar®

Φιαλίδια 1,5 ml για φύλαξη κυττάρων σε δοχείο υγρού αζώτου: Greiner Bio-one

Φυγοκεντρικοί Σωλήνες 15 ml, 50 ml: Orange Scientific, Greiner Bio-one

Χημικά αντιδραστήρια: Sigma-Aldrich Fine Chemicals

2.1.2 Εξοπλισμός

Αυτόκαυστο: AES, Raypa. Ξηρός κλίβανος: Memmert. Υδατόλουτρο: JULABO 7A. Επιτραπέζια φυγόκεντρος: Hettich, Universal II, Μικροφυγόκεντρος: Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf, Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας: UV transilluminator, Ultra Violet Products Inc. Φωτογραφικές μηχανές: KODAK EDAS 290, Nikon CoolPix 990, Επωαστικός κλίβανος ευκαρυωτικών κυττάρων: Forma Scientific, CO2 Water-jacketed Incubator, HeraCell™, Εστία κάθετης νηματικής ροής: AURA 200 MAC, BioAir Instruments, HeraSafe™, Μικροσκόπιο φθορισμού: Nikon eclipse E400, Συνεστιακό μικροσκόπιο: Leica SP, Θερμοκυκλοποιητής: DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer. Φασματοφωτόμετρο: DU^R520, Beckman, Ηλεκτροφορητική συσκευή: Biorad mini protean tetracell.

2.1.3 Διαλύματα αντιδραστηρίων

Βαλπροϊκό οξύ: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλωμένη μορφή. Αρχικά, ζυγίζονται 0.1g σκόνης, τα οποία διαλύθηκαν σε 2ml dH₂O. Εν συνεχεία, το προκύπτον διάλυμα συγκέντρωσης 0.3M φιλτράρεται και προστίθεται απευθείας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε ποσότητες που αντιστοιχούν στις προς εξέταση συγκεντρώσεις 1-6mM (Sigma Aldrich).

5΄Αζα-δεοξυ-κυτιδίνη: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλωμένη μορφή. Αρχικά, ζυγίζονται 2mg σκόνης και διαλύονται σε 16.666 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το διάλυμα που προκύπτει (0.12mg/ml) υφίσταται περαιτέρω αραίωση σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 4mg/ml και προστίθεται απευθείας στην κυτταροκαλλιέργεια σε ποσότητες που αντιστοιχούν στις προς εξέταση συγκεντρώσεις 1-8 Μμ (Sigma Aldrich).

Ρετινοϊκό οξύ: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλωμένη μορφή. Η σκόνη διαλύεται σε καθαρή αιθανόλη και το προκύπτον διάλυμα συγκέντρωσης 100mM επαναδιαλύεται περαιτέρω σε πλήρες θρεπτικό υλικό, σε συγκέντρωση 100μM. Από το τελικό αυτό διάλυμα προστίθενται απευθείας στην κυτταροκαλλιέργεια οι κατάλληλες ποσότητες που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσει 1, 2, 4 και 8 μM.

Τεμοζολομίδη: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλωμένη μορφή. Αρχικά διαλύονται 25 mg της ένωσης σε 1 ml DMSO και το προκύπτον διάλυμα έχει συγκέντρωση 128,7 mM. Εν συνεχεία πραγματοποιούνται δύο επαναδιαλυτοποιήσεις σε πλήρες θρεπτικό μέσο μέχρι να προκύψει ένα τελικό διάλυμα συγκέντρωσης 200 μ M. Από αυτό προστίθενται απευθείας στην κυτταροκαλλιέργεια οι κατάλληλες ποσότητες που αντιστοιχούν σε 0.125, 0.25, 0.5 και 1 μ M (Sigma Aldrich).

Efavirenz: Η ένωση διατίθεται σε λυοφιλωμένη μορφή. Αρχικά διαλύονται 15 mg της ένωσης σε 1 ml DMSO και το προκύπτον διάλυμα έχει συγκέντρωση 47.5 mM. Από το προκύπτον διάλυμα προστίθεται απευθείας στην καλλιέργεια ποσότητα που αντιστοιχεί σε 15 μ M.

2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η *in vitro* καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικά κατεργασμένα πλαστικά σκεύη, στα οποία τα κύτταρα προσκολλώνται στη επιφάνειά τους, σχηματίζοντας κυτταρικό ταπήτιο, υπό συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές της φυσιολογικής ανάπτυξής τους. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις, τα κύτταρα αναπτύσσονται υπό στείρες συνθήκες σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Επίσης, όλοι οι απαραίτητοι χειρισμοί έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής (AURA 2000 MAC, BioAir Instruments). Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO₂ Water-jacketed Incubator) σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη σε 5% (v/v) CO₂, προκειμένου να διατηρείται το pH σταθερό. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με χρήση μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων (Olympus, IM).

2.2.1 Κυτταρικές σειρές

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στις κυτταρικές σειρές γλοιώματος ανθρώπου U-373 MG και U-87 MG.

2.2.1.1 U-373 MG: Πρόκειται για κύτταρα προερχόμενα από κακοήθη εγκεφαλικό όγκο ενός 61-χρονου Καυκάσιου ασθενούς στον οποίο είχε διαγνωστεί γλοιοβλάστωμα-αστροκύττωμα βαθμού III. Αναπτύσσονται προσκολλημένα στην επιφάνεια του σκεύους καλλιέργειας σχηματίζοντας μονοστοιβάδα (monolayer). Η μορφολογία των εν λόγω κυττάρων από τις διάφορες εταιρείες διάθεσής τους αναφέρεται ως πλειομορφική/επιθηλιακή. Τα κύτταρα U-373 MG είναι διπλοειδή καθώς φέρουν φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n=46$) και ογκογενετικά όταν εισάγονται σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς.

2.2.1.2 U-87 MG: Πρόκειται για κύτταρα απομονωθέντα από κακοήθη εγκεφαλικό όγκο 44-χρονης Καυκάσιας ασθενούς στην οποία διαγνώστηκε πολύμορφο γλοιβλάστωμα (γλοιοβλάστωμα/αστροκύττωμα βαθμού IV). Μορφολογικά χαρακτηρίζονται ως χαμηλής διαφοροποίησης επιθηλιακά κύτταρα. Αναπτύσσονται προσκολλημένα στην επιφάνεια του καλλιεργητικού σκεύους σχηματίζοντας μονοστοιβάδα. Κυτταρογενετικά έχουν χαρακτηριστεί ως υποδιπλοειδικά με τυπικό αριθμό 44 χρωμοσωμάτων στο 44% των κυττάρων. Είναι ογκογενετικά όταν εισαγονται σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς.

2.2.2 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

2.2.2.1 Θρεπτικά υλικά

Οι κυτταρικές σειρές U-373 MG και U-87 MG, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS. Σε αυτό προστέθηκαν επίσης 100 U αμπικιλίνη/ 100 μg στρεπτομυκίνη.

2.2.2.2 Διάλυμα έκπλυσης

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Το διάλυμα PBS έχει pH 7.2 και στερείται ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , για την καλύτερη λειτουργία του παγκρεατικού ενζύμου θρυψίνη. Η σύσταση του έχει ως εξής: 139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.44 mM KH_2PO_4 και 4.16 mM NaHCO_3 .

2.2.2.3 Διάλυμα θρυψίνης/EDTA

Για τη επίτευξη της διαδικασίας θρυψινοποίησης και αποκόλλησης των κυττάρων από το ταπήτιο των πλαστικών σκευών κυτταροκαλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης/EDTA (PAA) 0.05%/0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ελλειματικό σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Το χηλικό αντιδραστήριο EDTA έχει την ικανότητα να δεσμεύει δυσθενή κατιόντα (Ca^{2+} και Mg^{2+}) από τα κύτταρα, καθιστώντας τα ανίκανα να παραμένουν προσδεμένα στην επιφάνεια ανάπτυξής των. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συλλέγονται ως εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό. Το θρεπτικό υλικό αδρανοποιεί την δράση του ενζύμου. Η δράση της θρυψίνης είναι καταστρεπτική για τα κύτταρα όταν αυτά εκτεθούν για μεγάλη χρονική διάρκεια. Επίσης το pH του ενζύμου δεν πρέπει να είναι μικρότερο του 7, καθώς τέτοιες τιμές μειώνουν τη δραστηριότητά του, αλλά επιπλέον δεν πρέπει να ξεπερνά το 8, τιμές καταστρεπτικές για τα κύτταρα. Το διάλυμα θρυψίνης/EDTA διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C.

2.2.3 Αραίωση και επανακαλλιέργεια κυττάρων

Λόγω του συνεχούς εκθετικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αναγκαία συνθήκη για την συντήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας, είναι η αραίωση και επανακαλλιέργεια σε μικρότερη συγκέντρωση ή η μεταφορά των σε μεγαλύτερα σκεύη κυτταροκαλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας της φιάλης, τότε πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια των κυττάρων μέσω της διαδικασίας θρυψινοποίησης:

Το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα θρυψίνης και τα κύτταρα επωάζονται στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 3 λεπτά. (Για φιάλη 75cm χρησιμοποιείται 1ml, ενώ για φιάλη 25cm προστίθεται 0,5ml θρυψίνης). Ακολουθεί προσθήκη του ανάλογου όγκου θρεπτικού μέσου σύμφωνα με την επιθυμητή αραίωση και πραγματοποιείται καλή ανάδευση, ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία μονήρων κυττάρων και να αποφευχθεί η παραμονή συσσωμάτων στο εναιώρημα. Το κυτταρικό αιώρημα μεταφέρεται είτε σε σκεύος μεγαλύτερης επιφάνειας ανάπτυξης ή αραιώνεται σε μικρότερη συγκέντρωση κυττάρων και συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό μέχρι τον προκαθορισμένο τελικό όγκο.

2.2.4 Αποθήκευση κυττάρων (stock)

Για τη αποθήκευση των κυττάρων, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Καταρχήν αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS. Στην συνέχεια τα κύτταρα θρυψινοποιούνται με το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, όπως περιγράφεται ανωτέρω και ακολούθως επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωληνάριο τύπου universal και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1500xg για 3 λεπτά, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Sorvall® TC6). Μετά το πέρας των 3 λεπτών αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 720μl εμβρυϊκού ορού βοός (FCS). Τα κύτταρα μαζί με τον ορό μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάρια ψύξης (cryovials NUNC™), στα οποία προηγουμένως είχαν προστεθεί 80 μl διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Η αναλογία όγκων FCS/DMSO πρέπει να αντιστοιχεί σε 9:1, ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι $4-5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml υλικού αποθήκευσης. Το αντιοξειδωτικό αντιδραστήριο DMSO προστίθεται στο υλικό αποθήκευσης με σκοπό να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων νερού που θα οδηγούσε στην καταστροφή των κυττάρων. Τέλος, λόγω της ιδιότητας του DMSO να αυξάνει τη θερμοκρασία του ορού, τα σωληνάρια τοποθετούνται αρχικά στους -80°C για 4 ώρες και εν συνεχεία μεταφέρονται στο υγρό άζωτο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η σταδιακή ψύξη των κυττάρων και η αποθήκευση των για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

2.2.5 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων σε καλλιέργεια μέσω λιπιδίων (transfection)

Για την *in vitro* μελέτη των επιπτώσεων του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 γλοιωματικά κύτταρα U373- και U-87 MG, δημιουργήθηκαν σειρές κυττάρων U373/HERV-K10 και U87-HERV-K10 που εκφράζουν το ρετροτρανσποζόνιο HERV-K10. Χρησιμοποιείται η μέθοδος διαμόλυνσης μέσω λιπιδίων PolyFect® (Qiagen). Το αντιδραστήριο PolyFect σχηματίζει θετικά φορτισμένες συμπαγείς δομές με το πλασμιδιακό DNA, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η πρόσδεση τους σε αρνητικά φορτισμένους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και κατά συνέπεια η μεταφορά ακέραιου DNA στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η πορεία που ακολουθήθηκε για την δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών είναι η εξής:

15×10^4 κύτταρα από τις σειρές U-373 MG και U-87 MG αναπτύχθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 6 cm για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο. Την επόμενη ημέρα και αφού τα κύτταρα κατέλαβαν περίπου το 70% της επιφάνειας του τρυβλίου, διαμολύνθηκαν με τη χρήση λιποσωμάτων (Polyfect, Qiagen) με το προς μελέτη ανασυνδιασμένο πλασμίδιο.

2.5 μg πλασμιδιακού DNA αραιώθηκε σε θρεπτικό υλικό, το οποίο δεν περιείχε ορό και αντιβιοτικά, σε τελικό όγκο 150 μl και αναδεύθηκε με Vortex για 5 sec. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 15 μl από το αντιδραστήριο Polyfect, με επακόλουθη ανάδευση με Vortex για 10 sec και το διάλυμα αφέθηκε για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να σχηματιστούν τα σύμπλοκα DNA/PolyFect. Στη διάρκεια των δέκα λεπτών τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και προστέθηκαν 3 ml θρεπτικού υλικού, εμπλουτισμένου με 10% ορό. Μετά την πάροδο των 10 λεπτών, προστέθηκε στο διάλυμα διαμόλυνσης 1 ml θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 10% ορό ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Το προκύπτον διάλυμα προστέθηκε στάγδην στο τρυβλίο των κυττάρων.

Με το πέρας 48 ωρών από την διαμόλυνση, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλαστική φιάλη 75 cm. Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης ακολούθησε επιλογή των ανθεκτικών κυττάρων, με το κατάλληλο αντιβιοτικό, για κάθε πλασμίδιο.

Τα κύτταρα U373/HERV-K10 και U87/HERV-K10 επιλέχθηκαν παρουσία 50 μg/ml αντιβιοτικού υδρομυκίνη για περίπου 20 ημέρες. Οι παραχθείσες ανθεκτικές πλέον αποικίες απομονώθηκαν και μονήρεις κλώνοι μεταφέρθηκαν σε νέα πλαστική φιάλη.

2.2.6 Εξέταση κυττάρων για ικανότητα σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης (anchorage-independent foci)

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της ικανότητας σχηματισμού εστιών σε μέσο αγαρόζης και κατ' επέκταση την εξακρίβωση κυτταρικού μετασχηματισμού σε κλώνους είχε ως εξής:

Ως αρχικό βήμα, ετοιμάστηκαν 50 ml διαλύματος 1.6% αγαρόζης σε d.H₂O. Το διάλυμα αγαρόζης αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το ζεστό αποστειρωμένο διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται σε υδατόλουτρο των 48 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί (15-20 min). Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η διαδικασία πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες στην εστία κάθετης νηματικής ροής. Ακολούθως, 50 ml φιλτραρισμένου θρεπτικού μέσου 2 X DMEM [1.04 g DMEM, 38.5 ml H₂O, 0.5 ml 100X Pen/Strep, 10 ml FCS], εμπλουτισμένου με 20% FCS προθερμαίνεται στους 48 °C. Στην συνέχεια αναμειγνύονται 30 ml διαλύματος 1.6% αγαρόζης με 30 ml θρεπτικού μέσου 2 X DMEM, εμπλουτισμένου με 20% FCS. Το προκύπτον μείγμα συγκεντρώσεως 0.8% σε αγαρόζη, χρησιμοποιείται ως βασική στοιβάδα αγαρόζης και 2-3 ml αυτού μεταφέρονται σε πολυτριβλία των 6 φρεατίων (6-well plate). Το υπόλοιπο του μείγματος διατηρείται στο υδατόλουτρο των 48 °C.

Επόμενο βήμα αποτελεί η θρυψινοποίηση των προς εξέταση κυττάρων. Από κάθε εξεταστέα περίπτωση αναμειγνύονται 5.000 κύτταρα (σε φυσιολογικό θρεπτικό μέσο 1 X DMEM/10% FCS) με 0.8% διαλύματος αγαρόζης (σε dH₂O), σε ίσους όγκους. Τα κύτταρα στο προκύπτον 0.4% διάλυμα αγαρόζης, περιχύνονται στη βασική στοιβάδα αγαρόζης και αφήνονται να στερεοποιηθούν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα τρυβλία τοποθετούνται σε τάπερ μαζί με 2 ποτήρια ζέσεως αποστειρωμένου διαλύματος PBS, ώστε να αποφευχθεί η εκτεταμένη εξάτμιση του θρεπτικού υλικού και μεταφέρονται στον κλίβανο ανάπτυξης για χρονικό διάστημα 10-30 ημερών. Οι καλλιέργειες των κυττάρων θρέφονται ανά 3-4 ημέρες με 1 ml κανονικού 1 X DMEM/10% FCS. Οι καλλιέργειες παρατηρούνται σε μικροσκόπιο για πιθανή δημιουργία εστιών και το προκύπτον αποτέλεσμα φωτογραφείται με την βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) σε μεγέθυνση 20X και 40X.

2.2.7 Εξέταση ικανότητας επιβίωσης και σχηματισμού νευροσφαιρών υπό συνθήκες ελαττωμένης προσκόλλησης

Θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι U373-HERV-K10 και U87-HERV-K10 αφήνονται προς ανάπτυξη σε σκεύη μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης (βακτηριακά τρυβλία). Με την βοήθεια της ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) φωτογραφείται η ανάπτυξη των κυττάρων για πάροδο χρόνου 10 ημερών καλλιέργειας.

2.2.8 Εξέταση ικανότητας αυτοανανέωσης (self-renewal) νευροσφαιρών

Για να εξεταστεί η ικανότητα αυτοανανέωσης των σχηματιζόμενων νευροσφαιρών σε βακτηριακά τρυβλία, πραγματοποιείται η ακόλουθη διαδικασία:

Κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων αναπτύσσονται σε σκεύη μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. Στη συνέχεια οι επιπλεύουσες στο υπερκείμενο νευρόσφαιρες συλλέγονται και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal και ακολουθεί φυγοκέντρηση 1500 x g για 3 λεπτά. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται 2 φορές με 5 ml διαλύματος PBS, μετά από φυγοκέντρηση στις προαναφερθείσες συνθήκες. Το ίζημα επαναιωρείται σε 0.5 ml διαλύματος PBS και έπειτα στο εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται 0.5 ml θρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 λεπτά στους 37 °C και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά 1 ml κανονικού θρεπτικού υλικού DMEM. Πραγματοποιείται ανάδευση με πιπέτα και τα κύτταρα φυγοκεντρώνται,

όπως ανωτέρω. Τέλος, στο προκύπτον ίζημα προστίθεται 1 ml κανονικού θρεπτικού υλικού DMEM, υπό ανάδευση με πιπέτα, και τα μονήρη πλέον κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν σε βακτηριακά τρυβλία. Μετά το πέρας 30 λεπτών από την τοποθέτηση των κυττάρων στα βακτηριακά τρυβλία, τα μονήρη κύτταρα φωτογραφούνται με την βοήθεια της ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990), σε μεγέθυνση 40X. Η εξέλιξη πολλαπλασιασμού των κυττάρων παρακολουθείται σε μικροσκόπιο και πραγματοποιείται φωτογράφιση μετά από 2 και 5 ημέρες καλλιέργειας των.

2.3 Μικροσκοπία φθορισμού (*Fluorescence microscopy*)

Η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης του ρετρομεταθετού στοιχείου HERV-K10, βασίζεται στην έκφραση της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP, μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης. Για να επιτευχθεί η ανίχνευση των θετικών EGFP-φθορίζοντων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

Τα προς εξέταση κύτταρα ενοφθαλμίζονται και αφήνονται προς ανάπτυξη σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες σε τρυβλίο διαμέτρου 6 cm. Την επομένη και αφού καταλάβουν περίπου το 70% της διαθέσιμης επιφάνειας του τρυβλίου, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 3 ml διαλύματος PBS και ακολούθως μονιμοποιούνται με 3 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (w/v) 3.8% σε PBS για χρονικό διάστημα 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό μονιμοποίησης και τα κύτταρα επώάζονται για 5 λεπτά σε 3 ml διαλύματος σβέσης (*quenching*) 50 mM NH₄Cl σε PBS σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η παραφορμαλδεΐδη και να απομακρυνθεί η περίσσειά της από το κυτταρικό ταπήτιο. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται με 3 ml διαλύματος PBS. Οι καλυπτρίδες, πάνω στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα, μεταφέρονται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες, με τη χρήση διαλύματος επικάλυψης και παρεμπόδισης αποχρωματισμού DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation)

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε UV μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon eclipse E400) με λάμπα υψηλής πίεσης (HBO 100 W) και φίλτρο FITC (530 nm μέγιστο διέγερσης) και φωτογραφήθηκαν με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990) σε μεγέθυνση 400X.

2.4 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (CIM-PLATES), τα οποία χωρίζονται σε 2 υποθαλάμους. Στον πάτο του επάνω υποθαλάμου βρίσκεται μεμβράνη PET (polyethyleneterephthalate) με μικροπόρους, η οποία φέρει μικροηλεκτρόδια ενσωματωμένα στην κάτω πλευρά της. Όσα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύσουν διαπερνούν τους μικροπόρους της μεμβράνης και προσκολλώνται στην κάτω επιφάνειά της αυξάνοντας την ηλεκτρική αντίσταση στους αισθητήρες των μικροηλεκτροδίων. Μέσω των ηλεκτροδίων το μηχάνημα καταγράφει ανά χρονική στιγμή την μετακίνηση των κυττάρων.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

Αρχικά προστέθηκαν 160 μl θρεπτικού υλικού με ορό στον κάτω υποθάλαμο του CIM plate. Στην συνέχεια αφού τοποθετήθηκε ο επάνω υποθάλαμος, προστέθηκαν 35μl θρεπτικού υλικού χωρίς ορό, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της μεμβράνης. Το CIM plate

αφέθηκε για μια ώρα στον κλίβανο επώασης και ακολούθως τοποθετήθηκε στο μηχάνημα ώστε να μηδενίσουμε το θόρυβο (background).

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η προετοιμασία των κυττάρων. Τα κύτταρα πριν θρυψινοποιηθούν αφέθηκαν για 2 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (serum starvation). Κατόπιν αφού προστέθηκαν 2.500 κύτταρα/100 μl σε κάθε well plate, τα κύτταρα αφέθηκαν να κολλήσουν για 30 λεπτά.

Τέλος, μετά το πέρας των 30 λεπτών, άρχισε η μέτρηση του μεταστατικού δυναμικού, αφού τοποθετήθηκε το CIM plate στον μηχάνημα, που βρίσκεται στον επωαστικό κλίβανο.

2.5 Κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης (growth curves) με την τεχνολογία RTCADP-XCelligence με την χρήση ειδικών πολυτρυβλίων (e-plates).

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (e-plates), τα οποία φέρουν μικροηλεκτρόδια ενσωματωμένα στην κάτω πλευρά τους. Μέσω των μικροηλεκτροδίων το μηχάνημα καταγράφει ανά χρονική στιγμή την κατάσταση των κυττάρων.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

Αρχικά προστέθηκαν 100 μl θρεπτικού υλικού σε συγκέντρωση ορού 10%, στο e-plate. Αυτό μεταφέρθηκε στο μηχάνημα και μηδενίστηκε ο θόρυβος (background). Ακολούθησε θρυψινοποίηση των κυττάρων, τα οποία μοιράστηκαν σε φυγοκεντρικά σωληνάρια και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 xg για 3 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 10% ορού αντίστοιχα. Ακολούθως, 2.000 κύτταρα/100 μl ανά περίπτωση συγκέντρωσης ορού προστίθενται σε κάθε well plate. Χρησιμοποιήσαμε: 1) κύτταρα μάρτυρες U-373 MG και 3 κλώνους U373-HERV-K10 Cl.17, 18 & 21 και 2) κύτταρα μάρτυρες U-87 MG και 3 κλώνους U87-HERV-K10 CL.1, 2 & 8. Τέλος, μετά το πέρας των 30 λεπτών το e-plate τοποθετήθηκε στο μηχάνημα που βρίσκεται στον επωαστικό κλίβανο ώστε να αρχίσει η μέτρηση για την κατασκευή καμπύλων ανάπτυξης.

2.6 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται τοποθετώντας 10 μl τρυψινοποιημένου κυτταρικού εναιωρήματος σε αντικειμενοφόρο Neubauer και με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

$$\text{-Συγκέντρωση (αριθμός κυττάρων/ml)} = \frac{\text{Αριθμός κυττάρων} \times 10^4}{\text{Αριθμός τετραγώνων}}$$

Στην περίπτωση που έχει πραγματοποιηθεί αραίωση του κυτταρικού εναιωρήματος που πρόκειται να μετρηθεί, τότε ισχύει ο παρακάτω τύπος:

$$\text{-Συγκέντρωση (αριθμός κυττάρων/ml)} = \frac{\text{Αριθμός κυττάρων} \times 10^4}{\text{Αριθμός τετραγώνων} \times \text{Αραίωση}}$$

π.χ: Για αραίωση 1:10, Αραίωση=0.1

Για αραίωση 1:100, Αραίωση=0.01

2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

2.7.1 Απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA για ανάλυση PCR

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση κυτταρικού εκχυλίσματος DNA έχει ως εξής: Κύτταρα, που πρόκειται να αναλυθούν με PCR μετρώνται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και 1.5×10^6 κυττάρων, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το θρεπτικό υλικό αναρροφάται και το ίζημα επαναιωρείται σε 4 ml PBS. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml PBS, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα Eppendorf και φυγοκεντρείται σε 1500xg για 3 λεπτά.

Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης [10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (v/v) ζελατίνη] και φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ήπια επαναιώρηση σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης [10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (v/v) ζελατίνη, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.45% (v/v) Nonidet P-40, 0.45% (v/v) Tween-20]. Το κυτταρικό εναιώρημα θερμαίνεται στους 80° C για 10 λεπτά και ακολούθως αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται πρωτεΐνάση K, σε τελική συγκέντρωση 0.4 μg/μl, και ακολουθεί ολονύχτια επώαση του δείγματος στους 55°C. Μετά την επώαση, το δείγμα θερμαίνεται για 15 λεπτά στους 95°C, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K και ακολούθως αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1600xg για 3 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Το κυτταρικό εκχύλισμα DNA διατηρείται στους 4°C, έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) αποτελεί μία δυναμική μέθοδο για την εκθετική ενίσχυση DNA αλληλουχιών. Η ενίσχυση αυτή επιτυγχάνεται μέσω διαδοχικών κύκλων *in vitro* διπλασιασμού με τη βοήθεια μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να προκύψουν από δίκλιωνα μόρια DNA όταν αυτά εκταθούν σε υψηλές θερμοκρασίες οπότε και αποδιατάσσονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA το οποίο ονομάζεται εναρκτήριο μόριο (primer) και συνδέεται στο εκμαγείο σηματοδοτώντας το σημείο εκκίνησης της σύνθεσης του DNA.

Τα βασικά στάδια μίας τυπικής PCR αντίδρασης είναι τα ακόλουθα:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation): Θέρμανση του μίγματος σε υψηλή θερμοκρασία προκειμένου να επιτευχθεί η αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA και να παραχθούν μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση
2. Υβριδίαση (annealing): Μείωση της θερμοκρασίας ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που εφαρμόζονται σε αυτό το στάδιο ποικίλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται.

3. Επέκταση (extension): Αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης προκειμένου η πολυμεράση να λάβει την μέγιστη τιμή ενεργότητας και να επιτελέσει την επιμήκυνση των εκκινητών. Η ακριβής τιμή της θερμοκρασίας εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας προς ενίσχυση σε συνδυασμό και με την ενεργότητα του ενζύμου.

4. Τέλος η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι όπως στο στάδιο 1, για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και την νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι και να αποτελέσουν με την σειρά τους τα εκμαγεία για την επόμενο γύρω σύνθεσης DNA. Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για περίπου 25-35 κύκλους. Ο χρόνος επέκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος σε σχέση με τους προηγούμενους για να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση να ολοκληρώσει την προέκταση όλων των προϊόντων.

Σε σωληνάριο eppendorf προστίθενται τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως παρατίθενται στον Πίνακα 2.1.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)</i>
DNA εκμαγείο	4 (~300 ng)
Πρόσθιος πριμοδότης GFP968 (0.5 μg/ μl) [5' GCACCATCTTCTTCAAGGACGAC-3']	0.5
Ανάστροφος πριμοδότης GFP1013 (0.5 μg/μl) [5'-TCTTTGCTCAGGGCGGACTG-3']	0.5
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (10X) [QIAGEN] [Tris-Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂	5
10 mM Μείγμα dNTPs	1
5U/μl Taq πολυμεράση [QIAGEN]	0.25
Απεσταγμένο H ₂ O	38.75
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	50

Πίνακας 2.1 : Στοιχειομετρία συστατικών μιας τοπικής αντίδρασης PCR.

Μετά την προσθήκη των συστατικών, στα σωληνάρια προστίθενται επιπλέον δύο σταγόνες παραφινέλαιου για την αποφυγή εξάτμισης κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή και θερμαίνονται για 15 λεπτά στους 94 °C για την πλήρη αποδιάταξη των μορίων DNA. Κατόπιν, ακολουθεί η κύρια αντίδραση με το παρακάτω θερμικό προφίλ:

<u>Στάδιο</u>	<u>Θερμοκρασία, Χρόνος</u>	<u>Κύκλοι/επαναλήψεις</u>
<i>Αποδιάταξη</i>	94°C για 30 sec	35
<i>Υβριδισμός</i>	61°C για 30 sec	
<i>Επιμήκυνση</i>	72°C για 2 min	
<i>Τελική Επιμήκυνση</i>	72°C για 10 min	1
<i>Διακοπή Αντίδρασης</i>	4°C επ'άριστον	1

Πίνακας 2.2 : Θερμικό προφίλ αντίδρασης PCR.

2.7.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση προϊόντων DNA της αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.2 % w/v. Στο διάλυμα αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0.4 µg/ml, ώστε να είναι δυνατή η μετέπειτα ανίχνευση των διαχωρισμένων ζωνών DNA σε ειδική συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Ως φορέας ηλεκτρονίων για τη δημιουργία τάσης χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα TBE [89 mM Tris-HCl, 89 mM βορικό οξύ και 2 mM EDTA].

Για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιούνται 18 µl από κάθε δείγμα και 2 µl διαλύματος χρωστικής ουσίας [βρωμοφαινόλη (0.4% w/v), κυανούν ξυλόλης (0.4% w/v) και φικόλη (25% w/v)]. Ως δείκτης των μοριακών μεγεθών των διαχωρισμένων ζωνών χρησιμοποιείται ο pBR322/HinI, ο οποίος προκύπτει μετά από πλήρη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση HinI του πλασμιδίου pBR322. Μετά την φόρτωση των δειγμάτων, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε τάση 40V. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης εκτίθεται σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου το προκύπτον αποτέλεσμα ελέγχεται και φωτογραφίζεται.

2.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA

2.8.1 Απομόνωση RNA

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε 2 φιάλες των 75cm² και αναπτύσσονται μέχρι να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια ανάπτυξης. Μετά από θρυψινοποίηση, 10⁷ κύτταρα συλλέγονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal και φυγοκεντρούνται στις 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 10 ml διαλύματος PBS και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις προαναφερθείσες συνθήκες. Από το σημείο αυτό ακολουθεί το πρωτόκολλο του *QIAamp RNA Blood Mini Kit* της *QIAGEN*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και το RNA εκλύεται σε τελικό όγκο 50 µl dd.H₂O ελεύθερου RNAάσης. Από το RNA που απομονώνεται, 15µl προστίθενται σε 985µl ddH₂O RNase free και φωτομετρούνται στα 260nm. Γνωρίζοντας ότι οπτική πυκνότητα ίση με 1 O.D. αντιστοιχεί σε 40µg RNA υπολογίζεται η περιεκτικότητα RNA σε µg/µl.

2.8.2 Αντίστροφη μεταγραφή - Παρασκευή cDNA

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο **Hemavision RT** της *DNA Technology A/S*, η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής προϋποθέτει την αραίωση 1µg RNA σε 10µl ddH₂O RNase free. Στον όγκο αυτό προστίθενται 4µl μίγματος εκκινητών (cDNA primer mix) και ακολουθεί επώαση τους 65°C για 5 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου, το δείγμα τοποθετείται στον πάγο και παρασκευάζεται το μίγμα σύνθεσης cDNA με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που φαίνονται στον Πίνακα 2.3:

Αριθμός αντιδράσεων	1	2	3	4	5	6
5x MMLV-RT buffer (μl)	5.5	11	16.5	22	27.5	33
100mM DTT (μl)	2.75	5.5	8.25	11	13.75	16.5
10mM dNTP Mix (μl)	2.75	5.5	8.25	11	13.75	16.5
MMLV-RT, 200U (μl)	1.1	2.2	3.3	4.4	5.5	6.6
Τελικός όγκος	<u>12.1</u>	<u>24.2</u>	<u>36.3</u>	<u>48.4</u>	<u>60.5</u>	<u>72.6</u>

Πίνακας 2.3

Από το μίγμα προστίθενται 11μl σε κάθε αντίδραση και έπεται επώαση στους 37° C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 25μl dH₂O για αραίωση του cDNA και τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 5 λεπτά για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

2.8.3 Αντιδράσεις RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης mRNA των γονιδίων Sox2 και Oct-4

Για την μέτρηση του ποσοστού της έκφρασης RNA των γονιδίων Sox2 και Oct-4 χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 8 ng cDNA ανά περίπτωση και πραγματοποιήθηκαν οι εξής αντιδράσεις RT-PCR:

Όνομα Πριμοδότη	Αλληλουχία	Θερμικό προφίλ
SOX 2-F	5' - ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC - 3'	94°C-30s, 61°C-30s, 72°C-2 min • 28 κύκλοι
SOX 2-R	5' - GTGGATGGGATTGGTGTTC - 3'	
OCT 4-F	5' - GAGAATTTGTTCTGCAGTGC - 3'	95°C-45s, 55°C-45s, 72°C-1 min • 28 κύκλοι
OCT 4-R	5' - GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG - 3'	
GAPDH-F	5' - CAGGAGCGAGACCCCACTAACAT - 3'	94°C-30s, 61°C-30s, 72°C-2 min • 28 κύκλοι
GAPDH-R	5' - GACACATTGGGGGTAGGAACACG - 3'	

Πίνακας 2.4 : Πριμοδότες και θερμικά προφίλ PCR αναλύσεων για τη μέτρηση της έκφρασης mRNA των γονιδίων Sox2, Oct-4 και GAPDH

Τέλος, τα προϊόντα κάθε αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιώντας 18 μl δείγματος, σε πηκτή αγαρόζης 1.2%.

2.9 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.9.1 Ανάλυση πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blotting)

Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό και πρωτεϊνών βάσει της ικανότητας των να συνδέονται σε ειδικά

αντισώματα. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος μπορεί να ανιχνευτεί από ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα (κυττάρων, ιστών ή ανασυνδιασμένων *in vitro* πρωτεϊνών), δίνοντας πληροφορίες για το μέγεθος της πρωτεΐνης (εν συγκρίσει με ένα δείκτη μοριακών βαρών σε μονάδες μέτρησης kDa) και επίσης για το ποσοστό έκφρασής της (συγκρινόμενη με το δείγμα του μάρτυρα). Σημαντικό ρόλο στην τεχνική αποτελεί η ποιότητα των αντισωμάτων και ο βαθμός ειδικότητάς των ως προς την πρωτεΐνη που μελετάται.

Τα βήματα που ακολουθούνται για την διεκπεραίωση της ανάλυσης είναι τα ακόλουθα:

2.9.1.1 Παρασκευή εκχυλίσματος ολικών πρωτεϊνών

Πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Αρχικά τα κύτταρα αναπτύχθηκαν έως ότου να καταλάβουν όλη την επιφάνεια δύο πλαστικών φιαλών των 75 cm². Ακολούθως θρυψινοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal και φυγοκεντρήθηκαν 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 4 ml PBS. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, όπως προηγουμένως. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 1ml PBS και μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 400xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 150 μl διαλύματος RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) δεοξυχολικό νάτριο, 0.1% (w/v) SDS] παρουσία 1 mM PMSF, 1 μg/ml πεψιστατίνης και 1 μg/ml λευπεπτίνης. Ακολούθησε επώαση του εναιωρήματος σε πάγο για 30 λεπτά, με αναδεύσεις ανά 5 λεπτά με τη χρήση Vortex. Κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η λύση των κυττάρων και η εκχύλιση των περισσότερων διαλυτών πρωτεϊνών τους. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 13000xg για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και συντηρείται στους -80°C.

2.9.1.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής Bradford, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). Το αντιδραστήριο βασίζεται στη χρωστική ουσία coomassie brilliant blue-G250 και η τεχνική στηρίζεται στην μέτρηση της διαφοράς μεταξύ του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 460nm στα 595 nm, αφού δεσμευθεί σε πρωτεΐνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τύπου eppendorf προστέθηκαν 795 μl απεσταγμένου νερού, 200 μl αντιδραστηρίου Bio-Rad και 3 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα μείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύτηκαν με χρήση Vortex. Ακολούθως μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (DU®520, Beckman) στα 595 nm.

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος υπολογίστηκε βάσει της οπτικής πυκνότητας κάθε δείγματος και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης αλβουμίνης βοός (BSA). Η συγκεκριμένη πρότυπη καμπύλη συσχετίζει την οπτική πυκνότητα ενός δείγματος με την πρωτεϊνική συγκέντρωση και έχει εξίσωση: $y=13.1x-0.21$, όπου y =συγκέντρωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και x =οπτική πυκνότητα δείγματος.

2.9.1.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες μέσω ηλεκτροφόρησης μιας διάστασης σε πηκτή δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, σε ηλεκτρικό πεδίο. Πρωτεΐνες μεγάλων μοριακών βαρών διαχωρίζονται σε πηκτές χαμηλής συγκεντρώσεως ακρυλαμιδίου, ενώ το αντίθετο ισχύει για τις μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, για τις οποίες χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις ακριλαμιδίου.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου που διακρίνονται σε δύο μέρη:

α) την πηκτή επιστοιβάξης (*stacking gel*), με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% [5% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED] και μεγάλο μέγεθος πόρων και

β). Την πηκτή διαχωρισμού (*resolving gel*), με τελική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 10% [10% μείγμα ακρυλαμιδίου, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.04% (v/v) TEMED] και μικρό μέγεθος πόρων.

Τα μείγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη TEMED (Sigma). Ο πολυμερισμός της πηκτής έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά. Πριν την ηλεκτροφόρηση, στα δείγματα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης [62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0.01% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης] και θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C. Ακολούθως, τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάθετα σε ηλεκτροφορητική συσκευή BioRad υπό τάση 100 Volt και 200mA για περίπου 1 ώρα σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης [25mM (w/v) Tris-HCl, 192mM (w/v) γλυκίνη, 0.1% (v/v) SDS]. Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται SDS, ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τα φορτία των ίδιων των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους, παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος. Το SDS προσδένεται στις πρωτεΐνες, μεταξύ μερικών αμινοξέων, και εξουδετερώνει τις διαφορές στα φορτία των πρωτεϊνών, εξασφαλίζοντας ότι οι πρωτεΐνες θα διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος τους και όχι βάσει του φορτίου τους.

2.9.1.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η διαδικασία υγρής μεταφοράς (*wet transfer*) των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς [25 mM (w/v) Tris, 192 mM (w/v) γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη]. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και 2 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού χρωματογραφίας (3MM Chr, Whatman), καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell), τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής. Ακολούθως, τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς κομμάτια τοποθετούνται στην συσκευή υγρής μεταφοράς με την εξής σειρά: (θετικός πόλος) 1 κομμάτι σπόγγου - 1 κομμάτι χαρτιού Whatman - μεμβράνη νιτροκυτταρίνης - πηκτή - 1 κομμάτι χαρτιού Whatman - 1 κομμάτι σπόγγου (αρνητικός πόλος).

Τα κομμάτια τοποθετούνται προσεκτικά απομακρύνοντας τις τυχόν φυσαλίδες, που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ τους και στη συνέχεια η συσκευή γεμίζεται με το διάλυμα μεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ολονύκτια σε σταθερή τάση 35 Volt στους 4°C.

Την επομένη και μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα μη λιπαρού γάλακτος 5% (w/v) σε PBS, για

τουλάχιστον 3 ώρες, με σκοπό να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης της μεμβράνης. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το ειδικό πρωτοταγές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε σε διάλυμα PBS, παρουσία 3% (w/v) μη λιπαρού γάλακτος, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C. Η χρησιμοποιούμενη αραίωση του αντισώματος στο διάλυμα και το χρονικό διάστημα της επώασης εξαρτώνται από την ικανότητα πρόσδεσης του αντισώματος στην προς εξέταση πρωτεΐνη, την ποσότητα της πρωτεΐνης στο κύτταρο καθώς επίσης και από την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στο εξεταζόμενο εκχύλισμα.

Ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μια, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτοταγούς αντισώματος. Έπεται επώαση της μεμβράνης με το δευτεροταγές αντίσωμα, για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Το δευτεροταγές αντίσωμα αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτοταγούς αντισώματος και προσδένεται σε αυτό. Επιπλέον φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραφάνου (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιούνται 2 πεντάλεπτες πλύσεις με PBS όπως προηγουμένως.

Τέλος, η μεμβράνη αφήνεται να αντιδράσει για 5 λεπτά με τα ειδικά αντιδραστήρια [SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)] της τεχνικής ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και ακολούθως ανιχνεύεται η προς εξέταση πρωτεΐνη σε ειδικό μηχάνημα (biograd).

Στον πίνακα 2.5 δίδονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσο-αποτύπωσης κατά Western (και έμμεσου ανοσοφθορισμού), καθώς και οι συνθήκες στις οποίες μεταχειρήστηκαν.

Αντίσωμα (κλώνος)	Ισότυπος	Αραίωση	Διάλυμα αραίωσης	Κατασκευάστρια εταιρεία
Nestin (10c2)	Anti-mouse	1:500	1% BSA	Santa Cruz
GFAP (GA-5)	Anti-mouse	1:10.000	5% NFM	Santa Cruz
β3 Tubulin (TU-20)	Anti-mouse	1:300	1% BSA	Santa Cruz
GAPDH (FL-335)	Anti-rabbit	1:1000	1% BSA	Santa Cruz
Sox-2 (A-5)	Anti-mouse	1:1000	1% BSA	Santa Cruz
Oct-3/4 (C-10)	Anti-mouse	1:1000	1% BSA	Santa Cruz
β-Actin (ACTBD11B7)	Anti-mouse	1:1000	1% BSA	Santa Cruz

Πίνακας 2.5: Αντισώματα και συνθήκες μεταχείρισής τους. BSA: Bovine Serum Albumin, NFM: Non-Fat Milk

2.9.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (*Indirect Immunofluorescence*)

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός αποτελεί εργαστηριακή τεχνική, για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό και τη σχετική ποσότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και δεσμεύονται ειδικά σε μια πρωτεΐνη και ακόλουθη πρόσδεση δεύτερων αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν και δεσμεύονται στα πρώτα. Τα δεύτερα αντισώματα φέρουν μια φθορίζουσα ομάδα που εκπέμπει σε ένα μήκος κύματος, δίνοντας την ικανότητα ανάλυσης μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (confocal microscopy) και επακόλουθο εντοπισμό της προς εξέταση πρωτεΐνης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται κατωτέρω:

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται και αφήνονται να αναπτυχθούν πάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 10 mm εντός τρυβλίου διαμέτρου 35 mm. Όταν τα κύτταρα καταλάβουν περίπου το 80-90% της διαθέσιμης επιφάνειας του τρυβλίου πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων με τον ακόλουθο τρόπο. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα, σε κάθε καλυπτρίδα, εκπλένονται τρεις φορές με 1 ml διαλύματος PBS. Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με την προσθήκη 1 ml φορμαλδεΰδης 3.7% (v/v) για χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Ακολούθως τα μονιμοποιημένα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με 1 ml διαλύματος PBS και στη συνέχεια αφήνονται για 10 λεπτά σε διάλυμα 0.5% blocking buffer [0.5% (v/v) Triton X-100, 0.22% (v/v) ζελατίνη δέρματος ιχθύος σε PBS], ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα των μεμβρανών και να διευκολυνθεί η είσοδος των αντισωμάτων στα κύτταρα. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε μια από τις προς εξέταση καλυπτρίδες 15μl από το πρωτοταγές αντίσωμα για μία ώρα, το οποίο θα αναγνωρίσει και θα δεσμευτεί με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Μετά, τα προσκολλημένα στις καλυπτρίδες κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με 1 ml διαλύματος 0,1% blocking buffer [0.1% (v/v) Triton X-100, 0.22% (v/v) ζελατίνη δέρματος ιχθύος σε PBS]. Την τελευταία φορά αφήνεται για 10 λεπτά και ακολούθως οι καλυπτρίδες επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα. Το δεύτερο αντίσωμα δεσμεύεται στο πρώτο αντίσωμα και φέρει την φθορίζουσα ομάδα βάσει της οποίας θα ανιχνευθεί η προς εξέταση πρωτεΐνη. Μετά τα πέρας της μίας ώρας πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με 1 ml διαλύματος PBS, εκ των οποίων η τελευταία πλύση αφήνεται για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά με 20 μl RNάση (1:10 σε διάλυμα PBS) και ακολούθως εκπλένονται δύο φορές με PBS. Στη συνέχεια, προκειμένου να σημανθούν οι πυρήνες των κυττάρων προστίθεται 1 ml διαλύματος Propidium Iodine (PI), σε αραιώση 1:2500 σε PBS, για 10 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλένονται πολύ καλά με διάλυμα PBS και οι καλυπτρίδες πάνω στις οποίες βρίσκονται, μεταφέρονται και τοποθετούνται με τη χρήση διαλύματος επικάθησης και παρεμπόδισης αποχρωματισμού (*antibleach*) σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (*confocal microscopy*).

Να σημειωθεί ότι οι αραιώσεις των αντισωμάτων, όπου ήταν απαραίτητο, πραγματοποιούνται σε διάλυμα 0,1% blocking buffer [0.1% (v/v) Triton X-100, 0.22% (v/v) ζελατίνη δέρματος ιχθύος σε PBS]. Στην περίπτωση διπλής σήμανσης έναντι δύο πρωτεϊνών στο ίδιο δείγμα, πραγματοποιείται το ίδιο πρωτόκολλο όπως αναγράφεται παραπάνω για την περίπτωση σήμανσης για μια πρωτεΐνη. Χρησιμοποιούνται αντίσωμα που προέρχονται από διαφορετικά ζώα, τα οποία αναμειγνύονται και επωάζονται ως κοκτέιλ (π.χ rabbit anti-A και mouse anti-B). Το ίδιο ισχύει και για τα δεύτερα αντισώματα (π.χ goat anti-rabbit συνδεδεμένο με FITC και goat anti-mouse συνδεδεμένο με Cy-5).

2.9.3 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια γρήγορη, ποσοτική και πολυπαραμετρική τεχνική, που βασίζεται στην ανάλυση κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει την μικροσκοπική ανάλυση κυττάρων με χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών και υποστρωμάτων. Για την μέτρηση των δειγμάτων, απαιτείται τα δείγματα να βρίσκονται υπό μορφή εναιωρήματος. Τα κύτταρα εστιάζονται υδροδυναμικά σε μια κεντρική ροή και εισέρχονται ένα-ένα από την κυψελίδα ροής και συνεπώς και από την προσπίπτουσα ακτινοβολία (laser). Κατά την ανάλυση των δειγμάτων οι φυσικές παράμετροι που

αξιοποιούνται είναι η σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και η παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία. Η ακτινοβολία που συνήθως προέρχεται από ένα laser, ως πηγή ενέργειας είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών, η οποία μετράται από το κυτταρόμετρο ροής ως εκπομπή φθορισμού (*Fluorescence Emission*) και καθορίζει την ένταση φθορισμού των κυττάρων. Ταυτόχρονα όμως καθώς προσπίπτει πάνω στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Η σκέδαση των κυττάρων εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, δίνοντας την δυνατότητα στο κυτταρόμετρο ροής να διαχωρίζει τον κυτταρικό πληθυσμό ενός δείγματος σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση (*Forward Scatter, FSC*), η οποία μετράται σε μικρή γωνία 1-19° και καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων και την πλευρική σκέδαση (*Side Scatter, SSC*), που μετράται στις 90° και καθορίζει την κοκκίωσή των.

Ο συνδυασμός σκεδασμού και φθορισμού του φωτός παίρνεται από διάφορους ανιχνευτές. Η ανάλυση διακυμάνσεων φωτεινότητας σε κάθε ανιχνευτή είναι δυνατόν να δώσει διάφορους τύπους πληροφοριών για τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου μορίου. Επιπλέον μέσω λογισμικού μπορεί να απομονωθεί ηλεκτρονικά ο πληθυσμός ενδιαφέροντος εφαρμόζοντας γύρω από αυτόν μια περιφραγή (*gate*).

2.9.3.1 Μέτρηση ποσοστού ρετρομετάθεσης μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS)

Η ικανότητα της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής να μετρά την ένταση φθορισμού ενός κυτταρικού δείγματος, μας έδωσε την δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε τα γεγονότα ρετρομετάθεσης ανά κυτταρικό δείγμα στα διαμολυσμένα με το ανασυνδισμένο ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10, αφού το τελευταίο είναι σημασμένο με την ειδική κασέτα ανίχνευσης EGFP.

Η πειραματική πορεία ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της κυτταρομετρίας ροής έχει ως εξής: οι προς εξέταση κλώνοι, μετά από επιλογή με το κατάλληλο αντιβιοτικό, αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας απουσία του αντιβιοτικού για 3 ημέρες. Ακολούθως, τα προς μελέτη κύτταρα καθώς και τα κύτταρα-μάρτυρες U373- ή U-87 MG, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού RPMI και φυγοκεντρώνται 1500xg για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κυτταρικά ιζήματα, εκπλένονται με 100 όγκους διαλύματος PBS και φυγοκεντρώνται όπως προηγουμένως. Τέλος επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος PBS και μεταφέρονται σε σωληνάρια πολυστυρενίου των 5 ml (Becton Dickinson), προκειμένου να αναλυθούν στο κυτταρόμετρο ροής. Τα κύτταρα HC11 χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας εκτίμησης του αυτοφθορισμού (*background fluorescence*).

Τα κατώφλια της έντασης φθορισμού, ορίζονται βάσει της κατανομής της έντασης φθορισμού του μάρτυρα, τέτοια ώστε το 99.60% των κυττάρων να λαμβάνονται ως αρνητικά και το 0.40% ως λανθασμένα θετικά. Κύτταρα των οποίων η ένταση φθορισμού είναι μετατοπισμένη πέρα από τις τιμές αυτές θεωρούνται θετικά σε ρετρομετάθεση. Το καθαρό ποσοστό των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων υπολογίζεται αφαιρώντας από το ποσοστό αυτών, το ποσοστό των λανθασμένα θετικών κυττάρων (0.40%), βάσει του μάρτυρα. Οι κατανομές φθορισμού απεικονίζονται ως ιστογράμματα φθορισμού και πραγματοποιείται επικάλυψη (*overlay*) μεταξύ του ιστογράμματος του δείγματος ως προς αυτό του μάρτυρα.

2.9.3.2 Ανίχνευση επιφανειακών δεικτών μέσω άμεσου ανοσοφθορισμού των και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής

Αρχικά τα κύτταρα μάρτυρες U373- ή U-87 MG και οι προς μελέτη διαμολυσμένοι κλώνοι θρυψινοποιούνται. Με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου Neubauer, μετρούνται

2×10^6 κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 5 ml θρεπτικού υλικού DMEM και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση $1.500 \times g$ και στη συνέχεια αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα εκπλένονται με 5 ml PBS. Έπεται φυγοκέντρηση, όπως και προηγουμένως και το προκύπτον ίζημα επαναιωρείται σε 5 ml διαλύματος cell staining buffer (Biolegend), με σκοπό να παρεμποδιστούν όλοι οι Fc υποδοχείς και να μειωθούν οι μη ειδικές δεσμεύσεις. Ακολούθως, τα κύτταρα από κάθε δείγμα διαμοιράζονται σε 4 σωληνάρια πολυστυρενίου των 5 ml (Becton Dickinson), ώστε σε κάθε ένα να προκύπτουν 0.5×10^6 κύτταρα. Σε κάθε σωληνάριο, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος cell staining buffer, έως ότου ο τελικός όγκος να φτάνει τα 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, σύμφωνα με τις προαναφερθείσες συνθήκες. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 100 μ l διαλύματος cell staining buffer. Σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας, ποσότητα $< 0.2 \mu g$ αντισώματος είναι αρκετή για σήμανση 10^6 κυττάρων σε τελικό όγκο 100 μ l. Χρησιμοποιήσαμε 0.5 μ l αντισώματος, που αντιστοιχεί σε 0.1 μg ανά 0.5×10^6 κύτταρα σε τελικό όγκο 100 μ l. Τα κύτταρα επώάζονται για 15-20 λεπτά σε πάγο στο σκοτάδι. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις προσθέτοντας σε κάθε δείγμα 2 ml διαλύματος cell staining buffer και επακόλουθη φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 3 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και να ξεπλυθούν τα κύτταρα. Τέλος, το ίζημα των κυττάρων κάθε δείγματος επαναιωρείται σε 500-1000 μ l διαλύματος cell staining buffer και τα δείγματα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.

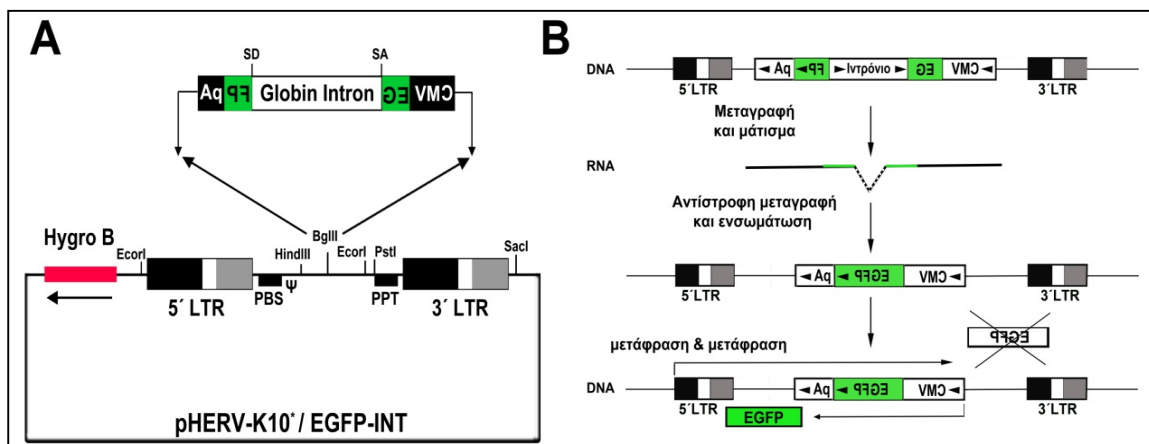
2.9.3.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Αρχικά, περίπου 1×10^6 κύτταρα δειγμάτων μάρτυρα και ελέγχου που αντιστοιχούν στους διαμολυσμένους με το ρετροτρανσποζόνιο κλώνους (U373/HERV-K10 και U87/HERV-K10), θρυψινοποιούνται και συλλέγονται. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 5 ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Universal. Ακολουθεί φυγοκέντρηση $1.500 \times g$ και ακολούθως το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλένονται με 2 ml PBS. Έπεται φυγοκέντρηση, όπως και προηγουμένως και το προκύπτον κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 500 μ l διαλύματος PI (Propidium Iodide) 50 $\mu g/ml$. Το διάλυμα αυτό έχει προκύψει από διάλυση σκόνης Ιωδιούχου Προπιδίου (Santa Cruz) σε υδατικό διάλυμα 0.1% Sodium Acetate, 0.1% TritonX-100. Ακολουθεί επώαση 20 λεπτών στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η διαμόλυνση γλοιοματικών κυττάρων U-373 MG και U-87 MG με ένα ανασυνδιασμένο στοιχείο HERV-K10 παράγει γεγονότα ρετρομετάθεσης

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει κατασκευαστεί ένα ανασυνδυασμένο σημασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10, προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Η κασέτα δομικά αποτελείται από το γονίδιο EGFP, του οποίου η έκφραση (Εικόνα.2.1) οδηγείται από τον υποκινητή CMV και διακόπτεται από το γ-ιντρόνιο της σφαιρίνης, το οποίο έχει αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς αυτόν (348). Πριν την πραγματοποίηση ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης, τα μετάγραφα της EGFP πρωτεΐνης από τον υποκινητή CMV, περιέχουν το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης σε αντίθετη μεταγραφική φορά, με αποτέλεσμα να μην μπορεί παραχθεί λειτουργική EGFP πρωτεΐνη. Αντιθέτως, κύτταρα εκφράζουν τη πρωτεΐνη μόνο: όταν μετά την μεταγραφή του, το μετάγραφο του HERV-K10 υφίσταται μάτισμα (*splicing*) (αποκοπή του ιντρονίου της γ-σφαιρίνης), αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωσή του σε μια νέα θέση στο γένωμα, που προσομοιάζει την διαδικασία ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης. Επιπλέον, η κατασκευή του pHERV-K10*/EGFP-INT βασίστηκε σε κλωνοποιημένες αλληλουχίες των 5'LTR και 3'LTR του αρχικού στοιχείου HERV-K10 που παραχωρήθηκε στο εργαστήριό μας (25). Στην συγκεκριμένη κατασκευή περιλαμβάνονται ακέραια τα βασικά στοιχεία του αρχικού ρετροϊκού στοιχείου που είναι απαραίτητα για την μετάθεσή του, όπως η πριμοδοτική θέση πρόσδεσης PBS, το σήμα πακεταρίσματος Ψ και η πολυουρινική περιοχή PPT.

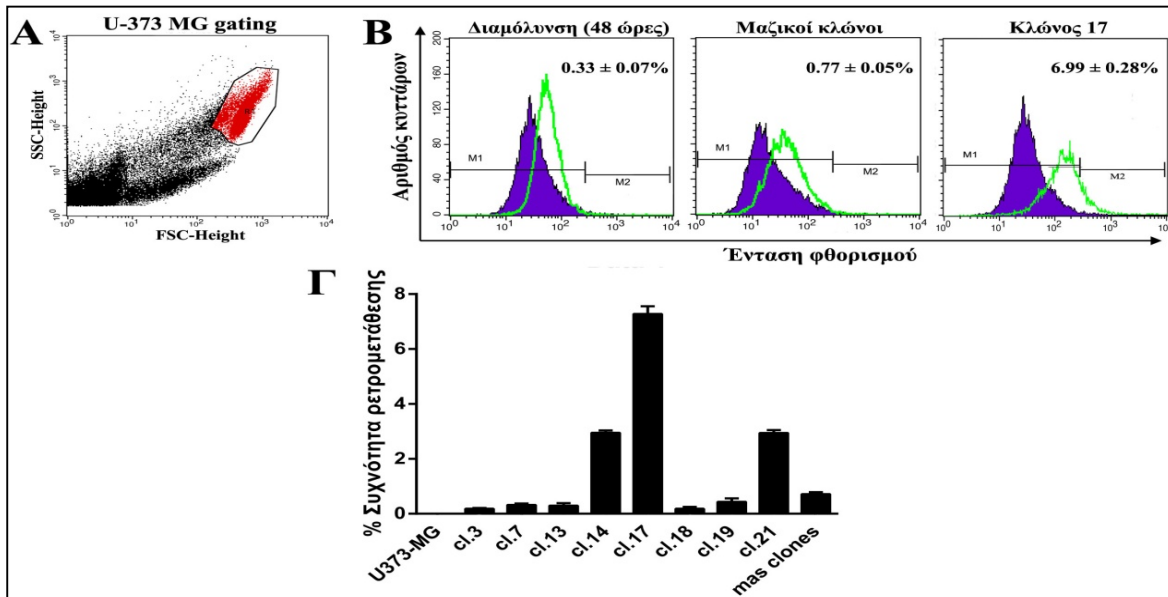


Εικόνα 3.1. Δομή ανασυνδιασμένου στοιχείου HERV-K10/κασέτας EGFP (pHERV-K10*/EGFP-INT) και λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης. A: Το ανασυνδιασμένο στοιχείο HERV-K10 φέρει κλωνοποιημένα τα 5' και 3' LTR ενώ έχουν αφαιρεθεί οι εσωτερικές του αλληλουχίες, αφήνοντας ακέραια την πριμοδοτική θέση PBS, το σήμα πακεταρίσματος Ψ και την πολυουρινική περιοχή PPT, λειτουργικά στοιχεία απαραίτητα για την έναρξη και λήξη της αντίστροφης μεταγραφής και τον σχηματισμό ψευδοϊκών σωματιδίων. Το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο φέρει επίσης κλωνοποιημένο το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. **B:** Η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης δομικά αποτελείται από το γονίδιο της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP, της οποίας η έκφραση οδηγείται από τον υποκινητή CMV και διακόπτεται από το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης που βρίσκεται σε αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς αυτό. **B:** Η λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης βασίζεται στην έκφραση της πρωτεΐνης EGFP και προϋποθέτει την παραγωγή του ανασυνδιασμένου μετάγραφου HERV-K10, μάτισμα και απομάκρυνση του ιντρονίου της γ-σφαιρίνης, αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA και ενσωμάτωση στο γένωμα

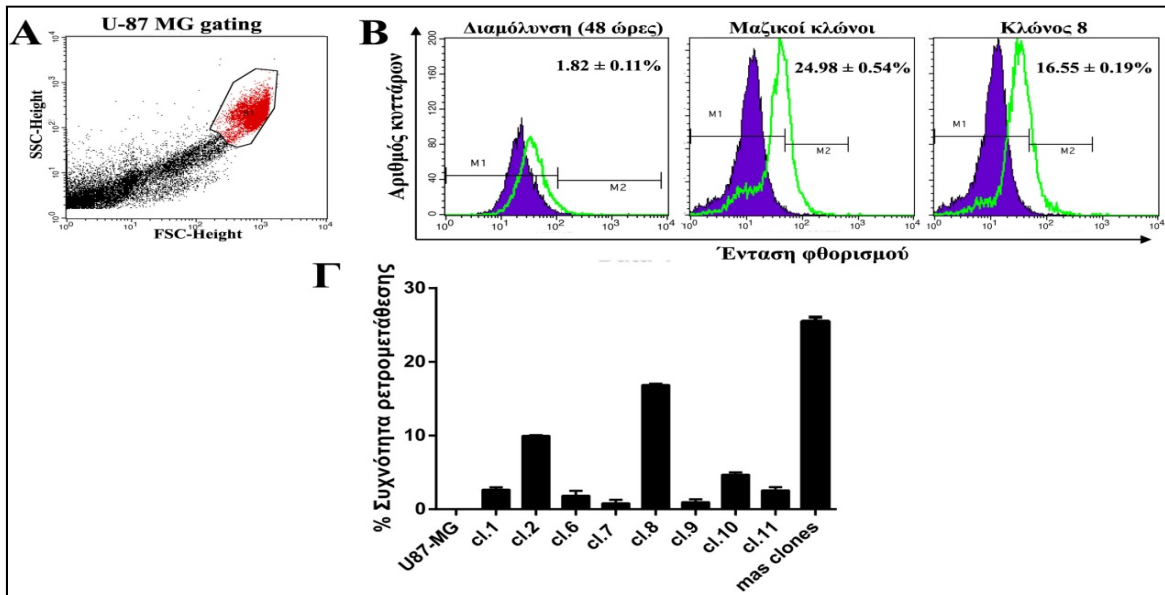
Υστερα από την κατασκευή της ανασυνδιασμένης ρετροτρανσποζονιακής κασσέτας, διαπιστώθηκε ότι πράγματι το συγκεκριμένο στοιχείο ήταν σε θέση να ρετρομετατίθεται σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που διαμολύνθηκαν με αυτό και ελέχθησαν ως προς την τέλεση γεγονότων ρετρομετάθεσης. Έχοντας λοιπόν εξακριβώσει ότι το ανασυνδιασμένο στοιχείο HERV-K10 είναι ρετρομεταθετικά ενεργό, θελήσαμε να εξετάσουμε αν η διαμόλυνσή του και σε ανθρώπινες γλοιωματικές κυτταρικές σειρές θα παρήγαγε ανάλογα γεγονότα ρετρομετάθεσης. Για τον σκοπό αυτό οι κυτταρικές σειρές U-373 MG και U-87 MG διαμολύνθηκαν με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο pHERV-K10^{*}/EGFP-INT.

Αρχικά, μετά το πέρας 48 ωρών από την διαμόλυνση κυττάρων U373 και U87, τα υπό εξέταση κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (FACS) για πιθανή ανίχνευση και μέτρηση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω έκφρασης της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Συγχρόνως, προκειμένου να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα των διαμολύνσεων (transfection efficiency), πραγματοποιήθηκε μία δεύτερη, ανεξάρτητη διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών U-373 MG και U-87 MG με το πλασμίδιο pEGFP-N1 και μετρήθηκε το κυτταρικό ποσοστό έκφρασης της EGFP πρωτεΐνης με FACS. Για τον σκοπό αυτό, δείγματα 2×10^5 κυττάρων ανά περίπτωση, μετρήθηκαν βάση των ρυθμίσεων και των κατωφλίων έντασης φθορισμού (βλέπε Υλικά και μέθοδοι), χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες μη διαμολυσμένα κύτταρα U-373 και U-87, αντίστοιχα. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι οι κατανομές φθορισμού των διαμολυσμένων με το ρετροτρανσποζόνιο κυττάρων μετατοπίζονται σε υψηλότερες τιμές έντασης φθορισμού που αντιστοιχούν σε συχνότητες ρετρομετάθεσης 0.33% για τα κύτταρα U373 / pHERV-K10^{*}/EGFP-INT και 1.82% για τα κύτταρα U87 / pHERV-K10^{*}/EGFP-INT (εικόνες 3.2 και 3.3). Επιπλέον, μετρήθηκε και το ποσοστό των EGFP-θετικών κυττάρων από την διαμόλυνση των πατρικών κυττάρων με το πλασμίδιο EGFP-N1, και βρέθηκε ότι ήταν 0,84% για τα κύτταρα U373 / EGFP-N1 και 6.41% για τα κύτταρα U87 / EGFP-N1, συγκριτικά με τα αντίστοιχα μη διαμολυσμένα με το πλασμίδιο EGFP-N1 κύτταρα-μάρτυρες, υποδηλώνοντας την αποτελεσματικότητα των διαμολύνσεων.

Για την επιβεβαίωση της παραπάνω παρατήρησης, το πείραμα πραγματοποιήθηκε για δεύτερη φορά, με σκοπό την απομόνωση θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων. Η επιλογή κυτταρικών κλώνων έγινε με την προσθήκη του αντιβιοτικού, υδρομυκίνη Β στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας για 20 περίπου ημέρες. Με αυτό τον τρόπο κατέστη δυνατή η επιλογή εκείνων των κυττάρων που επιβίωσαν παρουσία του αντιβιοτικού, καθώς είχαν ενσωματώσει επιτυχώς το πλασμίδιο pHERV-K10^{*}/EGFP-INT, στο οποίο εμπεριέχεται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη Β. Μετά το πέρας 20 ημερών αντιβιοτικής επιλογής, τα κύτταρα αφέθησαν να αναπτυχθούν σε κανονικό θρεπτικό μέσο απουσία του αντιβιοτικού προκειμένου να αναήψουν και να σχηματίσουν τις κυτταρικές αποικίες. Στη συνέχεια 30 περίπου αποικίες κυττάρων από κάθε περίπτωση (κυττάρων U373 / pHERV-K10^{*}/EGFP-INT και κυττάρων U87 / pHERV-K10^{*}/EGFP-INT) καθώς και μαζικοί πληθυσμοί 80 περίπου κλώνων απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά. Όταν ο κυτταρικός πληθυσμός του εκάστοτε κλώνου έφτασε σε μία ικανοποιητική πυκνότητα, 2×10^5 κύτταρα από κάθε μονήρη και μαζικό κλώνο, μετρήθηκαν με FACS, χρησιμοποιώντας μη διαμολυσμένα κύτταρα U-373 MG ή U-87 MG ως μάρτυρες.



Εικόνα 3.2: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 με FACS σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U-373 MG. Τα ρετρομεταθετά στοιχεία HERV-K10 παράγουν γεγονότα ρετρομετάθεσης σε κύτταρα U373, 48 ώρες μετά την διαμόλυνση όπως επίσης και σε απομονωμένους, μετά από επιλογή, μαζικούς και μονήρεις κλώνους. **A:** Ο πληθυσμός ενδιαφέροντος απομονώνεται ηλεκτρονικά σε κύτταρα-μάρτυρες U-373, με περίφραξη (gating). **B:** Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απεικονίζονται ως επικαλύψεις κατανομών φθορισμού, μη διαμολυσμένων κυττάρων ως μάρτυρας (μωβ) και εκείνων του δείγματος ελέγχου (πράσινο). Το πρώτο ιστόγραμμα (από αριστερά προς τα δεξιά) αντιπροσωπεύει ανάλυση μετά το πέρασ 48 ωρών από την διαμόλυνση, ενώ το δεύτερο και το τρίτο αντιπροσωπεύουν την ανάλυση μαζικών κλώνων και του κλώνου 17 αντίστοιχα, μετά από αντιβιοτική επιλογή με υγρομυκίνη **B.** M1, M2: κατώφλια έντασης φθορισμού αρνητικών και EGFP-θετικών κυττάρων, αντίστοιχα. Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. **Γ:** Σε ραβδόγραμμα απεικονίζονται οι συχνότητες ρετρομετάθεσης κυμαινόμενες μεταξύ 0.16 - 6.99% για τα κύτταρα U373 / pHERV-K10*/EGFP-INT.



Εικόνα 3.3: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 με FACS σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U-87 MG. A: Απομόνωση του κυτταρικού πληθυσμού ενδιαφέροντος μέσω περιφραξής (gating). B: Μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης 48 ώρες μετά την διαμόλυνση κυττάρων U-87 με το στοιχείο pHERV-K10*/EGFP-INT, καθώς και σε μαζικούς και έναν αντιπροσωπευτικό κλώνο (κλώνος 8), ύστερα από αντιβιοτική επιλογή με γυρομυκίνη B. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απεικονίζονται ως επικαλύψεις κατανομών φθορισμού, μη διαμολυσμένων κυττάρων ως μαρτυρας (μωβ) και εκείνων του δείγματος ελέγχου (πράσινο). M1, M2: κατώφλια έντασης φθορισμού αρνητικών και EGFP-θετικών κυττάρων, αντίστοιχα. Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα (n=2) ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Γ: Σε ραβδόγραμμα απεικονίζονται οι συχνότητες ρετρομετάθεσης κυμαινόμενες μεταξύ 4.34 - 24.98% για τα κύτταρα U87 / pHERV-K10*/EGFP-INT.

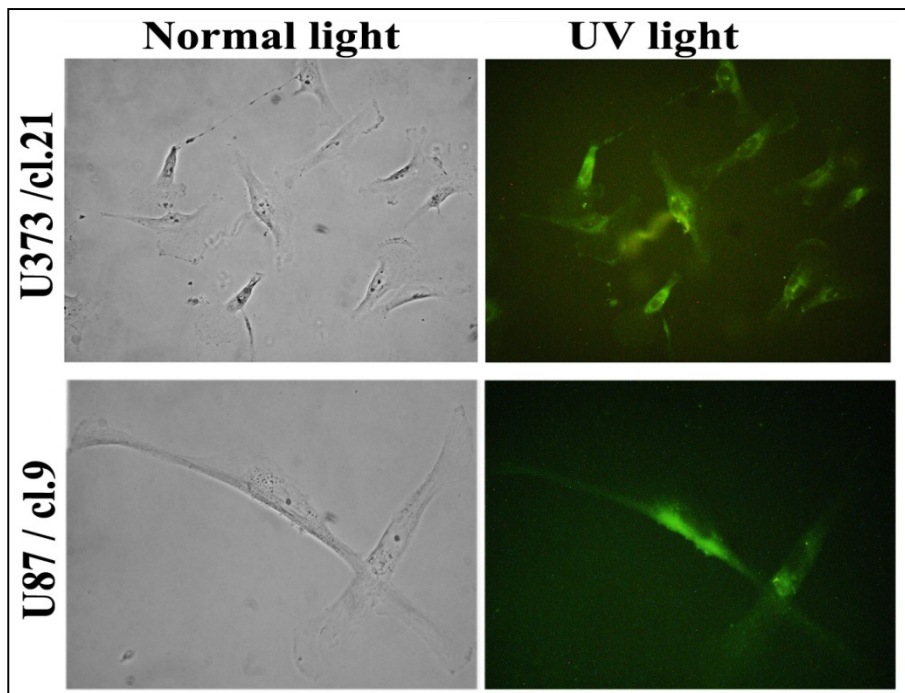
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα κύτταρα U373 απέδειξαν ένα ποσοστό ρετρομετάθεσης της τάξης του 0.77% για τους μαζικούς κλώνους και κυμαινόμενα ποσοστά από 0.16 – 6.99 % για τους 8 μονήρεις κλώνους που βρέθηκαν θετικοί στην έκφραση της πρωτεΐνης EGFP (εικόνα 3.2). Η αντίστοιχη συχνότητα ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε για τους μαζικούς κλώνους των κυττάρων U87 ήταν 24.98% ενώ για τους 8 μονήρεις κλώνους κυμαινόταν από 4.39 – 16.55 % (εικόνα 3.3).

Συνολικά τα άνωθεν αποτελέσματα μαρτυρούν ότι τα ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U-373 και U-87 υποστηρίζουν την τέλεση γεγονότων ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 ακόμη και σε μόλις 48 ώρες από την διαμόλυνσή τους στις εν λόγω κυτταρικές σειρές.

3.1.1 Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης των HERV-K10 σε κύτταρα κλώνων

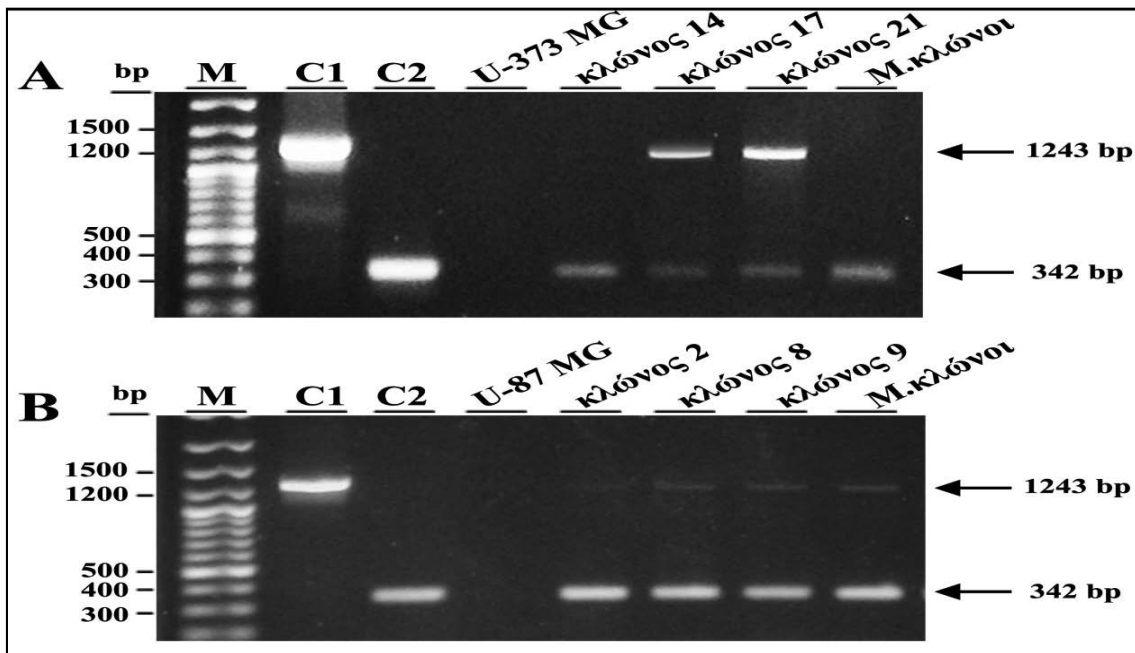
Επόμενο βήμα της μελέτης μας αποτέλεσε η επιβεβαίωση της τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης, μέσω της έκφρασης της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP σε διαμολυσμένα κύτταρα U373 / pHERV-K10*/EGFP-INT και U87 / pHERV-K10*/EGFP-INT σε επίπεδο κυττάρου. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα από έναν αντιπροσωπευτικό κλώνο κάθε κυτταρικής σειράς μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και μελετήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού για την ανίχνευση πράσινων EGFP-θετικών κυττάρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4, παρατηρήθηκε έκφραση της EGFP πρωτεΐνης σε κύτταρα U373

κλώνου 21 καθώς και σε κύτταρα U87 κλώνου 9, η οποία εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα



Εικόνα 3.4: Ανίχνευση ρετρομεταθέσεων μέσω EGFP-θετικών κυττάρων, με μικροσκοπία υπεριώδους φωτός. Κύτταρα U373 του κλώνου 21 και κύτταρα U87 του κλώνου 9 φωτογραφήθηκαν σε ορατό και υπεριώδες φως. Η ανίχνευση της έκφρασης της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP υποδηλώνει την ύπαρξη ρετρομεταθετικών γεγονότων.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι ο φθορισμός EGFP που παρατηρήθηκε παραπάνω οφείλεται σε γεγονότα ρετρομετάθεσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR τόσο σε μονήρεις όσο και σε μαζικούς κλώνους για την ανίχνευση ρετρομεταθετικών ενθέσεων σε νέες θέσεις στο γένωμα. Η ανάλυση PCR έλαβε χώρα με την χρήση κατάλληλων εκκινητών για το γονίδιο της EGFP και εκχυλισμάτων DNA που απομονώθηκαν από κύτταρα χαρακτηριστικών μονήρων και μαζικών κλώνων καθώς και μη διαμολυσμένων κυττάρων ως μάρτυρας, για κάθε κυτταρική σειρά. Η λογική της συγκεκριμένης τεχνικής βασίζεται στην υβριδοποίηση των εκκινητών ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου της EGFP μετά την ένθεση, δίνοντας ένα προϊόν PCR μεγέθους 1243 bp, που περιλαμβάνει την αλληλουχία του ιντρονίου της γ-σφαιρίνης. Όταν πραγματοποιηθούν γεγονότα ρετρομετάθεσης, η αποκοπή του ιντρονίου θα παράξει ένα μικρότερο προϊόν, μεγέθους 342 bp που αντιστοιχεί στο ματισμένο γονίδιο της EGFP. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, τόσο σε κυτταρικούς κλώνους U373 όσο και σε U87, ανιχνεύεται η δέσμη των 1243 bp που αντιστοιχεί στο μη ματισμένο στοιχείο HERV-K10 καθώς επίσης και η δέσμη των 342 bp η οποία είναι διαγνωστική για την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης. Αντίθετα, στα κύτταρα μάρτυρες U-373 MG και U-87 MG, όπως αναμενόταν δεν ανιχνεύθηκε κανένα προϊόν (εικόνα 3.5).

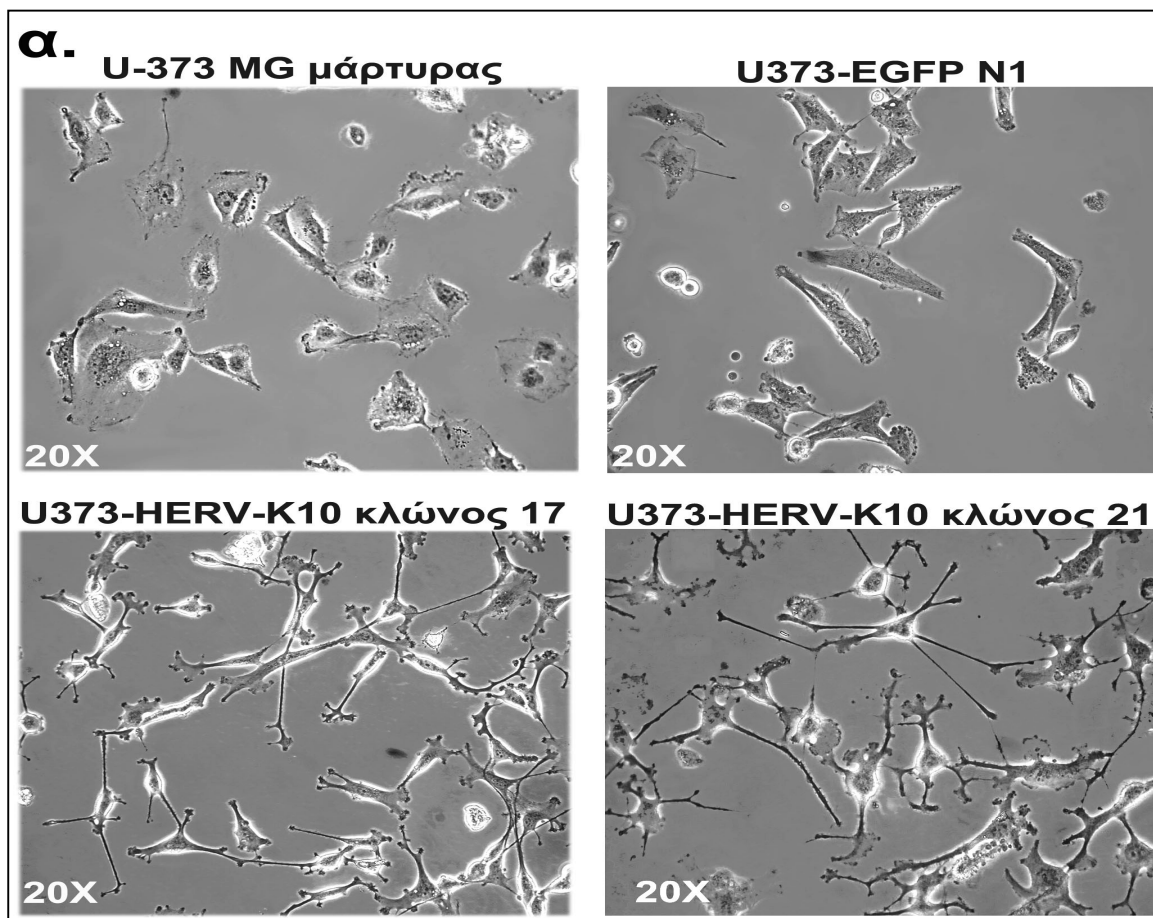


Εικόνα 3.5: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε γενωμικό επίπεδο. Ανάλυση PCR για το γονίδιο της EGFP προς ταυτοποίηση ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων σε μονήρεις και μαζικούς κλώνους των κυττάρων U373 / pHERV-K10*/EGFP-INT (A) ή U87 / pHERV-K10*/EGFP-INT (B). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα κύτταρα U-373 MG (A) ή U-87 MG (B). M: Μάρτυρας μοριακού βάρους pBR322/HinfI, C1: πλασμίδιο-μάρτυρας pHERV-K10*/EGFP-INT, ως προς την ζώνη των 1243 bp, που περιέχει το γονίδιο της EGFP μαζί με το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης, C2: πλασμίδιο-μάρτυρας pEGFP-N1, ως προς την ζώνη 342 bp που περιέχει την EGFP χωρίς το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης. Η δέσμη 342 είναι διαγνωστική για την παρουσία γεγονότων ρετρομετάθεσης. Ο διαχωρισμός των προϊόντων PCR έγινε με ηλεκτοφόρηση σε πηκτή 1.2 (w/v) αγαρόζης.

3.2 Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα U373 και U87 συσχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης.

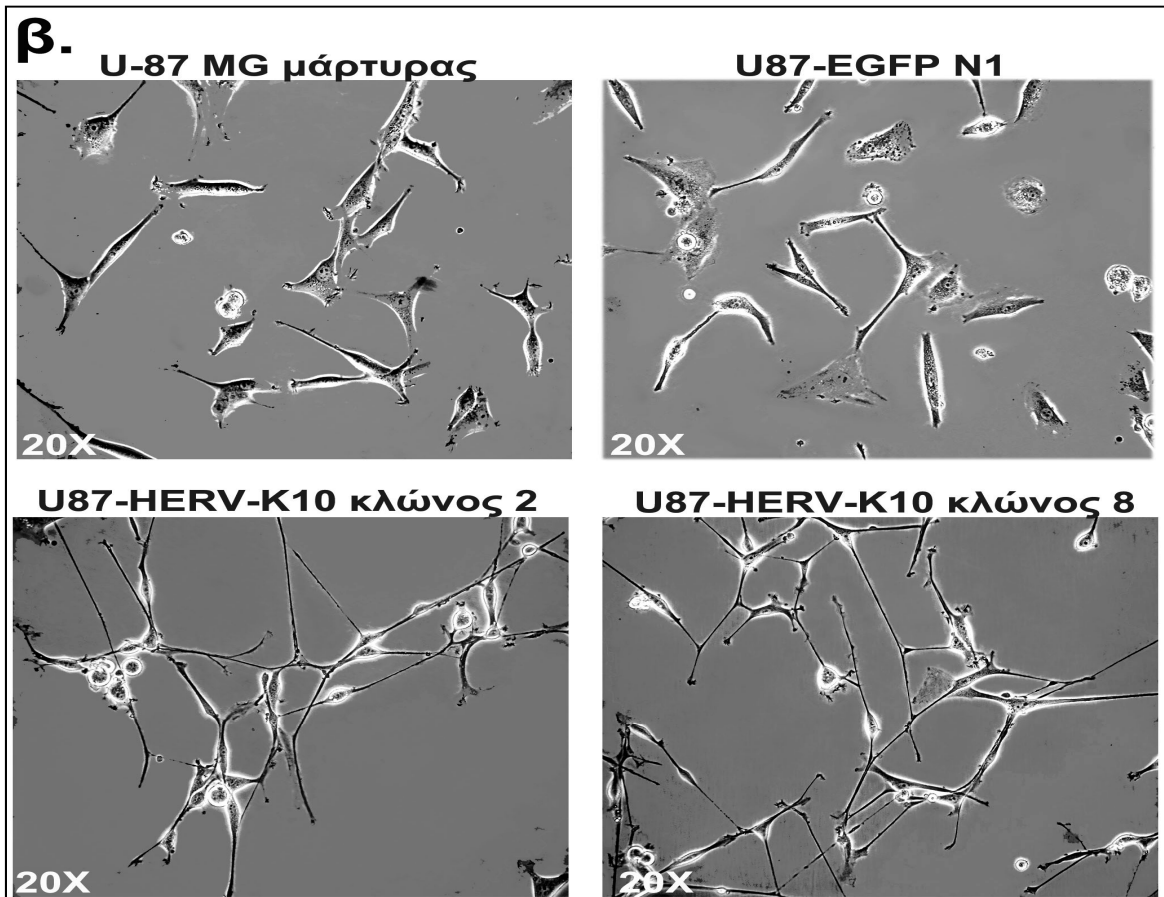
Η παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο των θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων U373-HERV-K10*/EGFP-INT αποκάλυψε μία έντονη μεταβολή της μορφολογίας τους που προσομοιάζει με επαγωγή φαινομένων κυτταρικής διαφοροποίησής τους

Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των κυττάρων απώλεσαν την τυπική επίπεδη, πολυγωνική μορφολογία που χαρακτηρίζει τα κύτταρα μάρτυρες, και απέκτησαν την ατρακτοειδή μορφολογία των ώριμων αστροκυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από το μεγάλο μέγεθος των κυττάρων και τις μακρές απολήξεις τους που εκτείνονται μακριά από το κυτταρικό σώμα (εικόνα 3.6α). Επιπλέον, με σκοπό να αποκλείσουμε την πιθανότητα εμπλοκής της EGFP πρωτεΐνης στις παρατηρούμενες φαινοτυπικές μεταβολές, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών U-373- και U-87 MG με το πλασμίδιο EGFP-N1. Στην συνέχεια απομονώθηκαν μαζικοί κλώνοι από κάθε περίπτωση κυτταρικής σειράς, με τη χορήγηση στις κυτταροκαλλιέργειες του αντιβιοτικού νεομυκίνη (G418). Δεν παρατηρήθηκαν φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα από την πρωτεΐνη EGFP (εικόνα 3.6), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων U373 και U87 προκλήθηκαν μόνο από τα γεγονότα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10.



Εικόνα 3.6 α): Η ρετρομετάθεση των στοιχείων *HERV-K10* συσχετίζεται με γεγονότα κυτταρικής διαφοροποίησης σε κύτταρα (α) *U-373 MG* και (β) *U-87 MG*. Απεικονίζεται η μορφολογία κυττάρων *U-373* πριν την διαμόλυνση (μάρτυρες), μετά την διαμόλυνση με το πλασμίδιο *pEGFP-N1* ή το ρετροτρανσποζόνιο *HERV-K10*/EGFP-INT*. Οι θετικοί σε ρετρομετάθεση κλώνοι *U373-HERV-K10* αποκτούν μία χαρακτηριστική ατρακτοειδή μορφολογία με πολλές και μακρές κυτταρικές αποφυάδες προσομοιάζοντας τον φαινότυπο των ώριμων αστροκυττάρων.

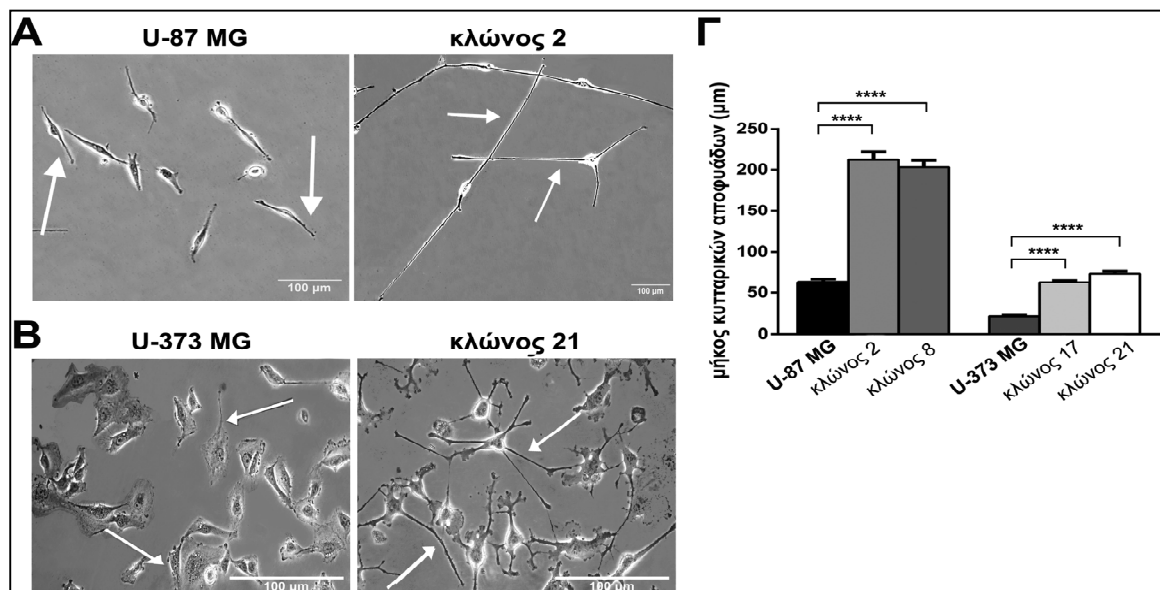
Παρόμοια ήταν και η εικόνα για τους θετικούς ρετρομετάθεσης κυτταρικούς κλώνους *U87-HERV-K10*/EGFP-INT*, αν και στην προκειμένη περίπτωση ο προκύπτων φαινότυπος των κυττάρων ομοίαζε περισσότερο με τον νευρωνικό, ο οποίος χαρακτηρίζεται από ένα μικρό, ωοειδές κυτταρικό σώμα από το οποίο εκτείνονται πολυάριθμες λεπτές και μακρές κυτταρικές αποφυάδες (Εικόνα 3.6β).



Εικόνα 3.6 β): Η ρετρομετάθεση των στοιχείων *HERV-K10* συσχετίζεται με γεγονότα κυτταρικής διαφοροποίησης σε κύτταρα (α) U-373 MG και (β) U-87 MG. Απεικονίζεται η μορφολογία κυττάρων U87 (β), πριν την διαμόλυνση (μάρτυρες), μετά την διαμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-N1 ή το ρετροτρανσποζόνιο *HERV-K10*/EGFP-INT*. Οι θετικοί σε ρετρομετάθεση κλώνοι U87-*HERV-K10* απέκτησαν μικρότερο κυτταρικό σώμα με μακρές και λεπτές απολήξεις που χαρακτηρίζουν ένα πιο νευρο-ειδικό φαινότυπο.

Προς την κατεύθυνση της ανάλυσης των φαινοτυπικών αλλαγών, ακολούθησε μέτρηση του μήκους των κυτταρικών αποφυάδων στους μονήρεις κλώνους και των δύο κυτταρικών σειρών, η οποία αποκάλυψε μία σημαντική αύξησή του, σε σχέση με το αντίστοιχο των κυττάρων του μάρτυρα (εικόνα 3.7).

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στο ραβδόγραμμα της εικόνας 2, τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα των αντιπροσωπευτικών κλώνων 2 και 8 της κυτταρικής σειράς U-87 είχαν 3.6- και 3.4- φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερο μήκος αποφυάδων σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα. Παρομοίως, και για τους μονήρεις κλώνους 17 και 21 της κυτταρικής σειράς U-373, το μήκος των απολήξεών τους ήταν 3.2- και 3.5-φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα κύτταρα του μάρτυρα. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί μία επιπρόσθετη ένδειξη της κυτταρικής διαφοροποίησης που προκλήθηκε από την τέλεση γεγονότων ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* στις δύο γλοιοματικές κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 3.7: Μορφομετρική ανάλυση των θετικών σε ρετρομετάθεση κυτταρικών κλώνων U373-HERV-K10*/EGFP-INT και U87-HERV-K10*/EGFP-INT. Τα λευκά βέλη των εικόνων A και B δείχνουν τις κυτταρικές αποφυάδες δύο χαρακτηριστικών κλώνων καθώς και των αντίστοιχων για κάθε περίπτωση κυττάρων του μάρτυρα. Η μέτρηση του μήκους τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ και αφορούσε 100 κύτταρα για κάθε περίπτωση τα οποία φωτογραφήθηκαν από διάφορα τυχαία πεδία της καλλιέργειας (bar scale = 100μm). Οι στήλες του γραφήματος (εικόνα Γ) αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή του μήκους των κυτταρικών απολήξεων \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($mean \pm s.e.m$) από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$), **** $P < 0.0001$.

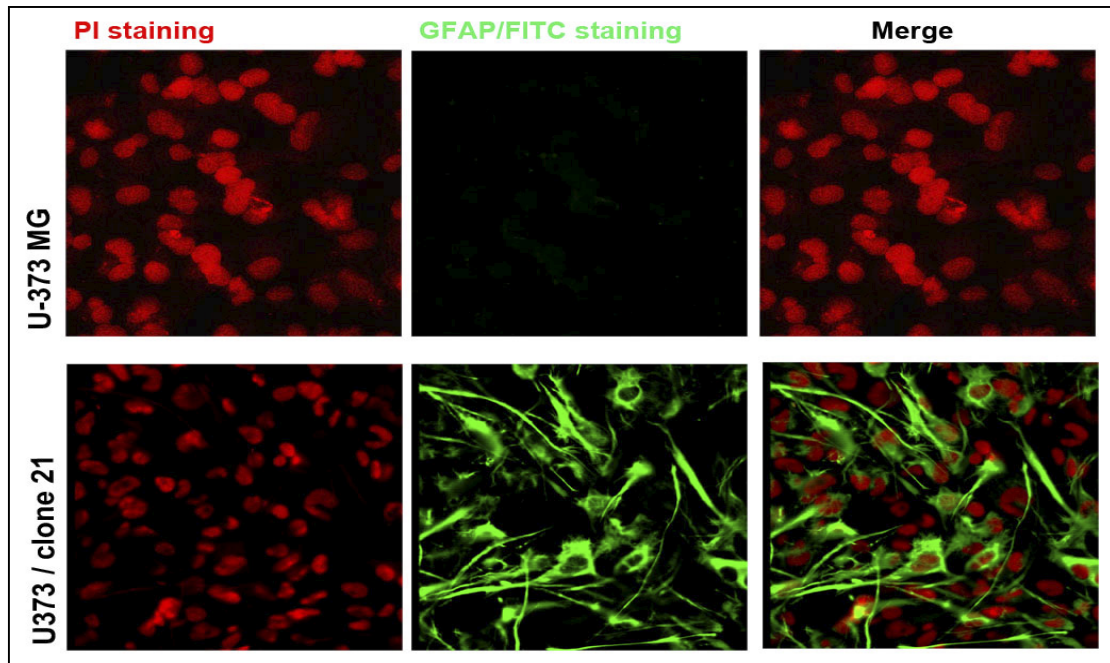
3.2.1 Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U373 επάγει την διαφοροποίησή τους προς έναν αστροκυτταρικό φαινότυπο.

Οι διάφοροι κυτταρικοί τύποι που απαντώνται στον νευρικό ιστό χαρακτηρίζονται από την έκφραση ειδικών πρωτεϊνικών δεικτών που επιτρέπουν την ταυτοποίησή τους. Τα κύτταρα του νευρικού ιστού είναι κατά κύριο λόγο δύο ειδών: τα νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα.

Ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός των αστροκυττάρων γίνεται με ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα ειδικά προς την όξινη γλοιακή ινιαδική πρωτεΐνη (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP). Η GFAP αποτελεί μια ειδική μορφή ενδιάμεσου νηματίου του κυτταροσκελετού των αποφυάδων που χαρακτηρίζει αποκλειστικά τα αστροκύτταρα. Μεταξύ των πιο διαδεδομένων ανοσοϊστοχημικών δεικτών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των νευρωνικών κυττάρων είναι οι πρωτεΐνες των νευρωνικών μικροσωληνίσκων, με πιο χαρακτηριστική την βIII-τουμπουλίνη. Τέλος, η νεστίνη ανήκει στην οικογένεια των ενδιάμεσων ινιδίων (Intermediate Filaments, IF) και παράγεται στα αδιαφοροποίητα προγονικά/βλαστικά κύτταρα του ΚΝΣ των θηλαστικών κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Αποτελεί δείκτη χαρακτηρισμού των πολλαπλασιαζόμενων και μεταναστευόντων κυττάρων του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου. Στον φυσιολογικό ενήλικα εγκέφαλο, η νεστίνη εκφράζεται κυρίως στα βλαστικά κύτταρα της υποκοιλιακής των πλάγιων κοιλιών του προσθεγκεφάλου. Αυξημένη έκφραση της νεστίνης συχνά συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως είναι για παράδειγμα το εγκεφαλικό τραύμα, η ισχαιμία, η φλεγμονή και οι νεοπλασματικές παθήσεις.

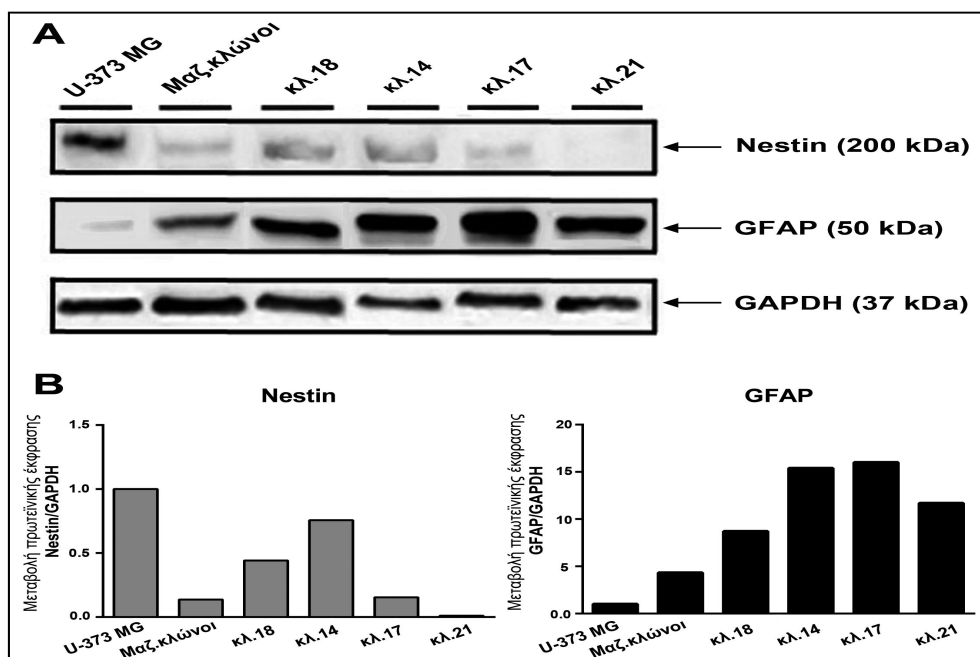
Προκειμένου να εξακριβωθεί η επαγωγή κυτταρικής διαφοροποίησης ύστερα από την διαμόλυνση κυττάρων U373 με το στοιχείο HERV-K10*/EGFP-INT, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη του προφίλ έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνικών δεικτών σε μονήρεις κλώνους οι

οποίοι παρουσίαζαν μεταβολή φαινοτύπου. Πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός ως προς το μόριο της GFAP στα κύτταρα του κλώνου 21, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα κύτταρα U-373 MG. Στην εικόνα 3.8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης της GFAP μετά από παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρήθηκε έκφραση του αστροκυτταρικού δείκτη στα κύτταρα του κλώνου 21 εν αντιθέσει με τα κύτταρα του μάρτυρα που δεν την εξέφραζαν.



Εικόνα 3.8: Έμμεσος ανοσοφθορισμός ανίχνευσης του αστροκυτταρικού δείκτη διαφοροποίησης GFAP σε κύτταρα U373 και κλώνου 21. Κύτταρα αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν, και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της GFAP και με δευτεροταγές αντίσωμα, συζευγμένο με τη χρωμοφόρο ουσία FITC, η οποία προσδίδει το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στο δίκτυο της πρωτεΐνης. Οι πυρήνες χρώσθηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (PI) το οποίο τους προσδίδει το κόκκινο χρώμα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο και κατόπιν φωτογραφήθηκαν. Πρώτη οριζόντια στήλη: κύτταρα U373 ως μάρτυρας. Δεύτερη οριζόντια στήλη: κύτταρα U373/κλώνος 21

Οι παραπάνω ισχυρές ενδείξεις για επαγωγή κυτταρικής διαφοροποίησης προς αστροκυτταρικό φαινότυπο στοιχειοθετήθηκαν περαιτέρω, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blotting). Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από πέντε αντιπροσωπευτικούς μονήρεις κλώνους: κλώνοι 14, 17, 18, 21 και μαζικούς κλώνους, με κυμαινόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης από 0.2 έως 7.2%, καθώς και από κύτταρα του μάρτυρα, U-373 MG. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western εξετάζοντας την πρωτεϊνική έκφραση των δεικτών νεστίνης, GFAP και βIII-τουμπουλίνης. Τέλος, αντίσωμα που αναγνωρίζει την GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης πρωτεΐνης στα προς ανάλυση δείγματα (εικόνα 3.9).



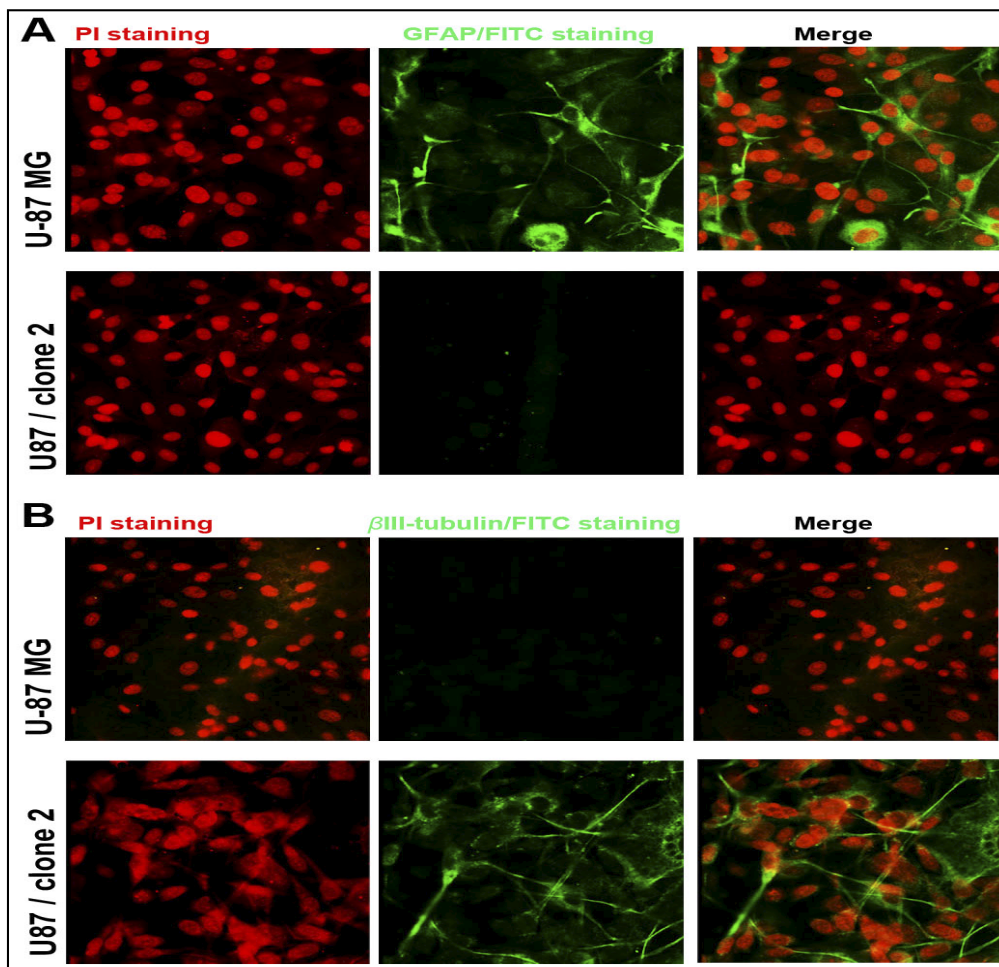
Εικόνα 3.9: Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνης και GFAP σε θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα U373. A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση των υπό εξέταση πρωτεϊνών. 40 μg πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 10% δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μεταχειρίστηκαν με αντισώματα έναντι των νεστίνης, ή GFAP ή GAPDH, για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν δευτεροταγή αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο της ραφανικής υπεροξειδάσης (HRP). Στο πάνω μέρος της εικόνας αναγράφονται οι κυτταρικοί κλώνοι και στο δεξί μέρος, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών στις οποίες δεσμεύονται. **B.** Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Οι στήλες του πρώτου διαγράμματος απεικονίζουν την αναστολή της έκφρασης της νεστίνης ενώ οι στήλες του δεύτερου διαγράμματος αντιπροσωπεύουν την επαγωγή της έκφρασης της GFAP, σε μονήρεις κυτταρικούς κλώνους συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνη και GFAP μεταβλήθηκαν σημαντικά στους προς εξέταση κλώνους σε σύγκριση με τα αρχικά αμεταχειρίστη κύτταρα U-373 MG. Συγκεκριμένα, η έκφραση της νεστίνης μειώθηκε κατά 1 έως 7 φορές στους υπό μελέτη κλώνους (μαζικούς και μονήρεις), ενώ στον κλώνο 21 φαίνεται πως χάνεται εντελώς. Αντίθετα, η GFAP καταγράφει εντυπωσιακά αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ίδιους κυτταρικούς κλώνους καθώς επάγεται κατά 4- (μαζικοί κλώνοι) έως 16- (κλώνος 17) φορές σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα. Επιπλέον, κατ' αντιστοιχία των αυξανόμενων ποσοστών ρετρομετάθεσης μεταξύ των επιλεγμένων κλώνων που αναλύθηκαν, διαπιστώθηκε ανάλογη αυξανόμενη έκφραση της GFAP. Τέλος, κανένα δείγμα, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, δεν παρουσίασε ανοσοαντιδραστικότητα. για την νευροειδική πρωτεΐνη βIII – τουμποουλίνη.

Συνολικά, τα άνωθεν πειραματικά αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σε γλοιοματικά κύτταρα U373 επάγει φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης από έναν προγονικό προς έναν πιο ώριμο αστροκυτταρικό φαινότυπο

3.2.2 Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα U87 επάγει δια-διαφοροποίησή (trans-differentiation) τους προς έναν νευρωνικό φαινότυπο.

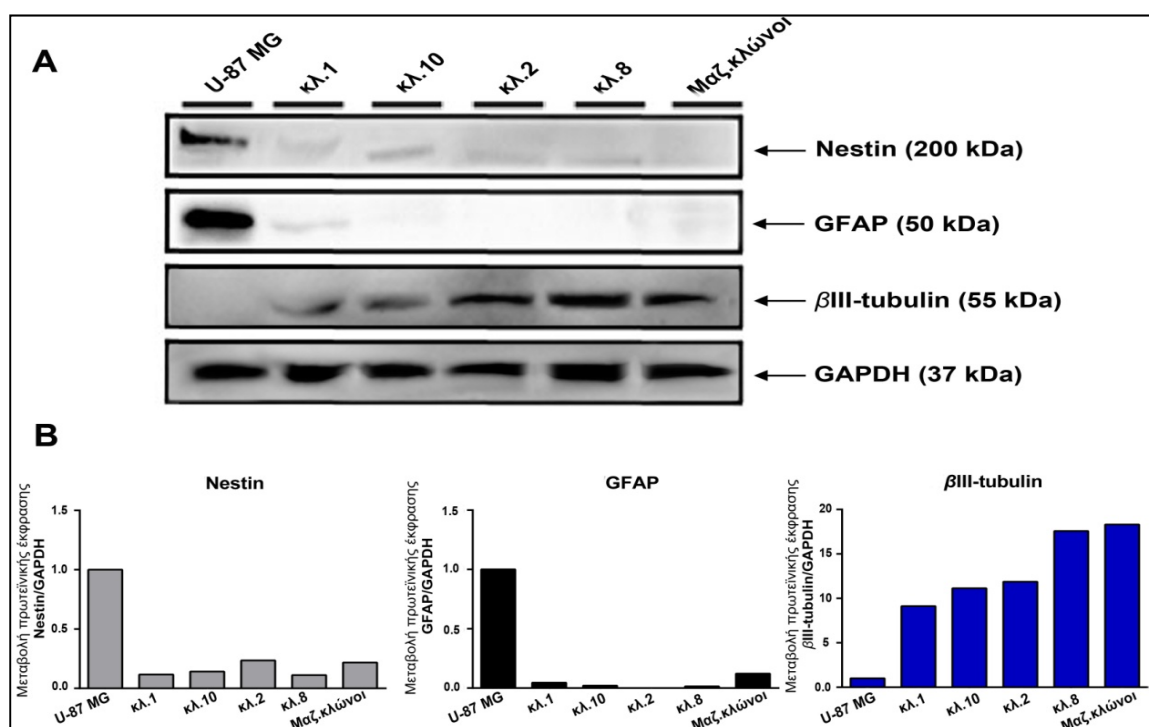
Έντονη μεταβολή φαινοτύπου εμφάνισαν και οι θετικοί σε ρετρομετάθεση κυτταρικοί κλώνοι U87. Τα κύτταρα έχασαν την αρχική πεπλατυσμένη μορφολογία επιθηλιακού τύπου και απέκτησαν μακρές κυτταρικές απολήξεις, ενώ το κυτταρικό τους σώμα έγινε πιο σφαιρικό σε σχέση με τα αρχικά, αμεταχείριστα κύτταρα. Και σε αυτή την περίπτωση όμως κρίθηκε αναγκαία η εξέταση των προαναφερθέντων πρωτεϊνικών δεικτών προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση του προκύπτοντος κυτταρικού τύπου. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου έμμεσος ανοσοφθορισμός ως προς τις πρωτεΐνες GFAP και β III-τουμπουλίνη, τόσο στον αντιπροσωπευτικό κλώνο 2, όσο και σε κύτταρα-μάρτυρες.



Εικόνα 3.10: Έμμεσος ανοσοφθορισμός ανίχνευσης του αστροκυτταρικού δείκτη GFAP και του νευρωνικού δείκτη β III-τουμπουλίνη σε κύτταρα U87 και κλώνου 2. Κύτταρα αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιήθηκαν και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι των GFAP (A) και β III-τουμπουλίνης (B) και με δευτεροταγές αντίσωμα, συζευγμένο με τη χρωμοφόρο ουσία FITC, η οποία προσδίδει το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στο δίκτυο της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Οι πυρήνες χρώστηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (PI) το οποίο τους προσδίδει το κόκκινο χρώμα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο και κατόπιν φωτογραφήθηκαν. A: Χρώση με GFAP/FITC. Πρώτη οριζόντια στήλη: κύτταρα U87 ως μάρτυρας. Δεύτερη οριζόντια στήλη: κύτταρα U87 / κλώνος 2. B: Χρώση με β III-τουμπουλίνη/FITC. Πρώτη οριζόντια στήλη: κύτταρα U87 ως μάρτυρας. Δεύτερη οριζόντια στήλη: κύτταρα U87 / κλώνος 2.

Στην εικόνα 3.10 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των GFAP και βIII-τουμπουλίνης μετά από παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία. Όπως είναι φανερό, ο κλώνος 2 εμφανίζεται θετικός στην έκφραση της νευροειδικής πρωτεΐνης βIII-τουμπουλίνης, και αρνητικός στην έκφραση του αστροκυτταρικού δείκτη GFAP, σε αντίθεση με τα κύτταρα-μάρτυρες που εμφανίζουν αντίθετο προφίλ έκφρασης για τις δύο πρωτεΐνες (θετικά σε GFAP και αρνητικά σε βIII-τουμπουλίνη), γεγονός που μαρτυρά την δια-διαφοροποίησή του προς την νευρωνική κατεύθυνση.

Για την επιβεβαίωση αυτής της σημαντικής παρατήρησης πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western, η οποία επέτρεψε τον ποσοτικό έλεγχο έκφρασης των υπό διερεύνηση πρωτεϊνών σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από πέντε αντιπροσωπευτικούς μονήρεις κλώνους καθώς και από αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες U-87 MG. Οι κλώνοι που επιλεχθηκαν (κλώνοι 1, 2, 8, 10 και μαζικοί) εμφάνιζαν κυμαινόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης από 2.7 έως 25.5%. Και σε αυτή την περίπτωση εξετάστηκε η πρωτεϊνική έκφραση των νεστίνης, GFAP και βIII-τουμπουλίνης, ενώ η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έγινε μέσω της πρωτεΐνης της GAPDH.



Εικόνα 3.11: Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνης, GFAP και βIII-τουμπουλίνης σε θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα U87. A. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Στο πάνω μέρος της εικόνας αναγράφονται οι κυτταρικοί κλώνοι και στο δεξί μέρος τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών στις οποίες δεσμεύονται. **B.** Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Από αριστερά προς τα δεξιά: Οι στήλες του πρώτου και του δεύτερου διαγράμματος απεικονίζουν την αναστολή της έκφρασης των νεστίνης και GFAP αντίστοιχα, ενώ οι στήλες του τρίτου διαγράμματος αντιπροσωπεύουν την επαγωγή της έκφρασης της βIII-τουμπουλίνης, σε μονήρεις κυτταρικούς κλώνους συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρα.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της εικόνας 3.11, τα αμεταχείριστα κύτταρα U-87 MG εκφράζουν έντονα τις πρωτεΐνες νεστίνη και GFAP, γεγονός που μαρτυρά ότι πρόκειται για προγονικά κύτταρα αστροκυτταρικού τύπου. Στον αντίποδα, και οι πέντε κλώνοι που βρέθηκαν θετικοί σε ρετρομετάθεση χάνουν σχεδόν καθολικά την έκφραση

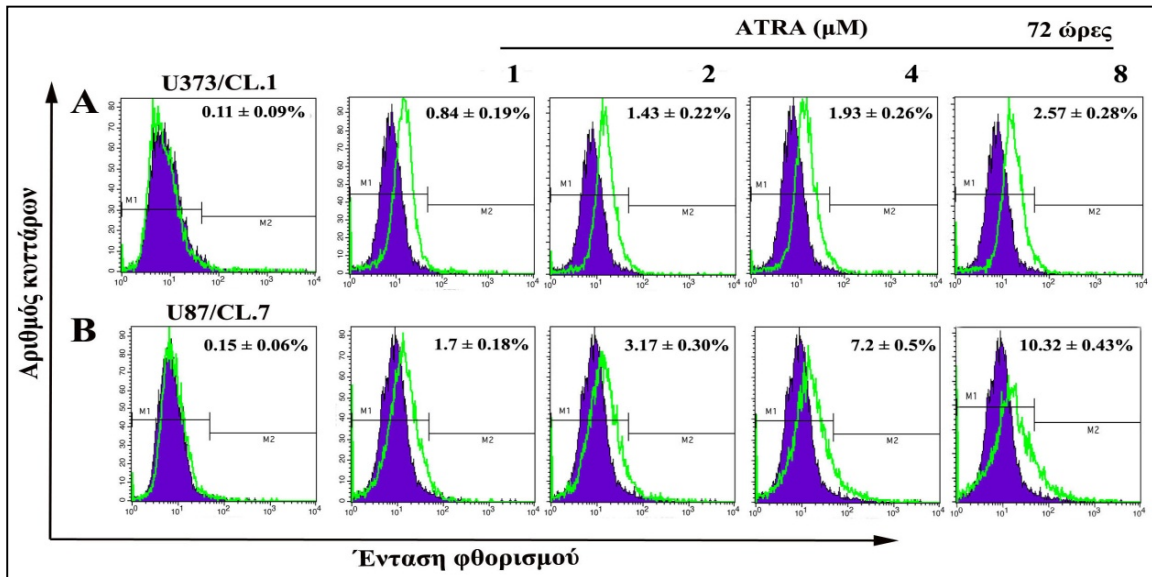
των νεστίνης και GFAP, ενώ παράλληλα εμφανίζονται θετικοί στην έκφραση της βIII-τουμπουλίνης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνονταν η συχνότητα ρετρομετάθεσης στους υπό μελέτη κλώνους, καταγράφονταν ανάλογη αύξηση και στα επίπεδα έκφρασης της νευρο-ειδικής πρωτεΐνης βIII-τουμπουλίνη.

3.2.3 Το ρετινοϊκό οξύ (All-trans Retinoic Acid, ATRA) επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά δοδο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο σε κύτταρα U-373 και U-87.

Στην παρούσα ενότητα επιχειρήθηκε να διερευνηθεί η πιθανή επαγωγή της ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 από παράγοντες οι οποίοι είναι γνωστό ότι προκαλούν φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης σε νευρικά βλαστικά/προγονικά κύτταρα. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, ο πιο διαδεδομένος είναι το ρετινοϊκό οξύ (ATRA), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την *in vitro* πρόκληση κυτταρικής διαφοροποίησης σε πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των νευρικών βλαστικών, προς κυτταρικούς τύπους της γλοιακής και νευρικής γενεαλογίας. Επιπλέον, εφαρμόζεται *in vitro* και για την επαγωγή κυτταρικής διαφοροποίησης στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, με στόχο την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους και σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικές ουσίες, την τελική τους απόπτωση.

Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν δύο κλώνοι (ένας από κάθε περίπτωση) κυττάρων U373 και U87 οι οποίοι είχαν εμφανίσει χαμηλά ποσοστά ρετρομετάθεσης, της τάξης του 0,11 και 0,15% αντίστοιχα, και επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ATRA, για 72 ώρες. Οι συγκεντρώσεις επίδρασης με την συγκεκριμένη ουσία ήταν 1, 2, 4 και 8 μM . Έπειτα από επώαση 72 ωρών μετρήθηκε η επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης σε κάθε συγκέντρωση, με μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα U373 κλώνου 1 και U87 κλώνου 1, αντίστοιχα. (Εικόνα 3.12).

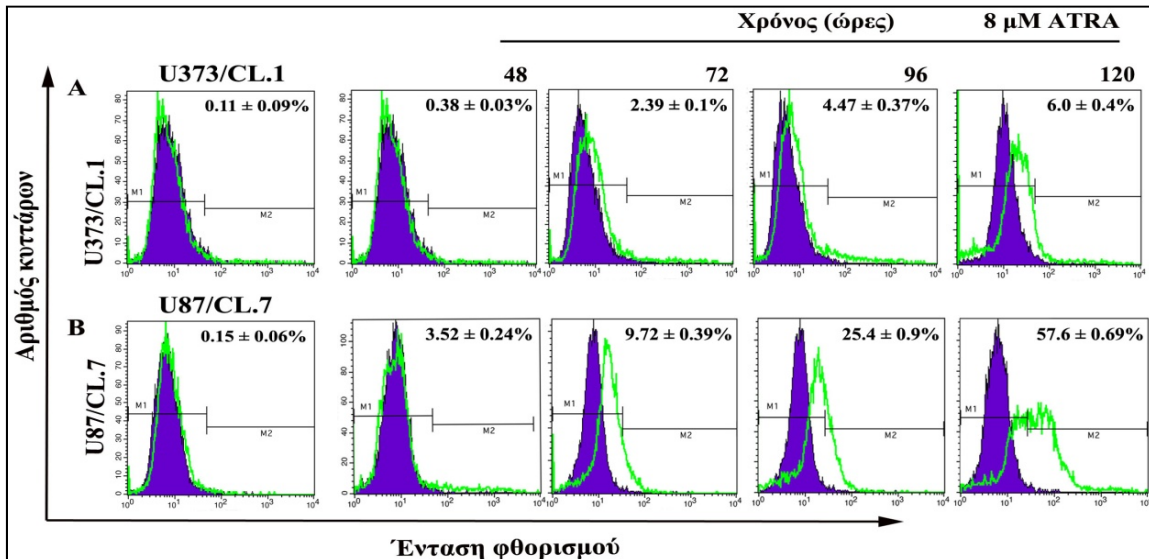
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με FACS απέδειξαν πως η συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 επάγεται κατά τρόπο δοδο-εξαρτώμενο μετά από επίδραση με ATRA και στις δύο κυτταρικές σειρές. Όπως παρατηρείται, η συχνότητα ρετρομετάθεσης επάγεται σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα αυξανόμενης της συγκέντρωσης ATRA. Πιο ειδικά, για τα κύτταρα U373 / κλώνου 1 η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξάνεται από 1.2- μέχρι 3.1% αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας από 1 μέχρι 8 μM . Αντίστοιχα, και για τα κύτταρα U87 / κλώνου 7, βρέθηκε ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ATRA από 1 σε 8 μM το ποσοστό της συχνότητας ρετρομετάθεσης αυξήθηκε αντίστοιχα και σταδιακά από 2 έως 11%.



Εικόνα 3.12: Δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* μετά από επίδραση με ρετινοϊκό οξύ. Ανάλυση με FACS για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε κύτταρα U373/κλώνου 1 (A) ή U87/κλώνου 7 (B), μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρετινοϊκού οξέος, από 1 ως 8 μM , για 72 ώρες. Στη εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές κατανομές φθορισμού των δειγμάτων ελέγχου που αντιστοιχούν σε κύτταρα του εκάστοτε κλώνου με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ATRA (πράσινο χρώμα) και αμεταχειριστων (χωρίς της προσθήκη ATRA) κυττάρων (A) U373/κλώνου 1 ή (B) U87/κλώνου 7, ως μάρτυρα (μωβ χρώμα). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτο-φθορισμού και φθορισμού EGFP, αντίστοιχα.

Σε ένα επόμενο στάδιο θελήσαμε να μελετήσουμε τη δράση του ATRA στην επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης, μετά από έκθεση των κυττάρων σε αυτό, αυτή τη φορά όμως σε εύρος χρόνου. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7, στις ίδιες συνθήκες όπως προηγουμένως, επώαστηκαν με συγκέντρωση 8 μM ATRA για 48, 72, 96 και 120 ώρες, αντίστοιχα και στην συνέχεια μετρήθηκαν με FACS, έχοντας ως μάρτυρα τα αρχικά αμεταχειρίσιμα κύτταρα του κλώνου της κάθε κυτταρικής σειράς (εικόνα 3.13).

Τα αποτελέσματα της εικόνας 3.13 αποδεικνύουν ότι η συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* επάγεται κατά τρόπο χρόνο-εξαρτώμενο μετά από επίδραση με ATRA και στις δύο κυτταρικές σειρές. Πιο ειδικά, για τα κύτταρα U373 / κλώνου 1, η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξάνεται από 0.38 μέχρι 6 % σε αντιστοιχία με την αύξηση του χρόνου επίδρασης των κυττάρων με 8 μM ATRA, από 48 μέχρι 120 ώρες. Ομοίως, και για τα κύτταρα U87 / κλώνου 7, βρέθηκε ότι αυξανόμενου του χρόνου επίδρασης των κυττάρων από 48 μέχρι 120 ώρες, με 8 μM ATRA τα ποσοστά της συχνότητας ρετρομετάθεσης αυξήθηκαν σταδιακά από 3.52- έως το εντυπωσιακό ποσοστό του 57.6 %.

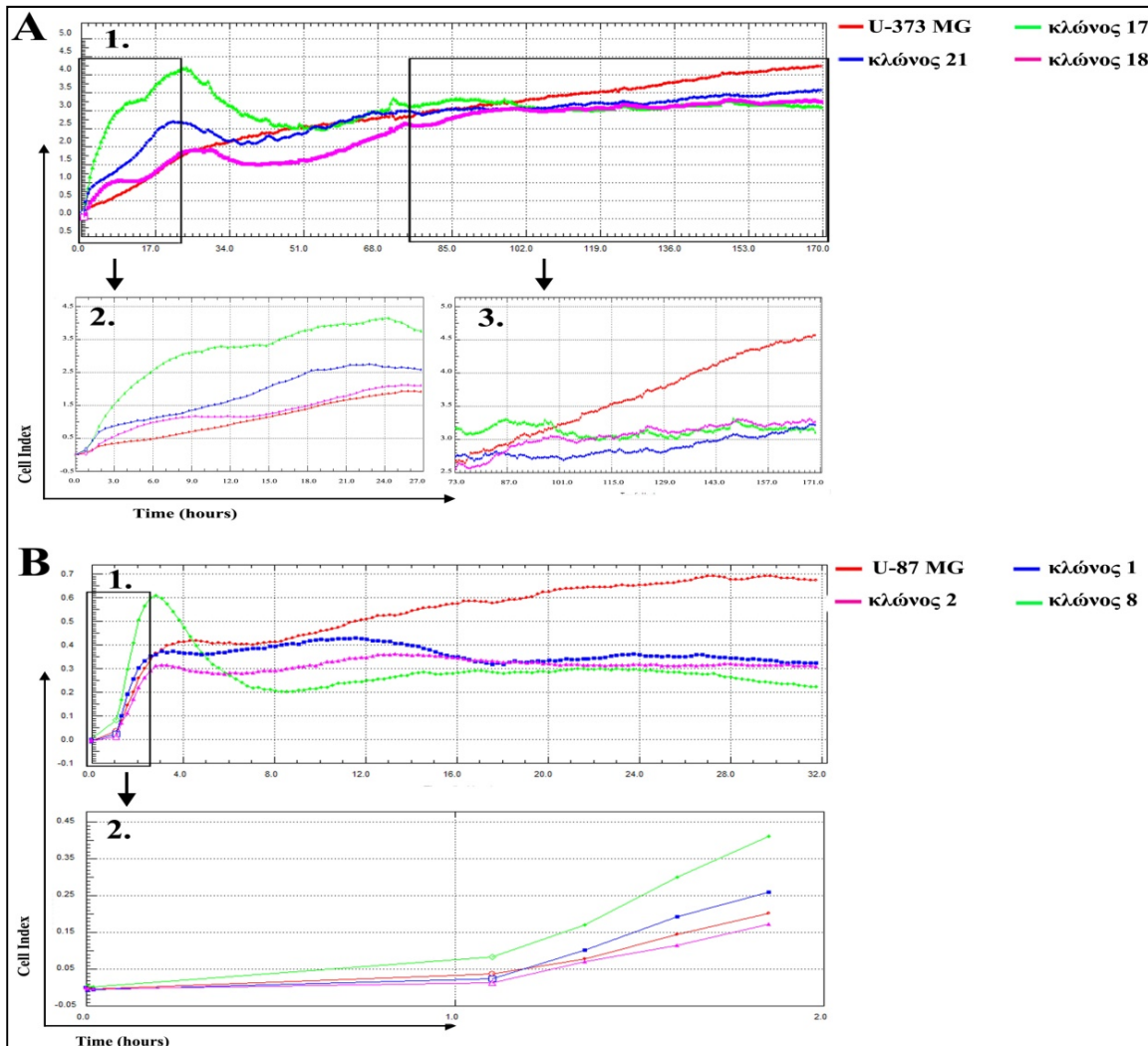


Εικόνα 3.13: Χρονο-εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* μετά από επίδραση με ρετινοϊκό οξύ. Ανάλυση με FACSs για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε κύτταρα U373/κλώνου 1 (A) ή U87/κλώνου 7 (B), μετά από επίδραση με 8 μ M ATRA, για χρόνους από 48 ως 120 ώρες. Στη εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές κατανομές φθορισμού των δειγμάτων ελέγχου που αντιστοιχούν σε αυξανόμενους χρόνους επίδρασης με 8 μ M ATRA (πράσινο χρώμα) και αμεταχειριστων (χωρίς της προσθήκη ATRA) κυττάρων (A) U373/κλώνου 1 ή (B) U87/κλώνου 7, ως μάρτυρας (μωβ χρώμα). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμή. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτο-φθορισμού και φθορισμού EGFP, αντίστοιχα.

3.3 Έλεγχος αναπτυξιακού προφίλ κλώνων U373-HERV-K10 και U87-HERV-K10 θετικών ρετρομετάθεσης.

Έχοντας αποδείξει μορφολογικά και βιοχημικά την διαφοροποίηση των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων και των δύο κυτταρικών σειρών, το επόμενο βήμα της μελέτης μας εστιάστηκε στον έλεγχο του αναπτυξιακού προφίλ των εν λόγω κυττάρων. Είναι γνωστό ότι η επαγωγή κυτταρικής διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρων συνοδεύεται από αλλαγές στον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και πιο ειδικά έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλασιάζονται πιο αργά σε σχέση με τα αντίστοιχα προγονικά κύτταρα. Έχοντας αυτό ως δεδομένο θελήσαμε αρχικά να μελετήσουμε την αναπτυξιακή συμπεριφορά των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, με τη χρήση του αναλυτή RTCA DP (real-time cell analysis). Σε αυτή την κατεύθυνση, 3.500 κανονικά κύτταρα U-373 MG ή U-87 MG, ως μάρτυρες, και αντίστοιχα κυττάρων από τρεις (3) κλώνους, με αυξανόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης και πιστοποιημένη κυτταρική διαφοροποίηση, από κάθε κυτταρική σειρά, αναπτύχθηκαν σε ειδικά πολυτριβλία (E-Plates) σε συγκέντρωση ορού 10%. Η κυτταρική ανάπτυξη στοιχειοθετήθηκε αυτόματα από αναλυτή, μετρώντας τον αριθμό κυττάρων ανά μονάδα χρόνου με την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης (growth curves) κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων και μαρτύρων U-373 MG ή U-87 MG. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων αναγράφεται το Cell Index (CI), που αντιστοιχεί σε μια ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στην μονάδα του χρόνου. Αλλαγές στην κατάσταση των κυττάρων όπως, η μορφολογία, η κυτταρική βιωσιμότητα ή κυτταρική προσκόλληση επηρεάζουν επίσης το CI. Στην εικόνα 3.14 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης για τους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 (κλώνοι 17, 18 και 21) και U87-HERV-K10 (κλώνοι 1, 2 και 8) καθώς και των

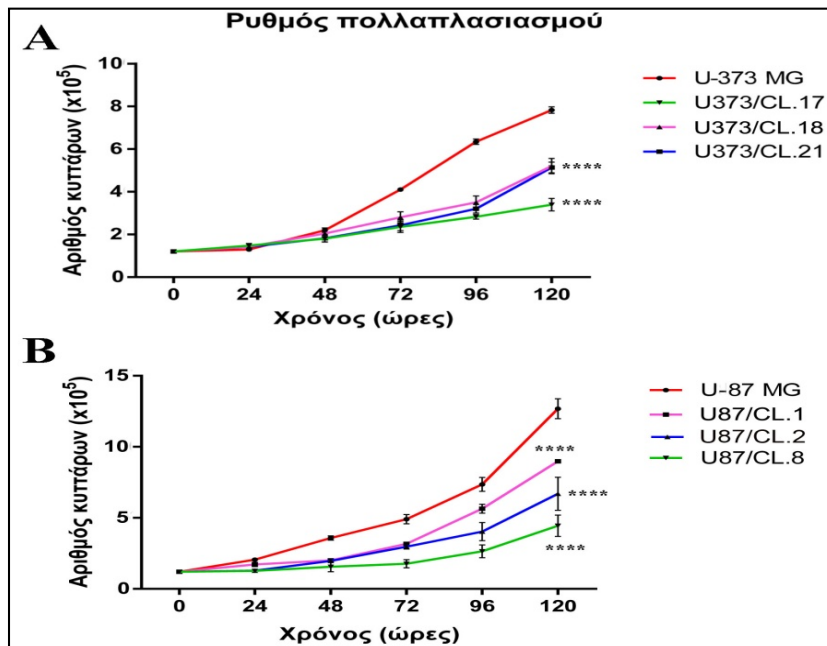
αντίστοιχων ανά περίπτωση κυττάρων-μαρτύρων. Παρατηρώντας τις καμπύλες το πρώτο σημαντικό συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι κατά τις αρχικές ώρες ανάπτυξης των κυττάρων (2 ώρες για τα U87 κύτταρα και 17 ώρες για τα U373, αντίστοιχα) το CI των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U373-HERV-K10 και U87-HERV-K10 είναι σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο για κάθε περίπτωση κυττάρων-μαρτύρων. Ωστόσο, μετά το πέρας των προαναφερθέντων χρονικών διαστημάτων, το CI των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων κάθε περίπτωσης κυττάρων μειώνεται σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα.



Εικόνα 3.14: Αναπτυξιακό προφίλ θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U373-HERV-K10 ή U87-HERV-K10 με την χρήση της τεχνικής RTCA DP-XCelligence. A: 1. Καμπύλες ανάπτυξης θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U373-HERV-K10 (κλώνοι 17, 18 και 21) καθώς και κυττάρων-μάρτυρα ύστερα από 7 ημέρες καλλιέργειας. 2. Εστιασμένη περιοχή γραφήματος κατά τις πρώτες 17 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων. 3. Εστιασμένη περιοχή γραφήματος κατά τις τελευταίες 4 ημέρες καλλιέργειάς τους. B: 1. Καμπύλες ανάπτυξης θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U87-HERV-K10 (κλώνοι 1, 2 και 8) καθώς και κυττάρων-μάρτυρα ύστερα από 48 ώρες καλλιέργειας. 2. Εστιασμένη περιοχή γραφήματος κατά τις πρώτες 2 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων.

Αν και οι καμπύλες ανάπτυξης του προηγούμενου πειράματος αποτελούν μία σαφή ένδειξη του μειωμένου ρυθμού πολλαπλασιασμού των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων, το γεγονός ότι εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες στην διαμόρφωση του CI όπως είναι η

κυτταρική μορφολογία και προσκόλληση, μας οδήγησε στην αναζήτηση μίας πιο αξιόπιστης εκτίμησής του. Για αυτό τον λόγο κρίθηκε αναγκαία η μέτρηση του αριθμού κυττάρων στους προαναφερθέντες τρεις από κάθε περίπτωση κλώνους θετικών-ρετρομετάθεσης καθώς και των αντίστοιχων κυττάρων-μάρτυρα ανά 24ωρο καλλιέργειάς τους. Πιο συγκεκριμένα, 120×10^3 κύτταρα από κάθε κλώνο καθώς και κύτταρα-μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικά τρυβλία και αφέθηκαν προς ανάπτυξη για 5 ημέρες. Ανά 24 ώρες τα κύτταρα θρυψινοποιούνταν και καταμετρούνταν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται σε διαγράμματα (εικόνα 3.15) που κατασκευάστηκαν με την χρήση του προγράμματος GraphPad Prism



Εικόνα 3.15: Ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U373-HERV-K10 ή U87-HERV-K10. Καμπύλες ανάπτυξης θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων (A) U373-HERV-K10 (κλώνοι 17, 18 και 21) ή (B) U87-HERV-K10 (κλώνοι 1, 2 και 8) καθώς και κυττάρων-μάρτυρα από κάθε κυτταρική σειρά, ύστερα από 5 ημέρες καλλιέργειας. Ο ίδιος αριθμός κυττάρων (120×10^3) από κάθε περίπτωση δειγμάτων ελέγχου και μάρτυρα τοποθετήθηκε σε καλλιεργητικά τρυβλία και αφέθηκε προς ανάπτυξη για 5 ημέρες. Σε κάθε χρονικό σημείο, ο αριθμός των κυττάρων εκτιμήθηκε μέσω καταμέτρησης σε αιμοκυτταρόμερο Neubauer. Η κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή του αριθμού των κυττάρων ανά χρονικό σημείο \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (*mean* \pm *s.e.m*) από τρία ανεξάρτητα πειράματα ($n=3$), **** $P < 0.0001$.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.15, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U373-HERV-K10 και U87-HERV-K10 είναι σημαντικά χαμηλότερος συγκριτικά με τα αντίστοιχα για κάθε περίπτωση κύτταρα-μάρτυρες. Μάλιστα, αυξανόμενων τόσο της συχνότητας ρετρομετάθεσης (εικόνες 3.2, 3.3) όσο και των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνικών δεικτών διαφοροποίησης (εικόνες 3.9, 3.11) των κυτταρικών κλώνων που επιλέχθηκαν για το πείραμα, καταγράφονταν ανάλογα ολόένα και χαμηλότεροι ρυθμοί κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επιπλέον, στον πίνακα 3.1 παρατίθενται οι εκτιμώμενοι χρόνοι διπλασιασμού για τα κύτταρα των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων και των αντίστοιχων κυττάρων-μαρτύρων που υπολογίστηκαν με

$$\text{βάση την εξίσωση: } \frac{\text{χρόνος διπλασιασμού}}{\log 2} = \text{χρόνος καλλιέργειας (ώρες)*}$$

$$\frac{\log(\text{τελικός αριθμός κυττάρων}) - \log(\text{αρχικός αριθμός κυττάρων})}{\log 2}$$

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΠΛΑΣΙΑΜΟΥ (ώρες)
U-373 MG	44
Κλώνος 18	55.4
Κλώνος 21	57.14
Κλώνος 17	82.8
U-87 MG	35
Κλώνος 1	40.09
Κλώνος 2	48
Κλώνος 8	63.1

Πίνακας 3.1: Εκτιμώμενος χρόνος διπλασιασμού κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U373-HERV-K10 ή U87-HERV-K10 καθώς και των αντίστοιχων κυττάρων-μάρτυρα U-373 MG ή U-87 MG. Ο υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού (X.Δ) έγινε με βάση την εξίσωση: $X.Δ = \text{χρόνος καλλιέργειας (ώρες)} * \log 2 / [\log(\text{τελικός αριθμός κυττάρων}) - \log(\text{αρχικός αριθμός κυττάρων})]$

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του πίνακα, ο μέσος χρόνος διπλασιασμού για του θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 υπολογίζεται ότι είναι 65.1 ώρες ενώ για τα κύτταρα-μάρτυρες είναι 44 ώρες. Επιπλέον, το μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού (~83 ώρες) καταγράφει ο κλώνος 17 ο οποίος εμφανίζει συγχρόνως την υψηλότερη συχνότητα ρετρομετάθεσης (εικόνα 3.2) καθώς και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του δείκτη διαφοροποίησης GFAP (εικόνα 3.9). Παρομοίως, για τους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10, ο μέσος χρόνος διπλασιασμού υπολογίζεται ότι είναι 50.4 ώρες, ενώ για τα αντίστοιχα κύτταρα-μάρτυρες U-87 MG είναι 35 ώρες. Επιπρόσθετα, ο κλώνος 8 με τα μεγαλύτερα ποσοστά τόσο ρετρομετάθεσης (εικόνα 3.3) όσο και έκφρασης του νευρο-ειδικού δείκτη διαφοροποίησης βIII-τουμπουλίνη (εικόνα 3.11), εμφανίζει συγχρόνως και τον μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού που κυμαίνεται στις 63 ώρες.

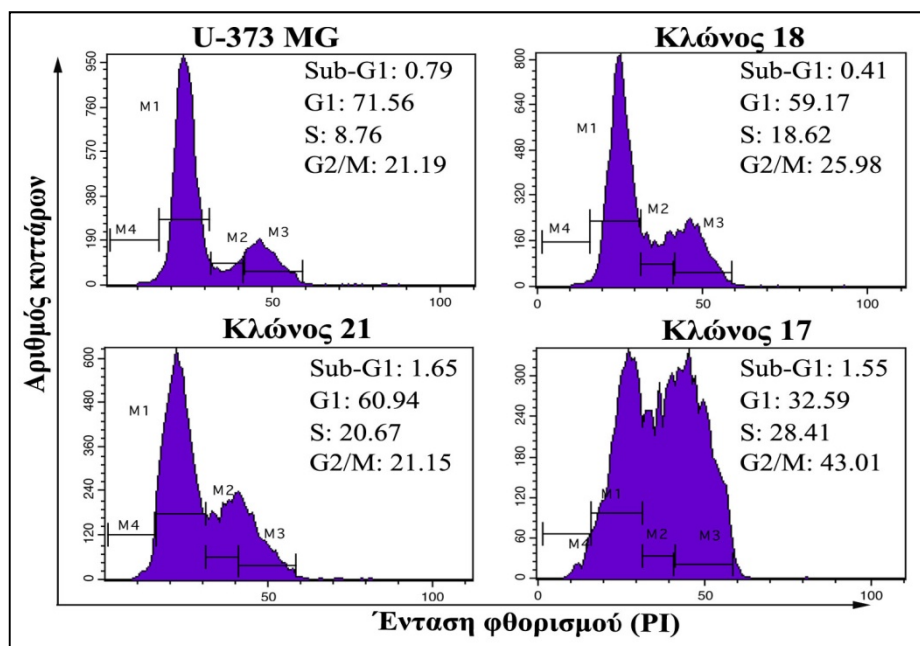
3.3.1 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συσχετίζεται με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U-373- και U-87 MG.

Με δεδομένη την μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων και των δύο κυτταρικών σειρών, το επόμενο βήμα της έρευνάς μας επικεντρώθηκε στην μελέτη του κυτταρικού τους κύκλου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, διαπιστώθηκε μία σημαντική αύξηση του χρόνου διπλασιασμού σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους, που ήταν ανάλογη της αύξησης της συχνότητας ρετρομετάθεσης που εμφάνιζαν οι επιλεγθέντες για το πείραμα κλώνοι. Μα αφορμή αυτές τις παρατηρήσεις θελήσαμε να εξετάσουμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και των υψηλών επιπέδων ρετρομετάθεσης.

Προς αυτή την κατεύθυνση, αναλύσαμε τον κυτταρικό κύκλο των απομονωμένων κλώνων U373-HERV-K10 (κλώνοι 17, 18 και 21) και U87-HERV-K10 (κλώνοι 1, 2 και 8), οι οποίοι εμφάνιζαν διαφορετικές συχνότητες ρετρομετάθεσης. Συγκεκριμένα, κύτταρα των κλώνων αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας και δείγμα 200.000 κυττάρων αφού αρχικά υποβλήθηκε σε χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), αναλύθηκε με FACS για την κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου,

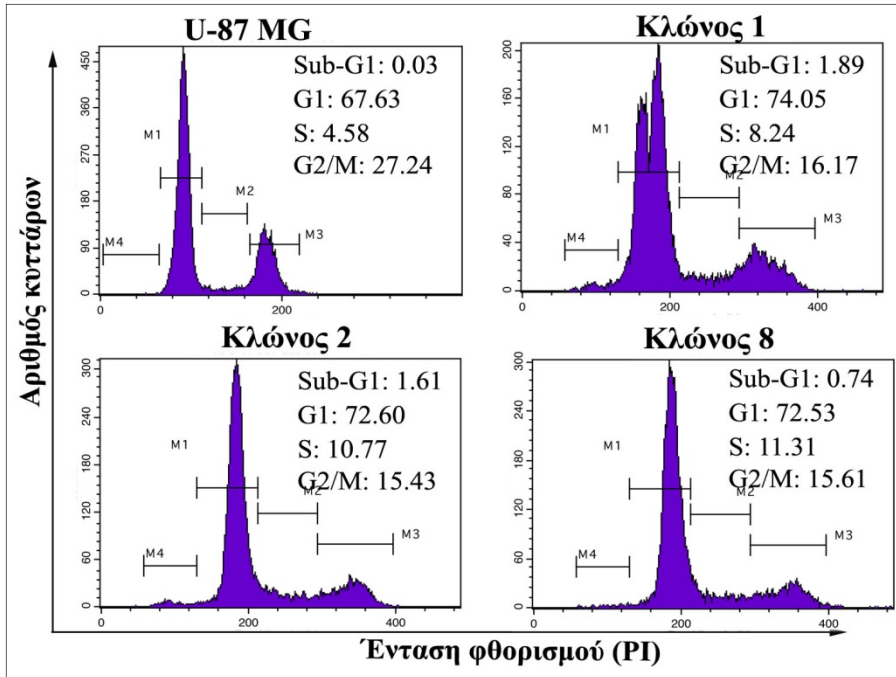
χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μη διαμολυσμένα κύτταρα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς (εικόνα 3.16).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατέδειξαν αναστολή του κυτταρικού κύκλου των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U373-HERV-K10 στις φάσεις S και G2/M, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η ρετρομετάθεση που είχε αρχικά μετρηθεί στους επιλεχθέντες κλώνους αυτού του πειράματος, αυξάνεται κατ' αντιστοιχία και το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται καθηλωμένα στην φάση S. Μάλιστα για τον κλώνο 17 που εμφανίζει την υψηλότερη συχνότητα ρετρομετάθεσης, αυξάνονται σημαντικά τα ποσοστά των κυττάρων που εντοπίζονται στις φάσεις S και G2/M, από 8.76% (κύτταρα-μάρτυρας) σε 28.41% και από 21.19% (κύτταρα-μάρτυρας) σε 43.01%, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.16: Κατανομή φάσεων κυτταρικού κύκλου κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση, U373-HERV-K10. Σε δείγμα 200.000 κυττάρων U373-HERV-K10 κλώνων 17, 18 και 21 πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού βασίστηκε στην χρώση του DNA των υπό μελέτη δειγμάτων με 50 $\mu\text{g/ml}$ ιωδιούχο προπύδιο. Στην εικόνα παρουσιάζονται ιστογραμματικές κατανομές φθορισμού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου για τους υπό μελέτη κλώνους καθώς και αμεταχείριστων κυττάρων U-373 MG ως μάρτυρας. Τα αναγραφόμενα % ποσοστά αντιπροσωπεύουν τους πληθυσμούς των κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. M4:Sub-G1, M1:G0/G1, M2:S, M3:G2/M.

Αναστολή του κυτταρικού κύκλου διαπιστώθηκε και σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10. Και σε αυτή την περίπτωση επιλέχθηκαν για το εν λόγω πείραμα οι κυτταρικοί κλώνοι 1, 2 και 8 με αυξανόμενες συχνότητες ρετρομετάθεσης από 2.66- έως 16.9%, προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης συσχετίζονται με διαταραχές του κυτταρικού τους κύκλου. Η ανάλυση της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, αποκάλυψε μία πληθυσμιακή συσσώρευση των κυττάρων στα σημεία ελέγχου G1 και S. Μάλιστα όσο αυξανόταν η συχνότητα ρετρομετάθεσης, αυξανόταν αναλογικά και το ποσοστό των κυττάρων που εντοπίζονταν στην φάση S (εικόνα 3.17).

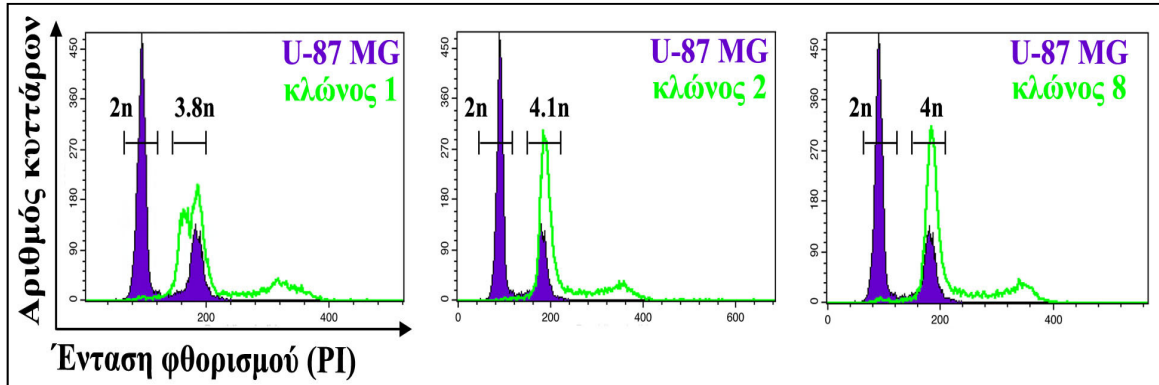


Εικόνα 3.17: Κατανομή φάσεων κυτταρικού κύκλου κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση, U87-HERV-K10. Σε δείγμα 200.000 κυττάρων U87-HERV-K10 κλώνων 1, 2 και 8 πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού βασίστηκε στην χρώση του DNA των υπό μελέτη δειγμάτων με 50 μg/ml ιωδιούχο προπίδιο. Στην εικόνα παρουσιάζονται ιστογραμμιακές κατανομές φθορισμού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου για τους υπό μελέτη κλώνους καθώς και αμεταχείριστων κυττάρων U-87 MG ως μάρτυρα. Τα αναγραφόμενα % ποσοστά αντιπροσωπεύουν τους πληθυσμούς των κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. M4:Sub-G1, M1:G0/G1, M2:S, M3:G2/M.

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι αυξημένος αριθμός γεγονότων ρετρομετάθεσης συσχετίζεται με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου, και συγκεκριμένα με συσσώρευση μεγάλου αριθμού κυττάρων στις φάσεις S και G2/M για την περίπτωση των U373-HERV-K10 κυττάρων, και στις φάσεις G1 και S για την περίπτωση των U87-HERV-K10 κυττάρων, του κυτταρικού κύκλου.

Μελετώντας τα ιστογράμματα του κυτταρικού κύκλου για τους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10 αναδεικνύεται ένα σημαντικό εύρημα σε σχέση με την περιεκτικότητα των εν λόγω κυττάρων σε DNA. Πιο αναλυτικά, οι επικαλύψεις των ιστογραμμάτων του κυτταρικού κύκλου κυττάρων-κλώνων και κυττάρων-μάρτυρα (εικόνα 3.18) αποκαλύπτουν ότι τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα U87-HERV-K10 φέρουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε DNA, γεγονός που μαρτυρά ότι πρόκειται στην ουσία για υπερπλοειδικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Η εκτίμηση της πλοειδίας για τον κάθε ένα από τους υπό μελέτη κλώνους έγινε με βάση τον υπολογισμό του δείκτη DNA (DNA-Index, ID ή Geometrical Mean Fluorescent Index, GMFI). Ο δείκτης ID εκφράζει το πυρηνικό DNA που προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής και ορίζεται ως ο λόγος της ποσότητας του DNA του νεοπλασματικού πληθυσμού στη φάση G1 προς την ποσότητα του DNA του φυσιολογικού πληθυσμού στην ίδια φάση. Στην προκειμένη περίπτωση ως φυσιολογικός πληθυσμός ορίζονται τα κύτταρα του μάρτυρα τα οποία θεωρήσαμε ότι φέρουν τον φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n$), και με βάση τις τιμές των γεωμετρικών μέσων (GMFI) της ποσότητας DNA των κυττάρων αποκλειστικά στην φάση G1, υπολογίστηκε προσεγγιστικά ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στους κλώνους. Ο λόγος που αντιπροσωπεύει τα επιπλέον χρωμοσώματα είναι:

$ID = \frac{GMFI\ G1\ (\kappa\lambda\omega\nu\sigma\upsilon)}{GMFI\ G1\ (\mu\acute{\alpha}\rho\tau\upsilon\rho\alpha)}$. Οι τιμές των γεωμετρικών μέσων (GMFI) της ποσότητας του DNA που εμπεριέχεται στα κύτταρα της φάσης G1 δίδεται από τα στατιστικά δεδομένα του αναλυτή κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 3.18: Εκτίμηση υπερπλοειδίας των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U87-HERV-K10. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι επικαλύψεις ιστογραμμάτων του κυτταρικού κύκλου κυττάρων κλώνων-θετικών ρετρομετάθεσης (πράσινο χρώμα) και κυττάρων μάρτυρα (μωβ χρώμα). Η πλοειδία των κυττάρων-μάρτυρα U-87 MG που εντοπίζονται στη φάση G1, ορίστηκε ως 2n. Η πλοειδία των κυττάρων ελέγχου υπολογίστηκε με βάση τον γεωμετρικό μέσο (GMFI) της ποσότητας DNA των κυττάρων που εντοπίζονται στην φάση G1.

Όλοι οι υπό μελέτη θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι U87-HERV-K10 βρέθηκαν υπερπλοειδικοί γεγονός που συνεπάγεται την παρουσία επιπλέον χρωμοσωμάτων σε αυτούς.

3.4 Συσχέτιση της ρετρομετάθεσης HERV-K10 με τον σχηματισμό νευροσφαιρών υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης σε κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος.

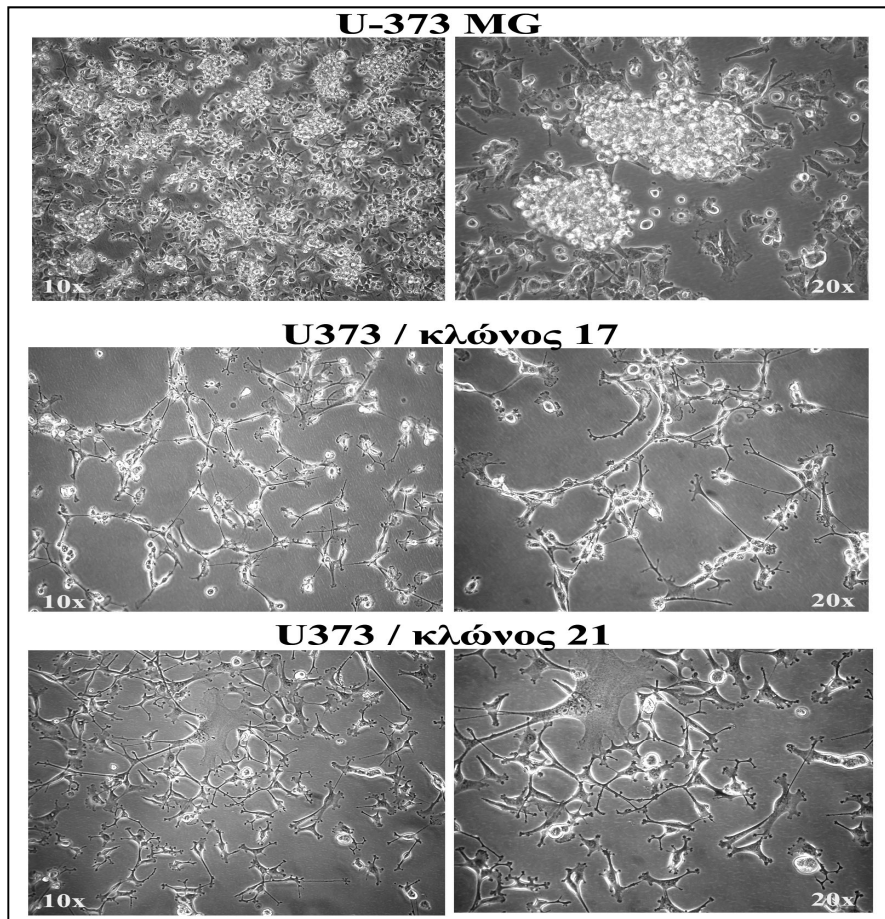
Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού από έναν κυτταρικό τύπο Α προς έναν άλλον κυτταρικό τύπο Β μπορεί να λάβουν χώρα άμεσα ή με την παρουσία ενδιάμεσων πολυδύναμων σταδίων. Στην δεύτερη περίπτωση, προβλέπεται ότι το αρχικό κύτταρο που είναι δεσμευμένο σε μία συγκεκριμένη κυτταρική γενεαλογία από-διαφοροποιείται προς έναν προγονικό/βλαστικό στάδιο, που χαρακτηρίζεται από ένα πιο διευρυμένο δυναμικό διαφοροποίησης, και εν συνεχεία διαφοροποιείται προς έναν εντελώς διαφορετικό κυτταρικό τύπο. Στην περίπτωση των νευρογλοιακών κυττάρων η παρουσία προγονικών/βλαστικών σταδίων δύναται να ελεγχθεί μέσω της καλλιέργειάς τους σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα και υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης όπου αμφότερα ευνοούν τον σχηματισμό κυτταρικών συσσωματωμάτων, γνωστών ως νευρόσφαιρες. Οι νευρόσφαιρες είναι συνήθως επιπλέουσες στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και περιλαμβάνουν έναν κυτταρικό υποπληθυσμό, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία είναι σε θέση να αυτό-ανανεώνονται αλλά και να διαφοροποιούνται στους διάφορους κυτταρικούς τύπους του Κ.Ν.Σ.

Η κυτταρική ετερογένεια που χαρακτηρίζει τον νευρικό ιστό πολύ συχνά χαρακτηρίζει και έναν ενδοκρανιακό όγκο. Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αποτελεί μία τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση έντονης κυτταρικής ετερογένειας, για την οποία εικάζεται πως

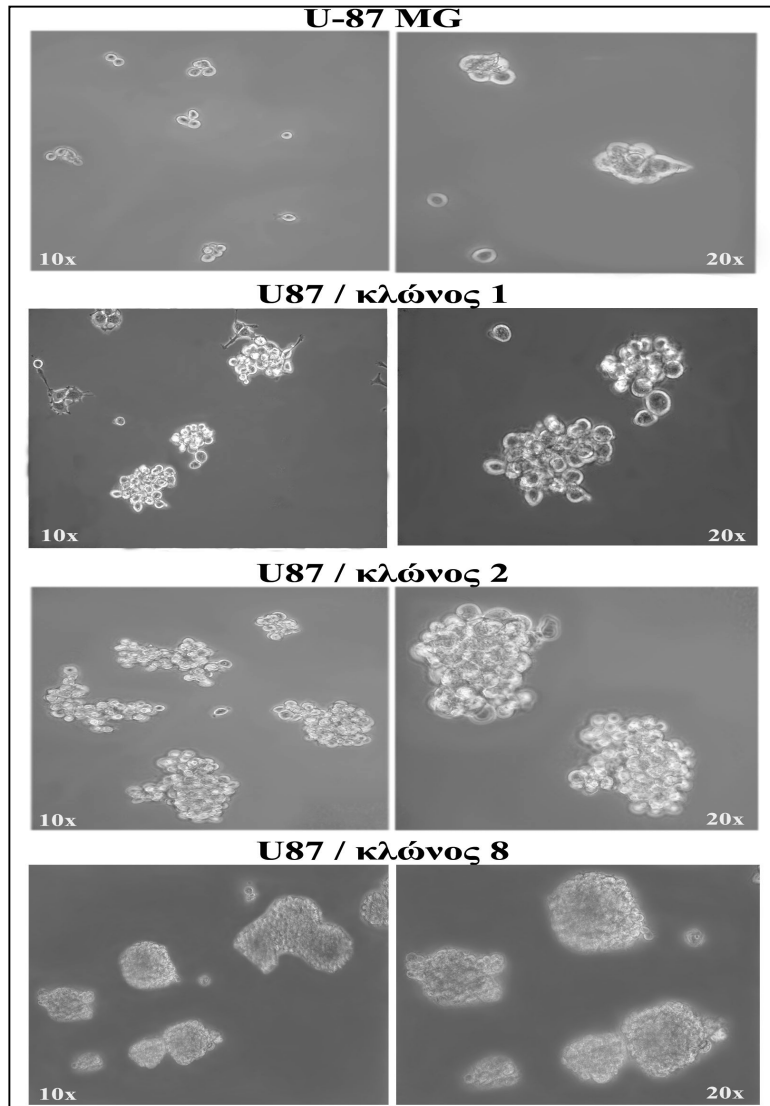
ευθύνονται τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μοιράζονται κάποιες κοινές ιδιότητες με τα κανονικά, με τις σημαντικότερες εξ' αυτών να είναι η αυτό-ανανέωση και η πολυδυναμία. Επιπλέον, σχηματίζουν και αυτά νευρόσφαιρες όταν καλλιεργούνται υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης και απουσίας ορού. Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου να σχηματίζουν εύρωστες νευρόσφαιρες θεωρείται ως ένας πιθανώς σημαντικός προγνωστικός δείκτης κακοήθειας.

Σε αυτή την κατεύθυνση θελήσαμε να διερευνήσουμε αν κύτταρα κλώνων U373- και U87-θετικών σε ρετρομετάθεση ήταν ικανά: (α) να αναπτύσσονται ανεξάρτητα προσκόλλησης και (β) να σχηματίζουν νευρόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης.

Προκειμένου να εξεταστεί η υπόθεση αυτή, τρεις χαρακτηριστικοί κλώνοι από κάθε κυτταρική σειρά με αυξανόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης και έντονη μεταβολή φαινοτύπου, αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε τρυβλία μειωμένης προσκόλλησης (βακτηριακά τρυβλία, Petri), τα οποία στερούνται κατάλληλου υλικού κυτταρικής προσκόλλησης. Μετά το πέρας τεσσάρων ημερών καλλιέργειάς τους ελήφθησαν φωτογραφίες από διάφορα χαρακτηριστικά πεδία της εκάστοτε καλλιέργειας (Εικόνες 3.19 και 3.20).



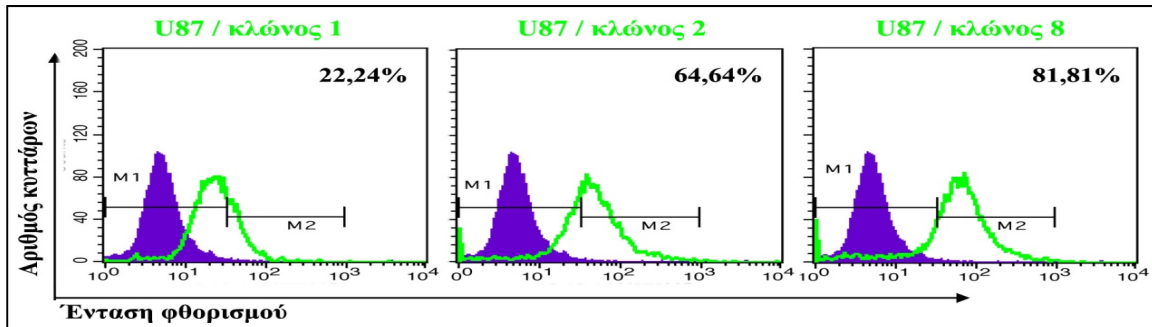
Εικόνα 3.19: Ανάπτυξη θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων U373-HERV-K10 υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. Κύτταρα U-373 MG ως μάρτυρας καθώς και κύτταρα κλώνων-θετικών σε ρετρομετάθεση (κλώνοι 17 και 21), αφέθηκαν προς ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία. Μετά το πέρας τεσσάρων ημερών καλλιέργειας φωτογραφήθηκαν χαρακτηριστικά πεδία της εκάστοτε καλλιέργειας σε μεγέθυνση 10- και 20X. Παρουσιάζονται φωτογραφίες που ελήφθησαν από τους αντιπροσωπευτικούς κλώνους 17 και 21.



Εικόνα 3.20: Σχηματισμός νευροσφαιρών ύστερα από ανάπτυξη θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων U87-HERV-K10 υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. Κύτταρα U-87 MG ως μάρτυρας καθώς και κύτταρα κλώνων-θετικών σε ρετρομετάθεση (κλώνοι 1, 2, και 8), αφέθησαν προς ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία. Μετά το πέρας τεσσάρων ημερών φωτογραφήθηκαν χαρακτηριστικά πεδία της εκάστοτε καλλιέργειας σε μεγέθυνση 10- και 20X. Παρουσιάζονται φωτογραφίες που ελήφθησαν από τους αντιπροσωπευτικούς κλώνους 1, 2 και 8.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.19 και 3.20 τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την άνωθεν πειραματική διαδικασία ήταν αρκετά διαφοροποιημένα για τις δύο κυτταρικές σειρές. Στην εικόνα 3.19 φαίνεται ότι οι U373-θετικοί σε ρετρομετάθεση κλώνοι 17 και 21 αναπτύσσονται κανονικά στο βακτηριακό τρυβλίο χωρίς να επηρεάζονται από την απουσία κατάλληλου προσκολλητικού υποστρώματος. Στον αντίποδα, τα μη διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα-μάρτυρες σχηματίζουν εκτεταμένα κυτταρικά συσσωματώματα τα οποία είναι προσκολλημένα στο ταπήτιο του καλλιεργητικού σκεύους. Αντίθετα, στην περίπτωση των κυττάρων U87 η εικόνα των αποτελεσμάτων είναι η αντίστροφη. Ενώ τα κύτταρα-μάρτυρες στην τέταρτη ημέρα καλλιέργειάς τους σε βακτηριακά τρυβλία, σχηματίζουν μικρά σε αριθμό και μέγεθος κυτταρικά συσσωματώματα, οι θετικοί-ρετρομετάθεσης κλώνοι 1, 2 και 8 διαμορφώνουν πολλές και μεγάλες επιπλέουσες σφαιρικές δομές.

Αμέσως μετά την διαπίστωση ότι οι κλώνοι 1, 2 και 8 σχηματίζουν επιπλέοντα κυτταρικά συσσωματώματα υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης, θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα να πραγματοποιούνται γεγονότα ρετρομετάθεσης σε αυτά. Για αυτό τον λόγο, τα κυτταρικά αυτά συσσωματώματα θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο ύπαρξης EGFP-θετικών κυττάρων σε αυτά. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα U-87 MG (εικόνα 3.21).



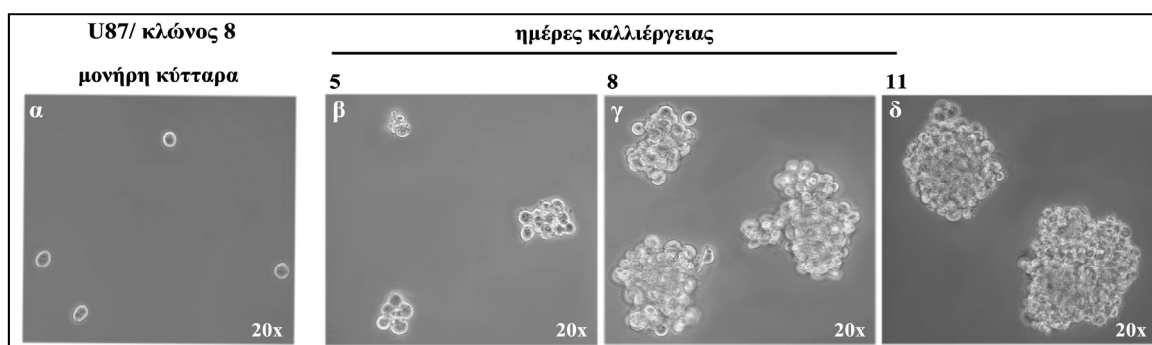
Εικόνα 3.21: Μέτρηση συχνότητας ρετρομετάθεσης σε επιπλέοντες δομές θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων 1, 2 και 8 κυττάρων U87-HERV-K10. Κύτταρα κλώνων-θετικών σε ρετρομετάθεση (κλώνοι 1, 2, και 8), αφέθησαν προς ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία. Μετά το πέρας τεσσάρων ημερών οι προκύπτουσες κυτταρικές δομές θρυψινοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με FACS για τον έλεγχο πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απεικονίζονται ως επικαλύψεις κατανομών έντασης φθορισμού, μη διαμολυσμένων κυττάρων U-87 MG ως μάρτυρας (μωβ) και εκείνων του εκάστοτε δείγματος ελέγχου (πράσινο). M1, M2: κατώφλια έντασης φθορισμού αρνητικών και EGFP-θετικών κυττάρων, αντίστοιχα. Εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αναγράφονται τα ποσοστά ρετρομετάθεσης που προέκυψαν.

Με έκπληξη διαπιστώθηκε ότι σε αυτές τις δομές πραγματοποιούνται γεγονότα ρετρομετάθεσης σε εξαιρετικά ασυνήθιστες υψηλές συχνότητες. Τα καταγεγραμμένα ποσοστά ρετρομετάθεσης για τις επιπλέοντες δομές των κλώνων 1, 2 και 8 ήταν της τάξης του 22-, 65- και 82%, αντίστοιχα, παρέχοντας μία πρώτη ένδειξη πιθανούς συσχέτισης της ρετρομετάθεσης με επαγωγή σχηματισμού νευροσφαιρών και καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

3.4.1 Έλεγχος της ικανότητας αυτό-ανανέωσης των θετικών σε ρετρομετάθεση νευροσφαιρών U87-HERV-K10

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως μία από τις βασικές ιδιότητες των νευροσφαιρών είναι η δυνατότητά τους να αυτό-ανανεώνονται δίνοντας γένεση σε δευτερογενείς, τριτογενείς και ούτω καθεξής νευρόσφαιρες. Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα αυτό-ανανέωσης των παραγόμενων νευροσφαιρών ακολουθήσαμε την παρακάτω προσέγγιση.

Οι πρωτογενείς νευρόσφαιρες των θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων του προηγούμενου πειράματος (κλώνοι 1, 2 και 8), συλλέχθηκαν από το υπερκείμενο της καλλιέργειας, θρυψινοποιήθηκαν σε μονήρη κύτταρα και μεταφέρθηκαν εκ νέου σε βακτηριακά τρυβλία όπου και αφέθησαν να αναπτυχθούν για 11 περίπου ημέρες. Σε τακτά χρονικά διαστήματα οι αναπτυσσόμενες νευρόσφαιρες φωτογραφίζονταν (εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.22: Ικανότητα αυτό-ανανέωσης των θετικών σε ρετρομετάθεση νευροσφαιρών U87-HERV-K10. Επιπλέονσες πρωτογενείς νευρόσφαιρες κυττάρων U87-HERV-K10 συλλέχθηκαν από το υπερκείμενο της καλλιέργειας, θρυψινοποιήθηκαν και αφέθησαν για ανάπτυξη σε βακτηριακά τρυβλία ως μονήρη κύτταρα. Παρατίθενται χαρακτηριστικά πεδία φωτογράφισης των κυττάρων: (α) ως μονήρη κύτταρα, 30 λεπτά μετά την μεταφορά τους σε βακτηριακά τρυβλία, (β) ως νεοσχηματιζόμενες νευρόσφαιρες μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας, (γ, δ) ως αναπτυσσόμενες νευρόσφαιρες μετά από 8 και 11 ημέρες καλλιέργειας, αντίστοιχα.

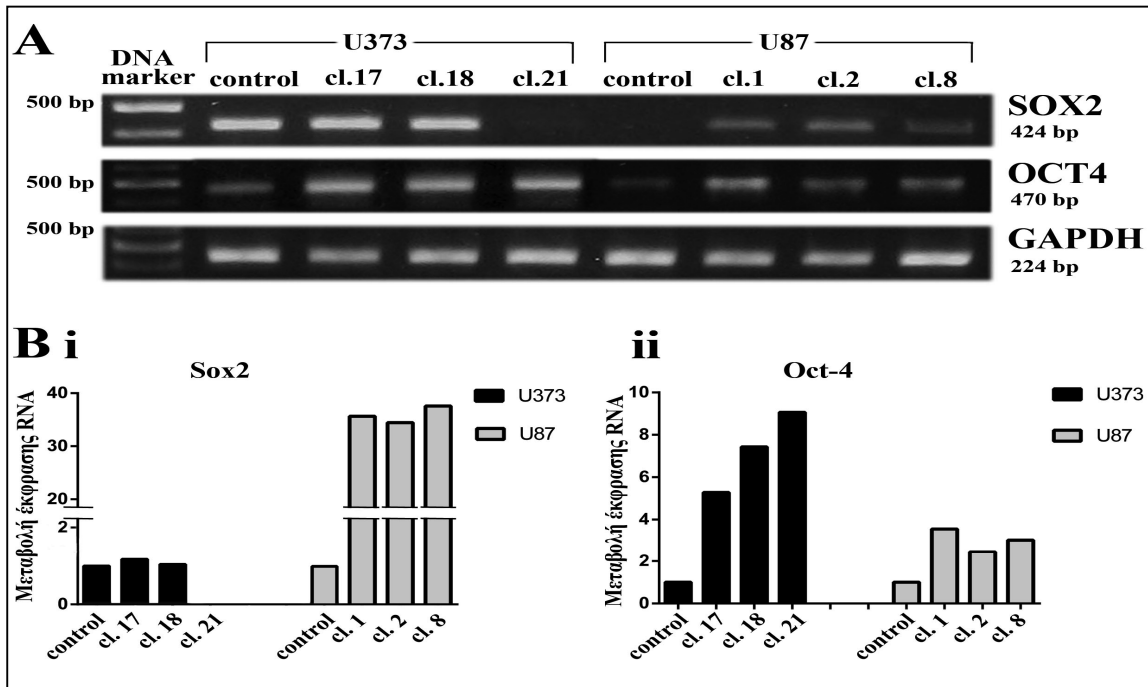
Παρατηρώντας την εξέλιξη της ανάπτυξης των κυττάρων στην εικόνα 3.22, διαπιστώνεται ότι τα μονήρη κύτταρα των πρωτογενών νευροσφαιρών ήταν σε θέση να παράξουν δευτερογενείς νευρόσφαιρες οι οποίες αυξάνονταν σε μέγεθος με την πάροδο του χρόνου καλλιέργειάς τους. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης των παραγόμενων από U87-θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους νευροσφαιρών.

3.4.2 Έλεγχος της έκφρασης μοριακών δεικτών βλαστικότητας σε κύτταρα U373- και U87- θετικά ρετρομετάθεσης

Το επόμενο βήμα προς την κατεύθυνση χαρακτηρισμού των παραγόμενων από θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα νευροσφαιρών, ήταν η ανίχνευση ειδικών δεικτών που χαρακτηρίζουν εκείνα τα κύτταρα εντός των νευροσφαιρών που φέρουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Μερικοί χαρακτηριστικοί δείκτες βλαστικότητας είναι οι: Νεστίνη, Sox2, Oct-4, και CD133.

Σε ένα πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης mRNA των γονιδίων βλαστικότητας Sox2 και Oct-4 σε απομονωμένα κύτταρα νευροσφαιρών θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U87-HERV-K10, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες U-87 MG. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε RT-PCR για τα προαναφερθέντα γονίδια και σε κύτταρα κλώνων-θετικών σε ρετρομετάθεση U373-HERV-K10. Οι κλώνοι αυτοί αν και δεν παρήγαγαν νευρόσφαιρες όταν καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης, εντούτοις χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα αναφορικά με τον έλεγχο της βλαστικότητας ως αρνητικοί μάρτυρες.

Στην περίπτωση των κυττάρων U87-HERV-K10 όπως αναμένονταν παρατηρήθηκε επαγωγή της mRNA έκφρασης και των δύο εξεταζόμενων γονιδίων. Πιο ειδικά, για τους κλώνους 1, 2 και 8 η έκφραση του γονιδίου Sox2 αυξήθηκε κατά ~36, 34 και 37 φορές αντίστοιχα, ενώ ανάλογη επαγωγή καταγράφηκε και στην mRNA έκφραση του γονιδίου Oct-4 κατά ~3.5, 3.4 και 3 φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά πιστοποιούν ότι τα σχηματιζόμενα σφαιρικά συσσωματώματα που προκύπτουν από την καλλιέργεια θετικών-ρετρομετάθεσης κλώνων U87-HERV-K10, υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης, πρόκειται όντως για νευρόσφαιρες που αντιπροσωπεύουν μία ενδιάμεση προγονική/βλαστική κατάσταση (εικόνα 3.23).



Εικόνα 3.23: Μεταβολή της mRNA έκφρασης των γονιδίων Sox2 και Oct-4 σε θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα U373 και U87. Κύτταρα κλώνων U373-HERV-K10 (17, 18 και 21), U87-HERV-K10 (1, 2 και 8) καθώς και αντίστοιχων μη διαμολυσμένων κυττάρων- μάρτυρες (U-373 MG και U-87 MG) καλλιεργήθηκαν για 5 ημέρες σε βακτηριακά τρυβλία και κατόπιν χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA. Ποσότητα 1 μ g RNA υπέστη αντίστροφη μεταγραφή και ακολούθως 8 μ g cDNA χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις PCR. **A.** Προφίλ ηλεκτροφόρησης 18 μ l προϊόντων αντίδρασης δειγμάτων σε πηκτή αραρόζης 1.2%. **B.** Ιστόγραμμα ποσοτικής απεικόνισης της μεταβολής έκφρασης mRNA των γονιδίων Sox2 (i) και Oct-4 (ii). Μέσω πυκνομετρικής μέτρησης των ζωνών της εικόνας A υπολογίστηκε η μεταβολή της RNA έκφρασης των προς μελέτη μεταγράφων κανονικοποιώντας με την αντίστοιχη έκφραση της GAPDH. Η σύγκριση έγινε με βάση το προφίλ της mRNA έκφρασης των Sox2 και Oct-4 σε μη διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα-μάρτυρες U-373 MG και U-87 MG, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των κυττάρων U373/HERV-K10 δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην mRNA έκφραση του γονιδίου Sox2, με εξαίρεση τα κλώνο 21 στον οποίο φαίνεται πως χάνεται ολοσχερώς. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στους ίδιους κλώνους παρατηρήθηκε επαγωγή της mRNA έκφρασης του γονιδίου Oct-4 κατά ~5.3, 7.4 και 9 φορές. Δεδομένου ότι οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι U373-HERV-K10 δεν σχηματίζουν νευρόσφαιρες, αλλά αντιθέτως αναπτύσσονται προσκολλόμενα και διατηρώντας τον διαφοροποιημένο φαινότυπο υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης, η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων βλαστικότητας αποτέλεσε ένα παράδοξο, μη αναμενόμενο αποτέλεσμα. Για τον λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητος ο έλεγχος της έκφρασης των δεικτών βλαστικότητας Sox2 και Oct-4 και σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Σε αυτή την κατεύθυνση, κύτταρα κλώνων-θετικών ρετρομετάθεσης U373 και U87 καθώς και των αντίστοιχων κυττάρων-μάρτυρες μεταφέρθηκαν σε βακτηριακά τρυβλία και αφέθησαν σε καλλιέργεια για 5 περίπου ημέρες, ούτως ώστε να σχηματιστούν οι επιπλεύουσες νευρόσφαιρες (για τους U87-HERV-K10 κλώνους). Κατόπιν, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τόσο από τις επιπλεύουσες νευρόσφαιρες των U87-HERV-K10 κλώνων, όσο και από τα προσκολλόμενα κύτταρα κλώνων U373-HERV-K10, και

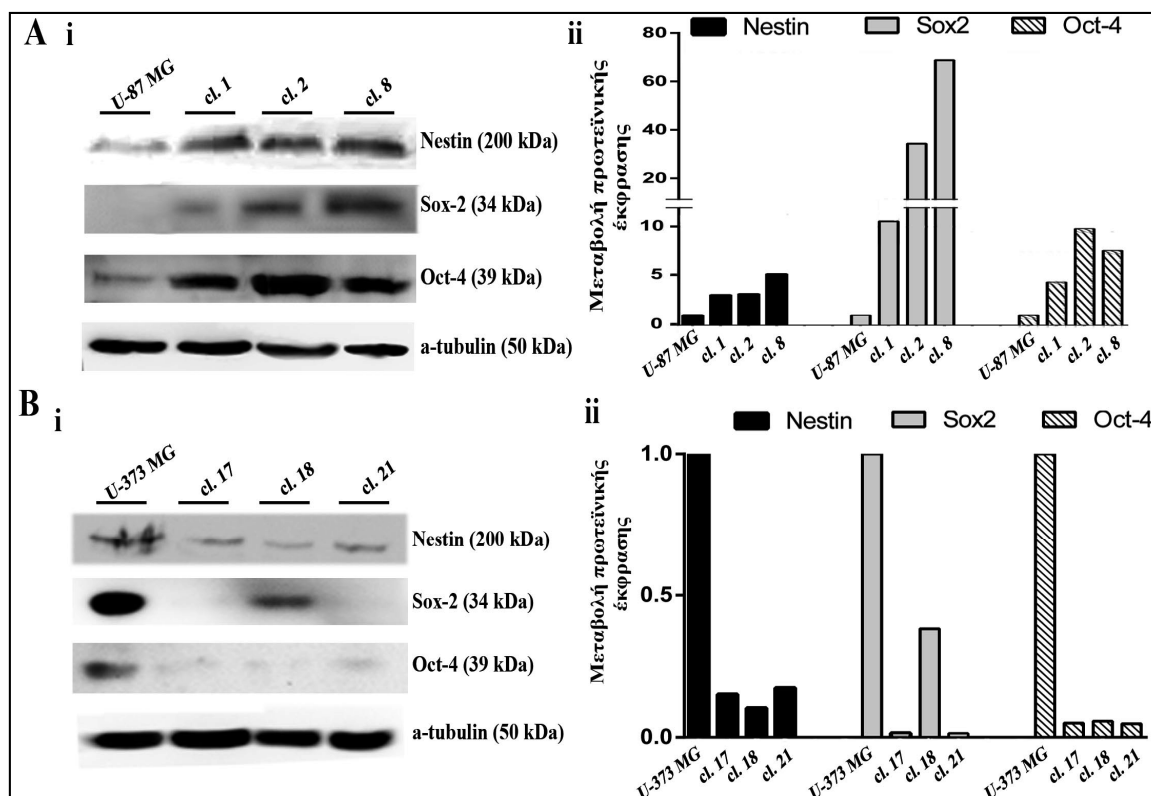
πραγματοποιήθηκε ανοσο-αποτύπωση κατά Western για την εξέταση της πρωτεϊνικής έκφρασης των νεστίνη, Sox2 και Oct-4 (εικόνα 3.24).

Στην περίπτωση των θετικών-ρετρομετάθεσης νευροσφαιρών που σχηματίστηκαν από τους κλώνους 1, 2 και 8 των κυττάρων U87, επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της RT-PCR, καθώς αποδείχθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο η επαγωγή της έκφρασης των Sox2 και Oct-4. Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Sox2 αυξήθηκαν κατά ~11, 34 και 70 φορές στους κλώνους 1, 2 και 8, αντίστοιχα, ενώ σημαντική αύξηση καταγράφηκε και στην πρωτεϊνική έκφραση της Oct-4 κατά ~4, 10 και 7 φορές. Επιπλέον στους ίδιους κλώνους διαπιστώθηκε και επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης νεστίνη, κατά ~3, 3.2 και 5.1 φορές, αντίστοιχα.

Συνολικά λοιπόν τα δεδομένα τόσο της RT-PCR όσο και της ανοσο-αποτύπωσης κατά Western παρέχουν σημαντική πληροφορία ότι οι θετικές σε ρετρομετάθεση νευροσφαιρες των U87 κλώνων φέρουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Στην περίπτωση των U373-HERV-K10 κυττάρων, η ανοσο-αποτύπωση κατά Western αποκάλυψε ότι στους κλώνους 17 και 21 η έκφραση της Sox2 χάνεται εντελώς, ενώ στον κλώνο 18 μειώνεται κατά ~62 φορές. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι και στους τρεις εξεταζόμενους κλώνους η πρωτεϊνική έκφραση της Oct-4 χάνεται ολοσχερώς. Τέλος, και η νεστίνη μειορρυθμίζεται στους κλώνους 17, 18 και 21 καθώς διαπιστώθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης της κατά ~6.7, 10 και 6 φορές, αντίστοιχα, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Από τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό και με τα δεδομένα που ελήφθησαν από την RT-PCR διαφαίνεται ότι ενώ σε επίπεδο mRNA παρατηρείται έκφραση των Sox2 και Oct-4, δεν διαπιστώνεται ανάλογη έκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια.



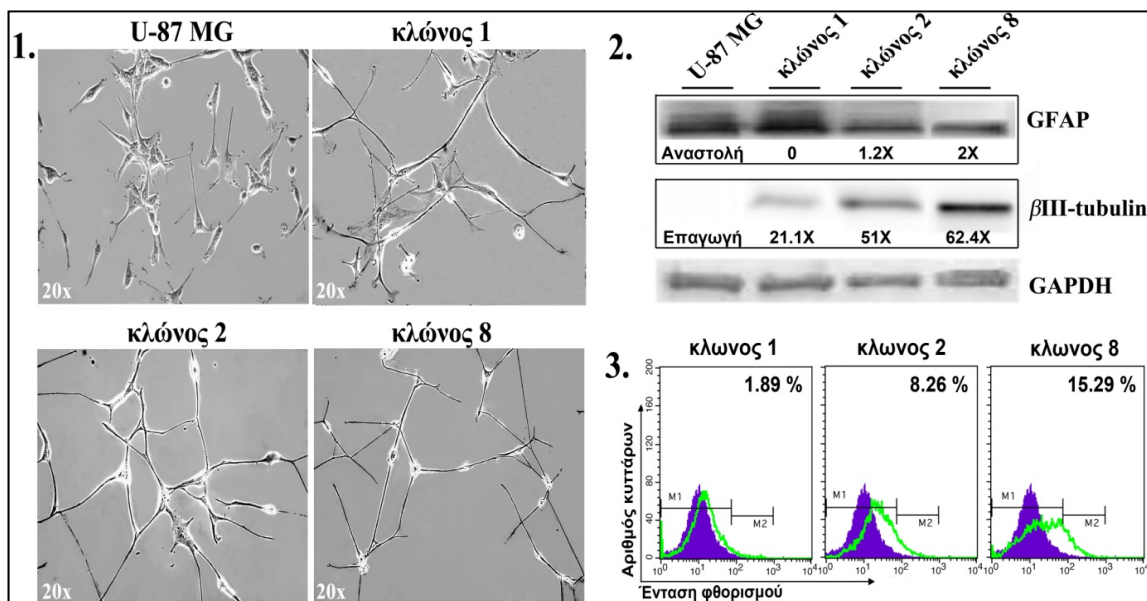
Εικόνα 3.24: Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Νεστίνη, Sox2 και Oct-4 σε κύτταρα U373- και U87- θετικά ρετρομετάθεσης. Κύτταρα κλώνων U373-HERV-K10 (17, 18 και

21), U87-HERV-K10 (1, 2 και 8) καθώς και αντίστοιχων μη διαμολυσμένων με το ρετροτρανσποζόνιο κυττάρων- μάρτυρες (U-373 MG ή U-87 MG) καλλιεργήθηκαν για 5 ημέρες σε βακτηριακά τρυβλία και κατόπιν χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. 40 μg πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 10% δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μεταχειρίστηκαν με τα αντισώματα έναντι των Νεστίνης, Sox2, Oct-4 και α-τουμπουλίνης για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν δευτεροταγή αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο της ραφανικής υπεροξειδάσης (HRP). A(i), B(i): Στο πάνω μέρος των εικόνων αναγράφονται οι κυτταρικοί κλώνοι και στο δεξί μέρος τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών στις οποίες δεσμεύονται. A(ii) B(ii): Ιστογράμματα ποσοτικής απεικόνισης της μεταβολής της πρωτεϊνικής έκφρασης των Νεστίνης, Sox2 και Oct-4 σε κλώνους-θετικούς ρετρομετάθεσης, συγκριτικά με κύτταρα U-373 MG ή U-87 MG, αντίστοιχα, ως μάρτυρες.

3.4.3 Οι θετικές σε ρετρομετάθεση νευρόσφαιρες U87-HERV-K10 διαφοροποιούνται σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι νευρόσφαιρες αποτελούν αδιαφοροποίητα βλαστικά/προγονικά κύτταρα τα οποία φέρουν τις αξιοσημείωτες ιδιότητες της αυτό-ανανέωσης και της διαφοροποίησης στους δύο βασικούς κυτταρικούς τύπους του νευρικού ιστού που είναι η γλοία και τα νευρικά κύτταρα. Έχοντας αποδείξει την αυτό-ανανέωση των παραγόμενων από θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10 νευροσφαιρών, επόμενο βήμα της μελέτης μας ήταν η απόδειξη του πολλαπλού δυναμικού διαφοροποίησής τους. Σε αυτήν την κατεύθυνση, οι επιπλεύουσες νευρόσφαιρες των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων 1, 2 και 8 συλλέχθηκαν από το υπερκείμενο της εκάστοτε καλλιέργειας, θρυψινοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν εκ νέου σε κανονικά καλλιεργητικά τρυβλία. Υπό συνθήκες κανονικής καλλιέργειας, προσκολλήθηκαν στο ταπήτιο του σκεύους όπου αναπτύχθηκαν κανονικά σχηματίζοντας μονοστιβάδα (monolayer), και μετά το πέρας 48 ωρών περίπου φωτογραφήθηκαν χαρακτηριστικά πεδία από την εκάστοτε καλλιέργεια. Ο διαφοροποιημένος φαινότυπος επιβεβαιώθηκε εκ νέου με ανοσοαποτυπωση κατά Western η οποία κατέδειξε επαγωγή της έκφρασης τόσο της αστρογλοιακής πρωτεΐνης GFAP όσο και του νευρο-ειδικού δείκτη της βIII- τουμπουλίνης στους κλώνους 1, 2 και 8. Τέλος, μετά το πέρας 48 ωρών καλλιέργειας των νευροσφαιρών σε κανονικά καλλιεργητικά σκεύη, τα διαφοροποιημένα πλέον κύτταρα κάθε κλώνου μετρήθηκαν εκ νέου με FACS για να διαπιστωθεί αν κατά την διαφοροποίησή τους μεταβλήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.25, τα κύτταρα-μάρτυρας U-87 MG διαφοροποιούνται αποκλειστικά προς αστροκύτταρα όπως αποδεικνύεται τόσο από τον φαινότυπό τους, όσο και από το γεγονός ότι εμφανίζονται θετικά στην έκφραση της GFAP και αρνητικά στην έκφραση της βIII-τουμπουλίνης. Αντίθετα, οι θετικές ρετρομετάθεσης νευρόσφαιρες των κλώνων 1, 2 και 8 διαφοροποιούνται τόσο προς την αστρογλοιακή (GFAP-θετικά), όσο και προς την νευρωνική κατεύθυνση (βIII-τουμπουλίνη-θετικά). Συγχρόνως, η συχνότητα ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε για τα διαφοροποιημένα κύτταρα ήταν της τάξης του ~ 2-, 8- και 15.3%, καταγράφοντας μεγάλη πτώση συγκριτικά με τα ποσοστά εκείνα που είχαν μετρηθεί στις αντίστοιχες νευρόσφαιρες των εν λόγω κλώνων.



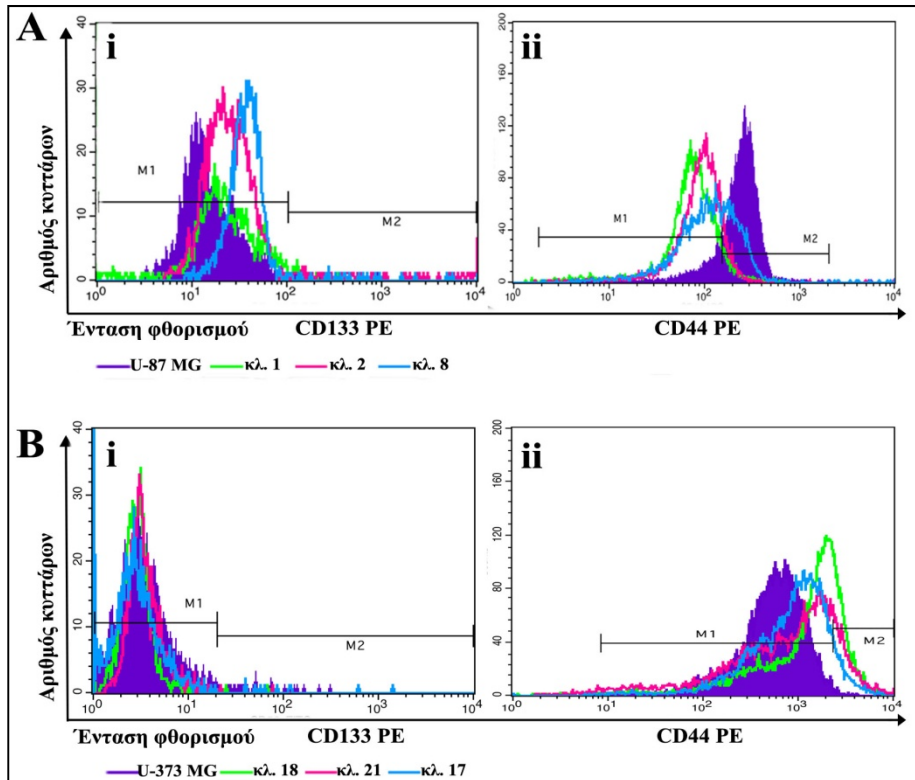
Εικόνα 3.25: Διαφοροποίηση νευροσφαιρών θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U87-HERV-K10 προς την γλοιακή και νευρική πορεία διαφοροποίησης. 1. Κύτταρα από απομονωμένες νευρόσφαιρες θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U87-HERV-K10 (κλώνοι 1, 2 και 8) και κυττάρων-μάρτυρες U-87 MG θρυψινοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε κανονικά καλλιεργητικά σκεύη όπου και αφέθηκαν προς ανάπτυξη για 48 ώρες. 2. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα των νευροσφαιρών κυττάρων κλώνων ή κυττάρων-μάρτυρα ελέγχθηκαν με ανοσο-αποτύπωση κατά Western για την έκφραση του αστρογλοιακού δείκτη διαφοροποίησης GFAP και του νέυρο-ειδικού δείκτη βIII-τουμπουλίνη. 3. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα των νευροσφαιρών αναλύθηκαν με FACS για την μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης μετά από 48 ώρες καλλιέργειας.

3.4.4 Μεταβολή έκφρασης των αντιγονικών δεικτών CD133, και CD44 σε κύτταρα κλώνων U373- και U87- θετικών ρετρομετάθεσης.

Η πλειονότητα των εγκεφαλικών όγκων στον άνθρωπο επιδεικνύουν έντονη φαινοτυπική ετερογένεια καθώς συνίστανται από κύτταρα που εκφράζουν τόσο δείκτες διαφοροποίησης, όσο και δείκτες από-διαφοροποίησης. Αυτό το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα αποδίδεται στην παρουσία καρκινικών (γλοιοματικών) βλαστικών κυττάρων, τα οποία έχουν την ιδιότητα να αυτό-ανανεώνονται αναπαράγοντας τον εαυτό τους, αλλά και να διαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα τα οποία υπόκεινται σε περεταίρω διαφοροποίηση, διαμορφώνοντας ένα είδος κυτταρικής ιεραρχίας εντός του όγκου. Για το λόγο αυτό κρίνεται όλο και πιο επιτακτικός ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός αυτών των καρκινικών κυττάρων που φέρουν βλαστικές ιδιότητες, ούτως ώστε να εμποδιστούν καλύτερα οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του εγκεφάλου και να σχεδιαστούν πιο στοχευμένες και αποτελεσματικές θεραπείες. Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής με την χρήση ειδικών αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν και δεσμεύουν συγκεκριμένα επιφανειακά αντιγόνα που εκφράζουν οι διάφοροι κυτταρικοί υπο-πληθυσμοί του όγκου, μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά σε αυτή την κατεύθυνση. Μεταξύ των πιο διαδεδομένων επιφανειακών πρωτεϊνών που έχουν προταθεί ως σχετιζόμενες με καρκινικά βλαστικά/προγονικά κύτταρα του εγκεφάλου, αλλά και με φαινόμενα ισχυρής διηθητικότητας, ογκογενετικότητας και ανθεκτικότητας σε χημειοθεραπεία και ακτινοβολία, είναι οι CD133 και CD44.

Προς αυτή την κατεύθυνση, θελήσαμε να ελέγξουμε την έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD133, και CD44 στα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα κλώνων U373-HERV-

K10 και U87-HERV-K10. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης νευροσφαιρών U87-HERV-K10 (1, 2 και 8) ελέχθησαν με κυτταρομετρία ροής ως προς την έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD133 και CD44 με την χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η ίδια πειραματική πορεία ακολουθήθηκε και στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 (κλώνοι 17, 18 και 21). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα επίπεδα έκφρασης των CD133 και CD44 σε κύτταρα μάρτυρες U-87 MG και U-373 MG, αντίστοιχα (εικόνα 3.26).



Εικόνα 3.26: Μεταβολή της αντιγονικής έκφρασης των δεικτών CD133 και CD44 σε κύτταρα από νευρόσφαιρες U87-HERV-K10 καθώς και σε κύτταρα U373-HERV-K10.

A. Κύτταρα από νευρόσφαιρες κλώνων U87-HERV-K10 (κλώνοι 1, 2 και 8) καθώς και κύτταρα-μάρτυρες U-87 MG, σημάνθηκαν με τα αντισώματα CD133, και CD44 και ακολούθως μετρήθηκε η έκφραση των αντίστοιχων αντιγονικών δεικτών με FACS. Παρουσιάζονται οι κατανομές έντασης φθορισμού μάρτυρα (ιάδης συμπαγής) και θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων (πράσινη, κόκκινη και μπλε) ως μία συνολική επικάλυψη. **Ai:** Προφίλ έκφρασης CD133 για τα κύτταρα U87-HERV-K10 έναντι κυττάρων μάρτυρα U-87 MG. **Aii:** Προφίλ έκφρασης CD44 για τα κύτταρα U87-HERV-K10 έναντι κυττάρων μάρτυρα U-87 MG. **B.** Κύτταρα από θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 (κλώνοι 17, 18 και 21) καθώς και κύτταρα-μάρτυρες U-373 MG, σημάνθηκαν με τα αντισώματα CD133, και CD44 και κατόπιν μετρήθηκε η έκφραση των αντίστοιχων αντιγονικών δεικτών με FACS. **Bi:** Προφίλ έκφρασης CD133 για τα κύτταρα U373-HERV-K10 έναντι κυττάρων μάρτυρα U-373 MG. **Bii:** Προφίλ έκφρασης CD44 για τα κύτταρα U373-HERV-K10 έναντι κυττάρων μάρτυρα U-373 MG.

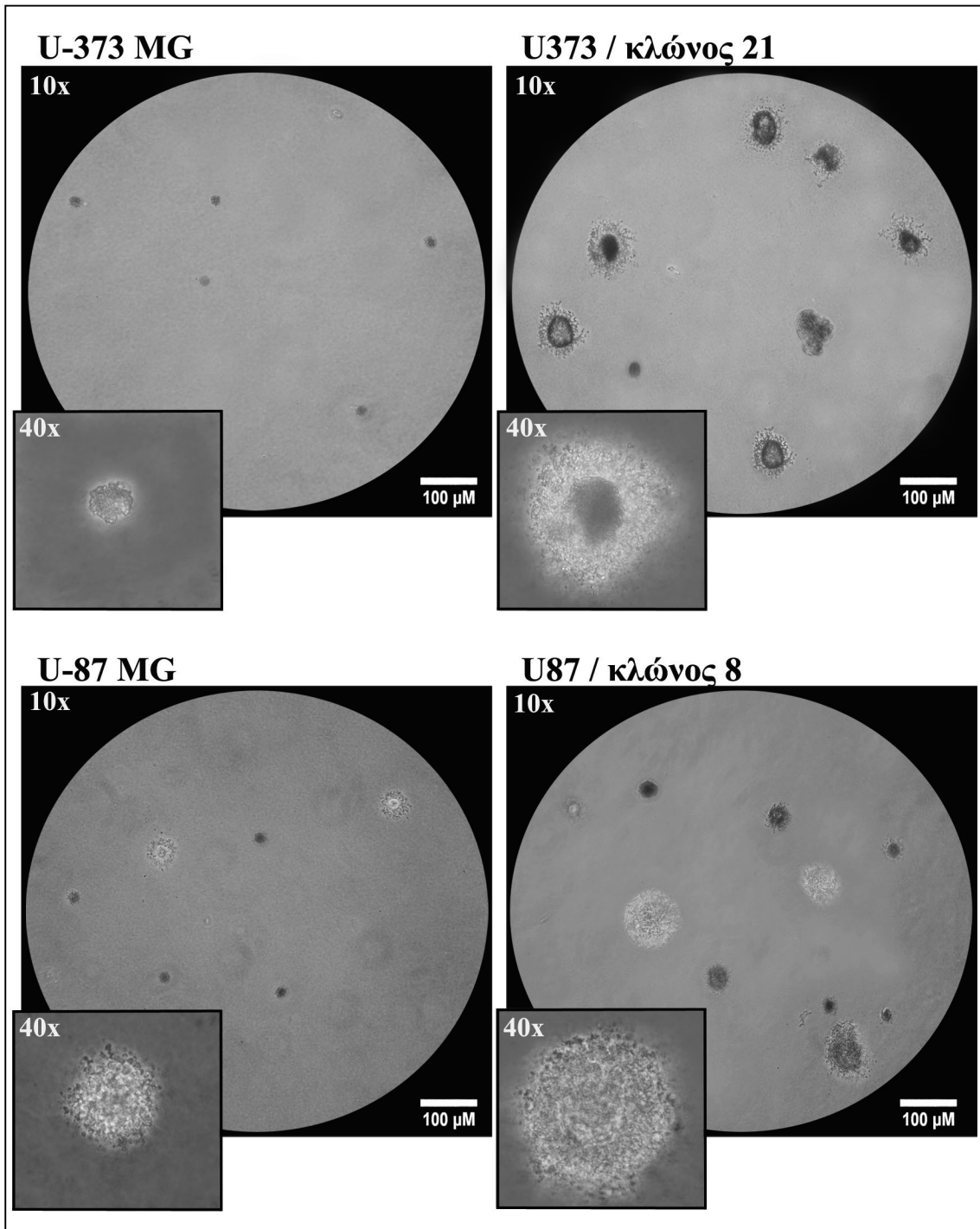
Διαπιστώθηκε ότι η ρετρομετάθεση των HERV-K10 συσχετίζεται με μία αισθητή μεταβολή στην έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD133 και CD44 σε κύτταρα θετικών ρετρομετάθεσης νευροσφαιρών U87-HERV-K10. Πιο ειδικά, παρατηρήθηκε μία αύξηση στην έκφραση του CD133 συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες U-87 MG και ταυτόχρονα μία σημαντική μείωση της έκφρασης του CD44. Στον αντίποδα, τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα U373-HERV-K10 εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του CD44,

συγκριτικά με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα-μάρτυρες U-373 MG. Συγχρόνως, τόσο σε κύτταρα-μάρτυρες όσο και σε κύτταρα ελέγχου απουσίαζε η έκφραση του CD133.

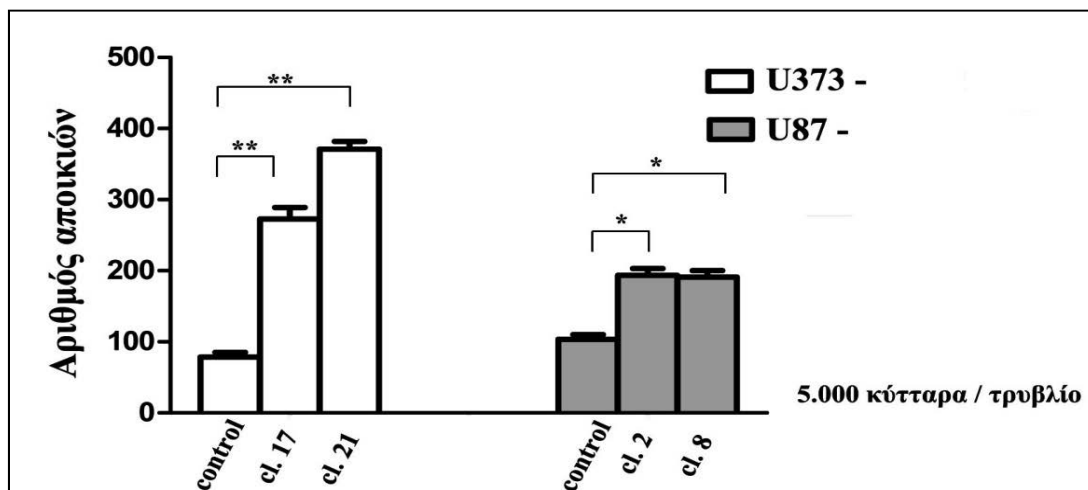
3.4.5 Τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα φέρουν ενισχυμένη ικανότητα σχηματισμού εστιών σε ημιστερεά καλλιεργητικά μέσα.

In vitro, ο κυτταρικός μετασχηματισμός σχετίζεται με συγκεκριμένες φαινοτυπικές μεταβολές όπως είναι α) η απώλεια αναστολής λόγω επαφής (loss of contact inhibition) που οδηγεί στον σχηματισμό κυτταρικών πολυστοιβάδων καθώς τα κύτταρα μπορούν να αναπτύσσονται το ένα επάνω στο άλλο, και β) η ανεξάρτητη προσκόλλησης (anchorage independent) ανάπτυξή τους η οποία τους επιτρέπει να δημιουργούν αποικίες όταν καλλιεργούνται σε ημιστερεά μέσα. Σε διάφορες κακοήθειες μεταξύ των οποίων και εκείνες του Κ.Ν.Σ, η αυξημένη έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD133 και CD44 σχετίζεται με ενίσχυση του ογκογενετικού δυναμικού των νεοπλασματικών κυττάρων η οποία πειραματικά αποδεικνύεται τόσο *in vitro* μέσω σχηματισμού μεγάλων σε αριθμό και μέγεθος αποικιών σε ημιστερεά καλλιεργητικά μέσα, όσο και *in vivo* μέσω παραγωγής μεγάλων και διηθητικών όγκων όταν εισάγονται σε ανοσοκατασταλμένους μύες.

Έχοντας αποδείξει ότι οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD133 (νευρόσφαιρες κλώνων U87-HERV-K10) και CD44 (κλώνοι U373-HERV-K10), θελήσαμε να μελετήσουμε την δυνατότητα των κυττάρων αυτών να σχηματίζουν μεγαλύτερες και περισσότερες εστίες (αποικίες) όταν καλλιεργούνται απουσία κατάλληλου υποστρώματος προσκόλλησης (anchorage-independent foci). Προκειμένου να ερευνήσουμε το ενδεχόμενο αυτό, κύτταρα μονήρων κλώνων U373- και U87-HERV-K10, καθώς και κύτταρα-μάρτυρες U-373 MG ή U-87 MG, αντίστοιχα, αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο αγαρόζης 0.4% για 20 περίπου ημέρες (εικόνα 3.27). Μετά το χρονικό διάστημα των 20 ημερών οι σχηματιζόμενες κυτταρικές αποικίες για κάθε περίπτωση κυττάρων φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 10- και 40X. Επιπλέον οι σχηματιζόμενες αποικίες των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων καταμετρήθηκαν και παρουσιάζονται στο διάγραμμα της εικόνας 3.28, συγκριτικά με αυτές των κυττάρων-μάρτυρα (εικόνα 3.28).



Εικόνα 3.27: Εξέταση της ικανότητας σχηματισμού κυτταρικών εστιών (*anchorage-independent foci*) σε θετικούς ρετρομετάθεσης μονήρεις κλώνους U373- και U87-HERV-K10. 5.000 κύτταρα από θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους κυττάρων U373 και U87 καθώς και των αντίστοιχων μη-διαμολυσμένων με το ρετροτρανσποζόνιο κυττάρων-μάρτυρα αφέθησαν προς ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο 1X/DMEM/10% FBS/0.4% αραρόζης που αποτέλεσε την κορυφαία στοιβάδα, για 20 ημέρες. Πριν την τοποθέτηση των κυττάρων, κάθε καλλιεργητικό τρυβλίο είχε επιστρωθεί με 0.8% διάλυμα αραρόζης που αποτέλεσε την βασική στοιβάδα. Οι προκύπτουσες αποικίες φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 10- και 40X. Για την μεγέθυνση 10X: bar scale = 100μM



Εικόνα 3.28: Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των σχηματιζόμενων εστιών θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων σε ημιστερέα καλλιεργητικά μέσα. Μετά το πέρας 20 ημερών καλλιέργειας σε ημιστέρεα μέσα δύο αντιπροσωπευτικών κλώνων-θετικών ρετρομετάθεσης για κάθε κυτταρική σειρά καθώς και των αντίστοιχων κυττάρων-μάρτυρες, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των σχηματιζόμενων εστιών για κάθε περίπτωση. Οι στήλες του γραφήματος αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή του καταμετρημένου αριθμού των κυτταρικών αποικιών \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής ($mean \pm s.e.m$) από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$), $P < 0.05$,

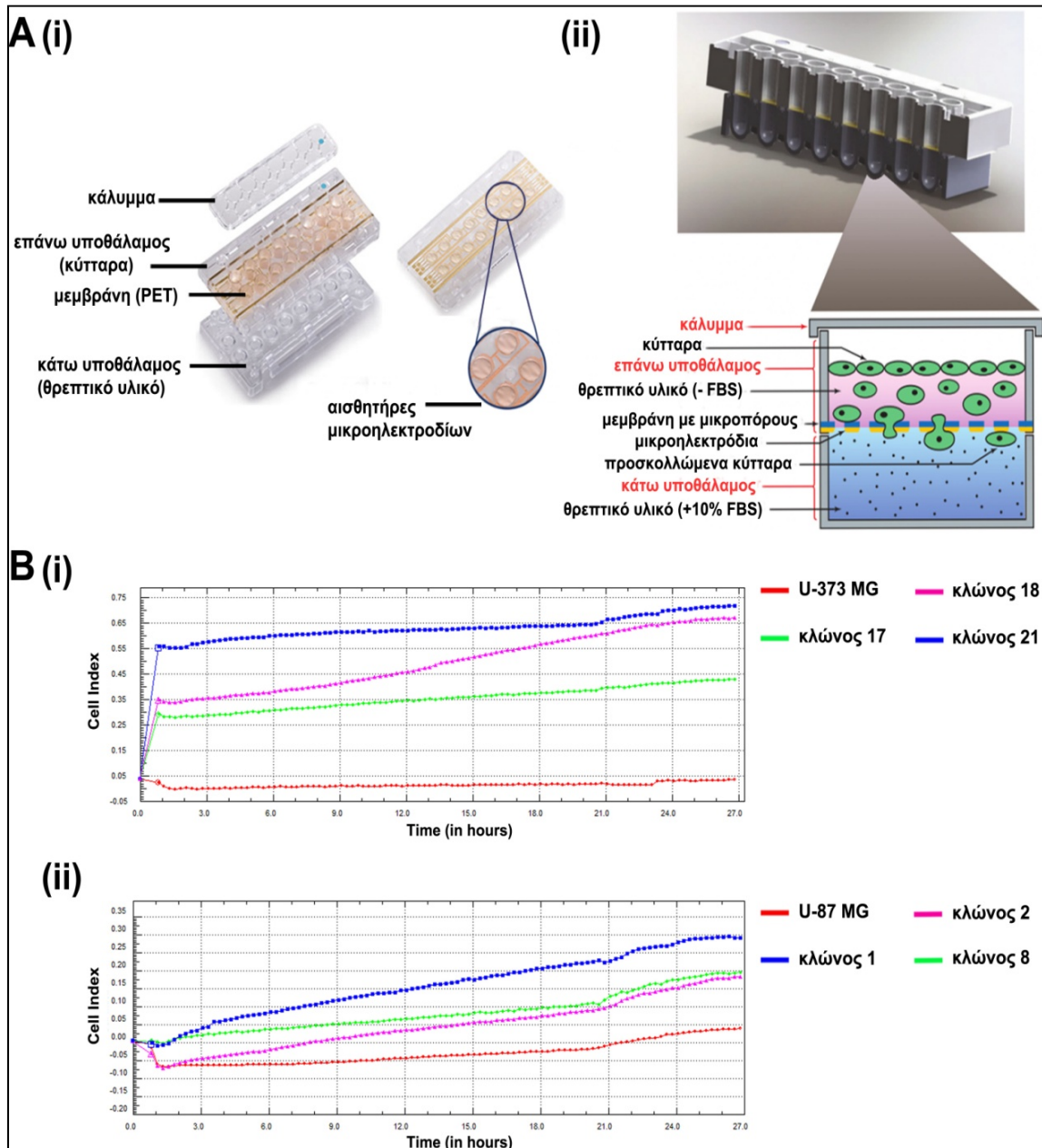
Όπως φαίνεται και στις σχετικές εικόνες 3.27 και 3.28, τα κύτταρα των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων σχημάτισαν μεγαλύτερες σε μέγεθος και αριθμό εστίες, συγκριτικά με τα αμεταχείριστα κύτταρα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η ρετρομετάθεση των HERV-K10 στοιχείων σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα σχετίζεται με ενίσχυση του ογκογενετικού τους δυναμικού.

3.4.6 Μέτρηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων με την τεχνολογία RTCA DP-XCelligence.

Οι κακοήθεις όγκοι του εγκεφάλου χαρακτηρίζονται από υψηλό δυναμικό διεισδυτικότητας στο περιβάλλον παρέγχυμα, γεγονός που καθιστά την πλήρη χειρουργική εξαίρεσή τους εξαιρετικά δύσκολη. Η μετάσταση του όγκου σε ένα ή περισσότερα σημεία του εγκεφαλικού φλοιού είναι μία εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων τα οποία οδηγούν στην ανάπτυξη ενός δευτερογενούς όγκου. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται είτε μεταξύ κυττάρων (cell-cell), είτε μεταξύ κυττάρων και στοιχείων της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσία (cell matrix) και διαμεσολαβούνται από ειδικά μόρια προσκόλλησης.

Βάσει αυτών, και δεδομένης της συσχέτισης της ρετρομετάθεσης με την επαγωγή των αντιγονικών δεικτών CD133 και CD44, σε ένα επόμενο στάδιο μελετήσαμε την κυτταρική διεισδυτικότητα και μετανάστευση μέσω του αναλυτή RTCA-DP (τεχνολογία RTCA DP-Xcelligence) και την χρήση ειδικών πολυτρυβλίων (CIM plates). Η μέθοδος αυτή είναι ιδανική για να εξετάσουμε την απόκριση των κυττάρων στον λεγόμενο έλεγχο wound healing test. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ειδικά 16-well plates (CIM plates), τα οποία χωρίζονται σε δύο υποθαλάμους (εικόνα 3.29 A). Στην κατώτερη επιφάνεια του επάνω υποθαλάμου βρίσκεται μία μεμβράνη PET (polyethyleneterephthalate) με μικροπόρους, η οποία φέρει μικροηλεκτρόδια ενσωματωμένα στην κάτω πλευρά της. Όσα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύσουν διαπερνούν τους μικροπόρους της μεμβράνης και προσκολλώνται στην κάτω επιφάνειά της, αυξάνοντας την ηλεκτρική

αντίσταση στους αισθητήρες των μικροηλεκτροδίων. Μέσω των ηλεκτροδίων, το μηχάνημα καταγράφει ανά χρονική στιγμή την κινητική κατάσταση των κυττάρων, κατασκευάζοντας ειδικά γραφήματα. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων αναγράφεται το Cell Index (CI), δηλαδή μία ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει, συναρτήσει του χρόνου. Αλλαγές στην κατάσταση των κυττάρων όπως η μορφολογία, η βιωσιμότητα ή κυτταρική προσκόλληση επηρεάζουν επίσης το CI. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για τρεις από κάθε περίπτωση κλώνους U87-HERV-K10 και U373-HERVK10 σε χρονικό διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των κυττάρων μαρτύρων U-87 MG ή U-373 MG. Στην εικόνα 3.29 παρουσιάζεται η μεταβολή του μεταστατικού δυναμικού αντιπροσωπευτικών κυττάρων κλώνων-θετικών ρετρομετάθεσης U373-HERV-K10 ή U87-HERV-K10, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες της εκάστοτε κυτταρικής σειράς.



Εικόνα 3.29: Αύξηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων κλώνων U373/HERV-K10 και U87-HERV-K10. (A): i. Σχηματική απεικόνιση ενός πολυτριβλίου CIM-Plate. ii. Λεπτομερής περιγραφή του επάνω και κάτω υποθαλάμου ενός μεμονωμένου φρεατίου (well) του πολυτριβλίου και σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει. Στην κατώτερη επιφάνεια του επάνω υποθαλάμου ενός φρεατίου εντοπίζεται η μεμβράνη PET με τους μικροπόρους διαμέσου των οποίων μεταναστεύουν τα κύτταρα. Η κάτω επιφάνεια της μεμβράνης είναι εφοδιασμένη με ηλεκτρόδια τα οποία ανιχνεύουν την παρουσία προσκολλημένων κυττάρων μέσω της αύξησης της ηλεκτρικής αντίστασης στους αισθητήρες τους. B: Ανάλυση πραγματικού χρόνου της κυτταρικής μετανάστευσης. i & ii. Αύξηση μεταστατικού δυναμικού κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U373-HERV-K10 έναντι κυττάρων-μαρτύρων U-373 MG & κλώνων U87-HERV-K10 έναντι κυττάρων-μαρτύρων U-87 MG, αντίστοιχα. Στον κάθετο άξονα των γραφημάτων παρουσιάζεται το Cell Index, δηλαδή μία ποσοτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που έχουν μεταναστεύσει, συναρτήσει του χρόνου.

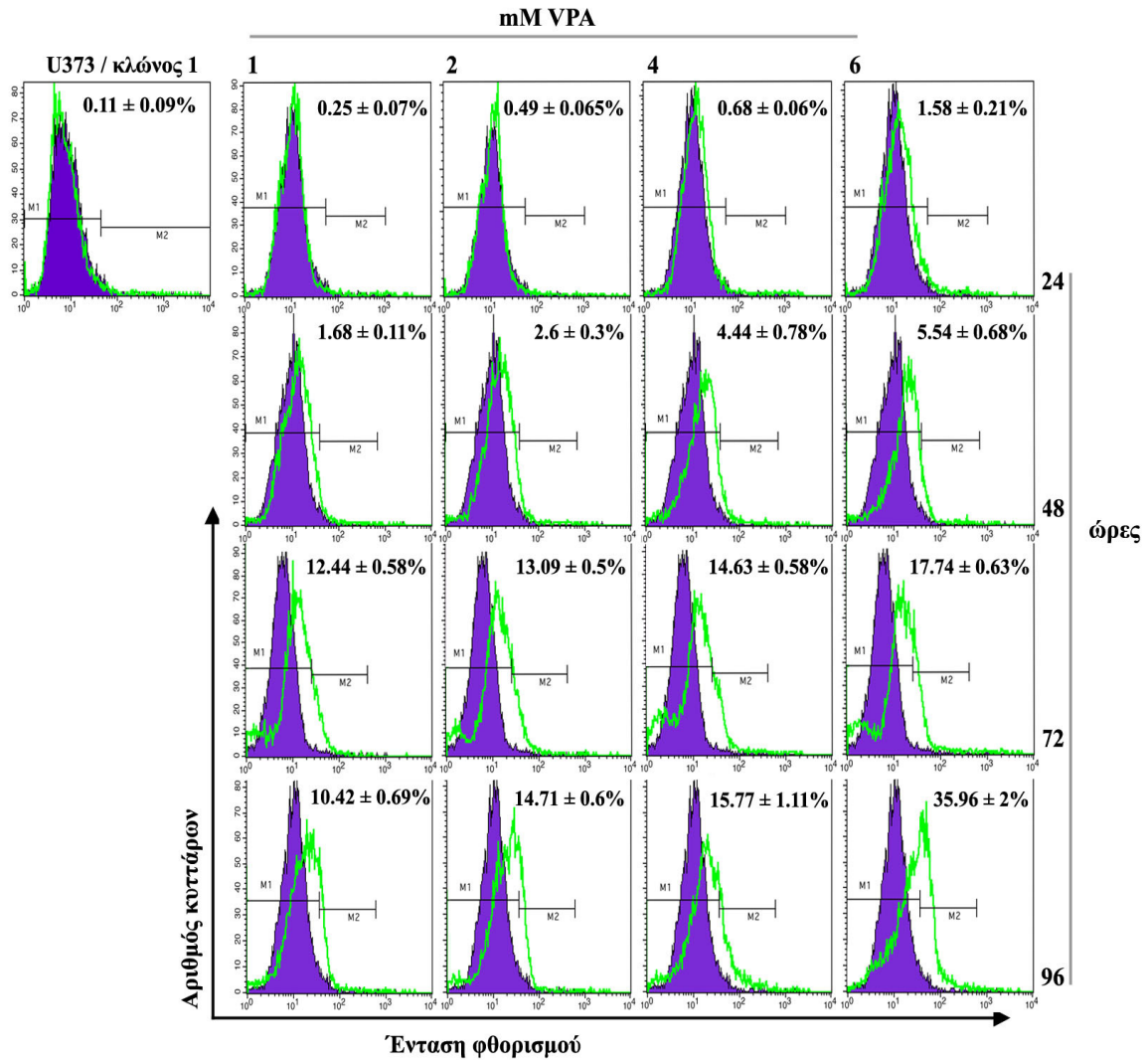
Όπως γίνεται αντιληπτό, η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα U-373 και U-87 αυξάνει το επίπεδο διήθησής των.

3.5 Το βαλπροϊκό οξύ (Valproic Acid, VPA) επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά δόσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο.

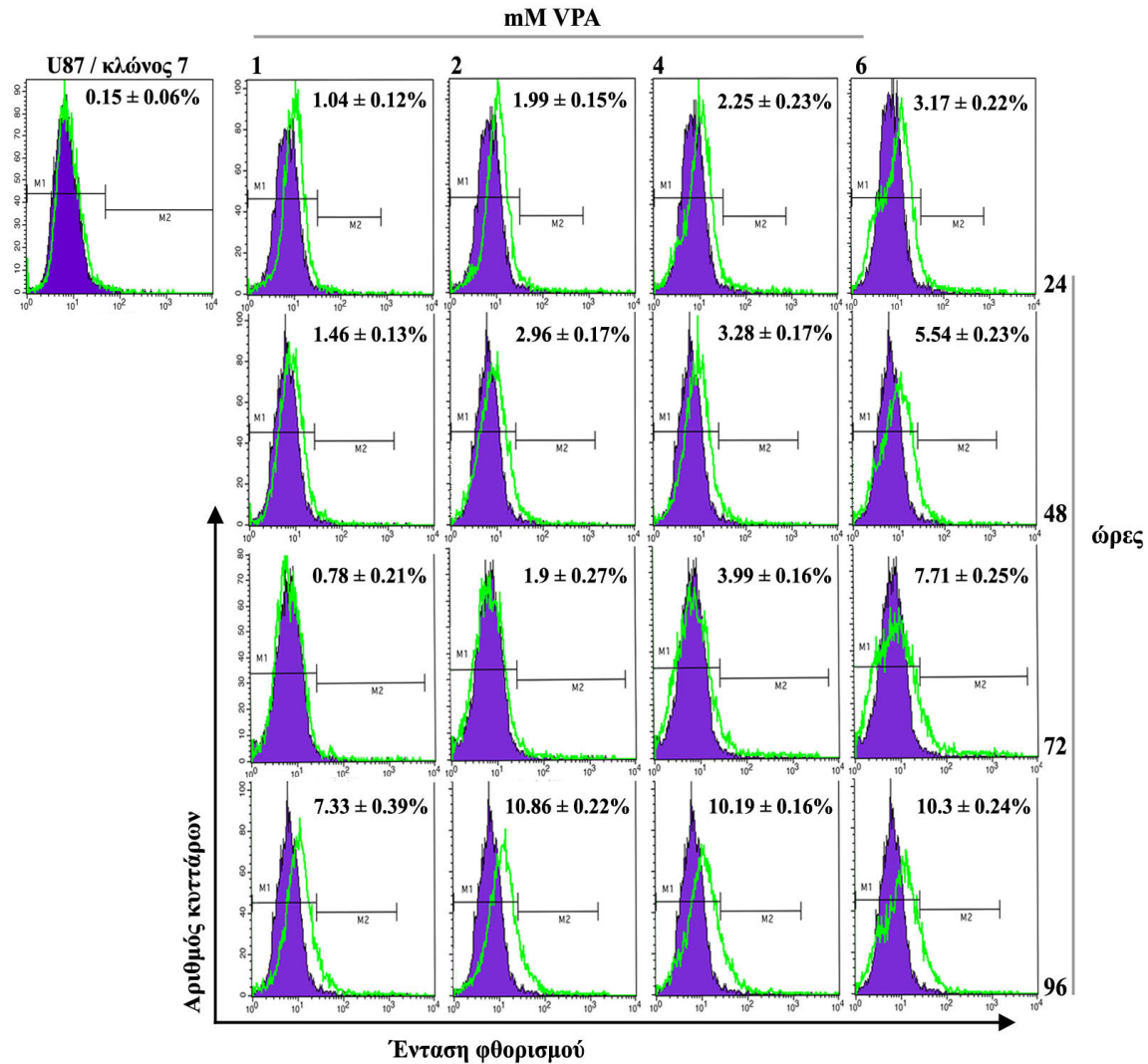
Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε η επίδραση του VPA στην επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10. Το VPA δρα επιγενετικά μέσω αναστολής της δράσης των απο-ακετυλασών των ιστονών. Το αποτέλεσμα αυτής της αναστολής είναι η ακετυλίωση των ιστονών και ακολούθως η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τελικά η μεταγραφική ενεργοποίηση.

Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή συσχέτιση της δράσης του VPA με την επαγωγή της ρετρομετάθεσης, επιλέχθηκε ένας κλώνος από κάθε κυτταρική σειρά ο οποίος εμφάνιζε χαμηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης, και επώαστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA, από 1 έως 6 mM, σε αυξανόμενους χρόνους επίδρασης από 24 έως 96 ώρες για τις ίδιες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα ελέγχου για κάθε περίπτωση δόσης και χρόνου επίδρασης με το φάρμακο, μετρήθηκαν με FACS χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα τα αρχικά αμεταχειρίστα κύτταρα του κλώνου για κάθε κυτταρική σειρά (κύτταρα U373/κλώνου 1 ή κύτταρα U87/κλώνου 7).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.30, η συχνότητα ρετρομετάθεσης επάγεται σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα καθώς αυξάνονται τόσο η δόση του φαρμάκου, όσο και ο χρόνος επίδρασης των κυττάρων με αυτό. Πιο ειδικά, για τα κύτταρα U373 / κλώνος 1 η συχνότητα ρετρομετάθεσης καταγράφει τις υψηλότερες τιμές στις 96 ώρες επίδρασης αγγίζοντας το εντυπωσιακά υψηλό ποσοστό του ~36% στη μέγιστη συγκέντρωση των 6 mM VPA. Ανάλογα αποτελέσματα ελήφθησαν και για τα κύτταρα U87 / κλώνος 7, καθώς και σε αυτή την περίπτωση βρέθηκε ότι αυξανόμενων τόσο της συγκέντρωσης του VPA από 1 σε 6 mM, όσο και του χρόνου επώασης από 24 σε 96 ώρες, η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξήθηκε αντίστοιχα και σταδιακά από 1.04 έως 10,86%. Εξετάζοντας τα δεδομένα της εικόνας 3.32 φαίνεται ότι για τα κύτταρα U87 / κλώνος 7, η συχνότητα ρετρομετάθεσης παρουσιάζει πλατώ στην τιμή 10.86% που αντιστοιχεί σε 96 ώρες επίδρασης των κυττάρων με 2 mM VPA. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου για τον ίδιο χρόνο έκθεσης (96 ώρες) των κυττάρων σε αυτό, οι τιμές της συχνότητας ρετρομετάθεσης καταγράφουν μία μικρή πτώση (εικόνες 3.30, 3.31).

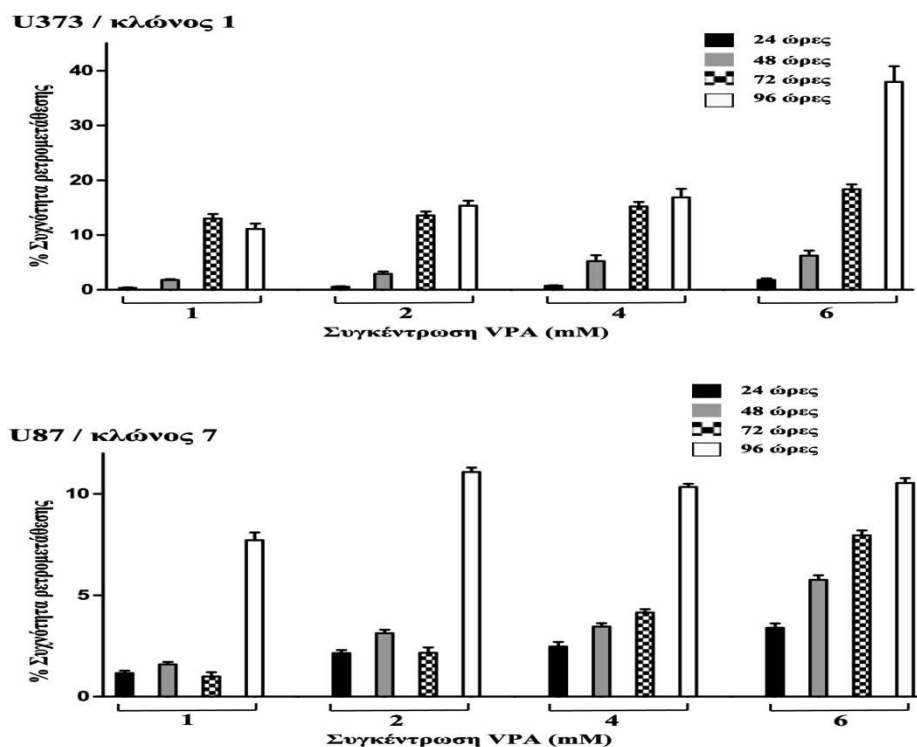


Εικόνα 3.30: Δοσο- και χρόνο- εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* μετά από επίδραση με βαλπροϊκό οξύ σε κύτταρα *U373*. Ανάλυση με *FACS* για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε κύτταρα *U373/κλώνου 1* μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βαλπροϊκού οξέος, από 1 έως 6 mM, σε αυξανόμενους χρόνους έκθεσης από 24 έως 96 ώρες. Στη εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές κατανομές φθορισμού των δειγμάτων ελέγχου (πράσινο χρώμα), που αντιστοιχούν από αριστερά προς τα δεξιά κάθε στήλης, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA, και από πάνω προς τα κάτω, σε αυξανόμενους χρόνους επίδρασης και αμεταχείριστων (χωρίς της προσθήκη VPA) κυττάρων *U373/κλώνου 1*, ως μάρτυρας (μωβ χρώμα). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτο-φθορισμού και φθορισμού *EGFP*, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.31: Δοσο- και χρόνο- εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* μετά από επίδραση με βαλπροϊκό οξύ σε κύτταρα U87. Ανάλυση με *FACS* για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε κύτταρα U87/κλώνου 7 μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βαλπροϊκού οξέος, από 1 έως 6 mM, σε αυξανόμενους χρόνους έκθεσης από 24 έως 96 ώρες. Στη εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές κατανομές φθορισμού των δειγμάτων ελέγχου (πράσινο χρώμα) και αμεταχειριστων (χωρίς της προσθήκη VPA) κυττάρων U87/κλώνου 7, ως μάρτυρας (μωβ χρώμα). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτοφθορισμού και φθορισμού *EGFP*, αντίστοιχα.

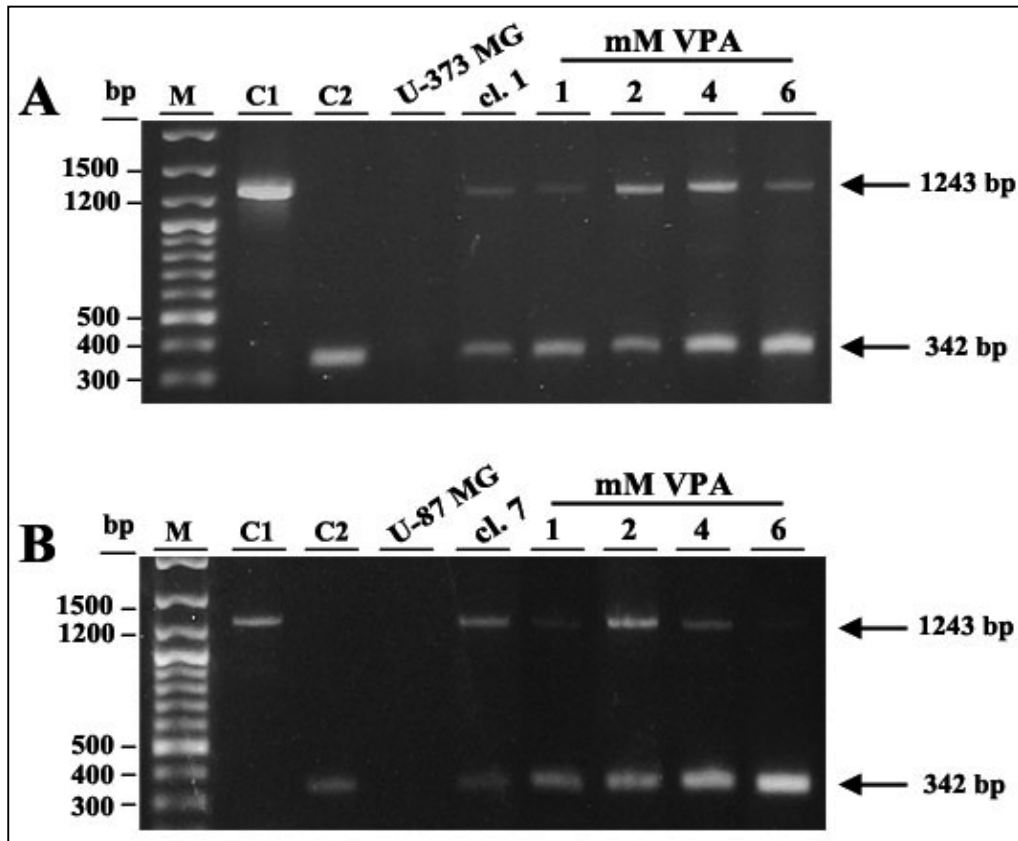
Τα άνωθεν αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το βαλπροϊκό οξύ επάγει την συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων *HERV-K10* σε κύτταρα U-373 και U-87 κατά δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο.



Εικόνα 3.32: Διαγραμματική απεικόνιση της συχνότητας ρετρομετάθεσης μετά από επίδραση με βαλπροϊκό οξύ. Στην εικόνα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα δεδομένα που προκύπτουν από την μέτρηση με FACS (εικόνες 3.30 και 3.31) της συχνότητας ρετρομετάθεσης των κυττάρων U373 / κλώνου 1 ή U87 / κλώνου 7 μετά από επίδραση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και χρόνους έκθεσης με VPA.

3.5.1 Επιβεβαίωση γεγονότων ρετρομετάθεσης των HERV-K10 μετά από επίδραση με βαλπροϊκό οξύ

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω επαγόμενα από το VPA γεγονότα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 σε επίπεδο ενσωματώσεων στο DNA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR. Πιο ειδικά, απομονώθηκαν εκχυλίσματα DNA από κύτταρα κλώνων στα οποία χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA 1, 2, 4 και 6 mM για 48 ώρες, καθώς και από αμεταχειρίιστα κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 ως μάρτυρας. Ακολούθησε ανάλυση PCR σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν αναφερθεί προηγουμένως, προκειμένου να ανιχνευθεί το προϊόν των 342 bp το οποίο αντιστοιχεί στο ματισμένο γονίδιο της EGFP και σηματοδοτεί τις ρετρομεταθετικές ενσωματώσεις που έχουν συντελεστεί. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.33, το προϊόν των 342 bp εμφανίστηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα, συμπεριλαμβανομένων και των αρχικών αμεταχειριστων κλώνων κάθε κυτταρικής σειράς όπως αναμενόταν, καθώς και σε αυτούς είχαν αρχικά βρεθεί μικρές συχνότητες ρετρομετάθεσης. Ωστόσο είναι αξιοσημείωτη η σταδιακή αύξηση της πυκνότητας της ζώνης των 342 bp που παρατηρείται αυξανόμενης της συγκέντρωσης του VPA, γεγονός που σηματοδοτεί τον μεγαλύτερο αριθμό ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων που συντελέστηκαν. Συνεπώς, αποδεικνύεται και σε γενωμικό επίπεδο ότι το βαλπροϊκό οξύ επάγει την συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10.

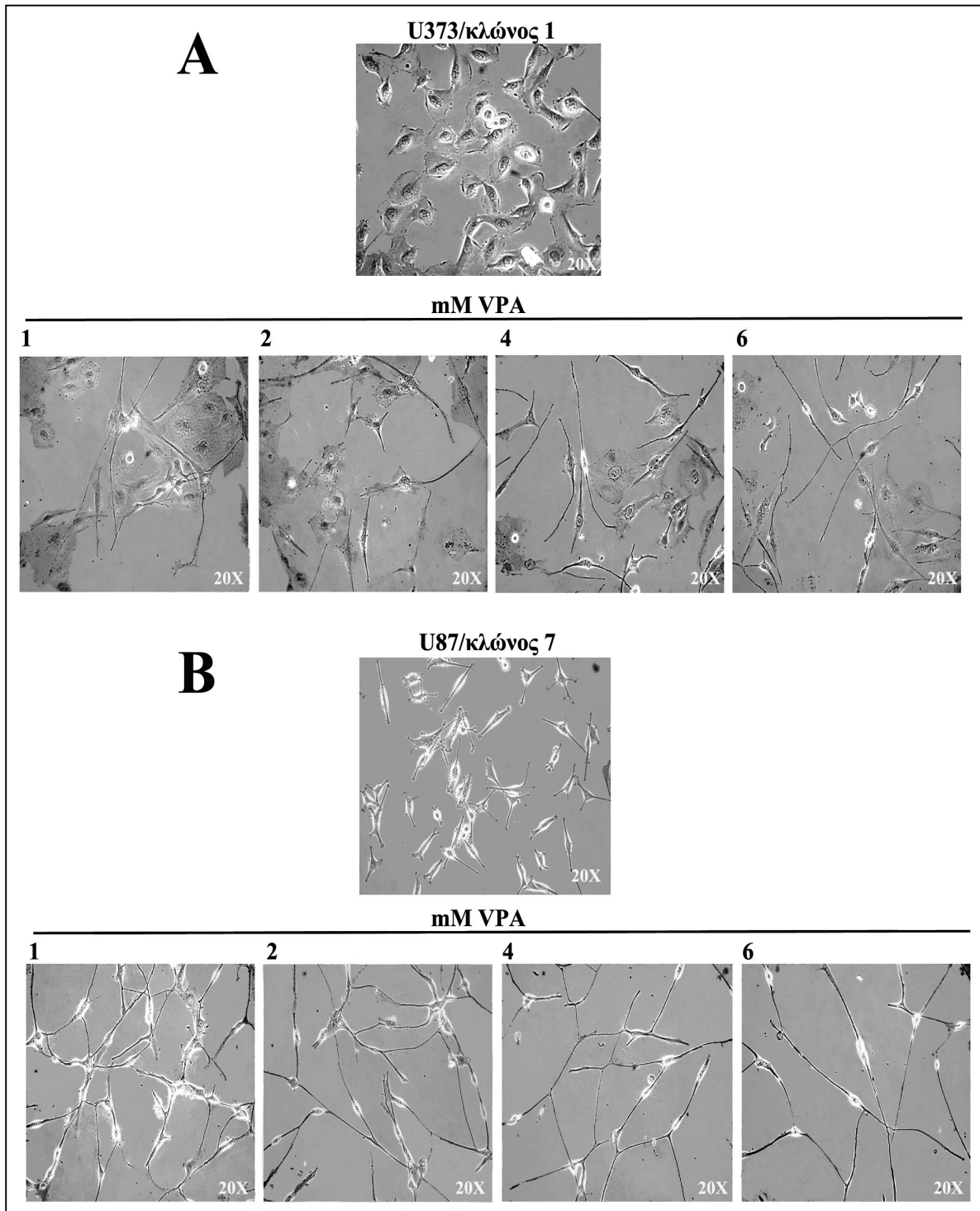


Εικόνα 3.33: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε γενωμικό επίπεδο μετά από επίδραση με VPA. Ανάλυση PCR για το γονίδιο της EGFP προς ταυτοποίηση ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων σε κύτταρα U373/κλώνου 1 (A) ή U87/κλώνου 7 (B) μεταχειρισμένα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις, από 1 έως 6 mM VPA για 48 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα U-373 MG (A) ή U-87 MG (B) καθώς και μη μεταχειρισμένα με VPA κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους pBR322/HinfI, C1: πλασμίδιο-μάρτυρας pHERV-K10*/EGFP-INT ως προς την ζώνη των 1243 bp, που περιέχει το γονίδιο της EGFP μαζί με το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης, C2: πλασμίδιο-μάρτυρας pEGFP-N1 ως προς την ζώνη 342 bp που περιέχει την EGFP χωρίς το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης. Η δέσμη 342 bp είναι διαγνωστική για την παρουσία γεγονότων ρετρομετάθεσης. Ο διαχωρισμός των προϊόντων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 1.2 (w/v) αгарόζης.

3.5.2 Η επαγόμενη από το βαλπροϊκό οξύ ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης, κατά τρόπο δόσο-εξαρτώμενο.

Προγενέστερες μελέτες έχουν αποδείξει ότι το βαλπροϊκό οξύ μέσω της ανασταλτικής του δράσης έναντι των ιστονικών απο-ακετυλασών (HDACs) επάγει κυτταρική διαφοροποίηση σε μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές διαφορετικής ιστικής προέλευσης, όπως τερατοκαρκινώματος, παχέος εντέρου και μαστού (341). Επιπλέον, το φάρμακο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση κυτταρικής διαφοροποίησης σε προγονικά νευρικά κύτταρα (349), την προώθηση ανάπτυξης δενδριτών και την επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών νευρωνικής διαφοροποίησης σε κύτταρα νευροβλαστώματος (350), (319). Ιδιαίτερα γνωστές είναι και οι προστατευτικές ιδιότητες του VPA προς του ντοπαμινεργικούς νευρώνες έναντι κυτταροτοξικών φαινομένων (351). Μολονότι τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένας σημαντικός όγκος βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με τις δράσεις του VPA στην βιολογία του νευρικού κυττάρου, ακόμα δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτές.

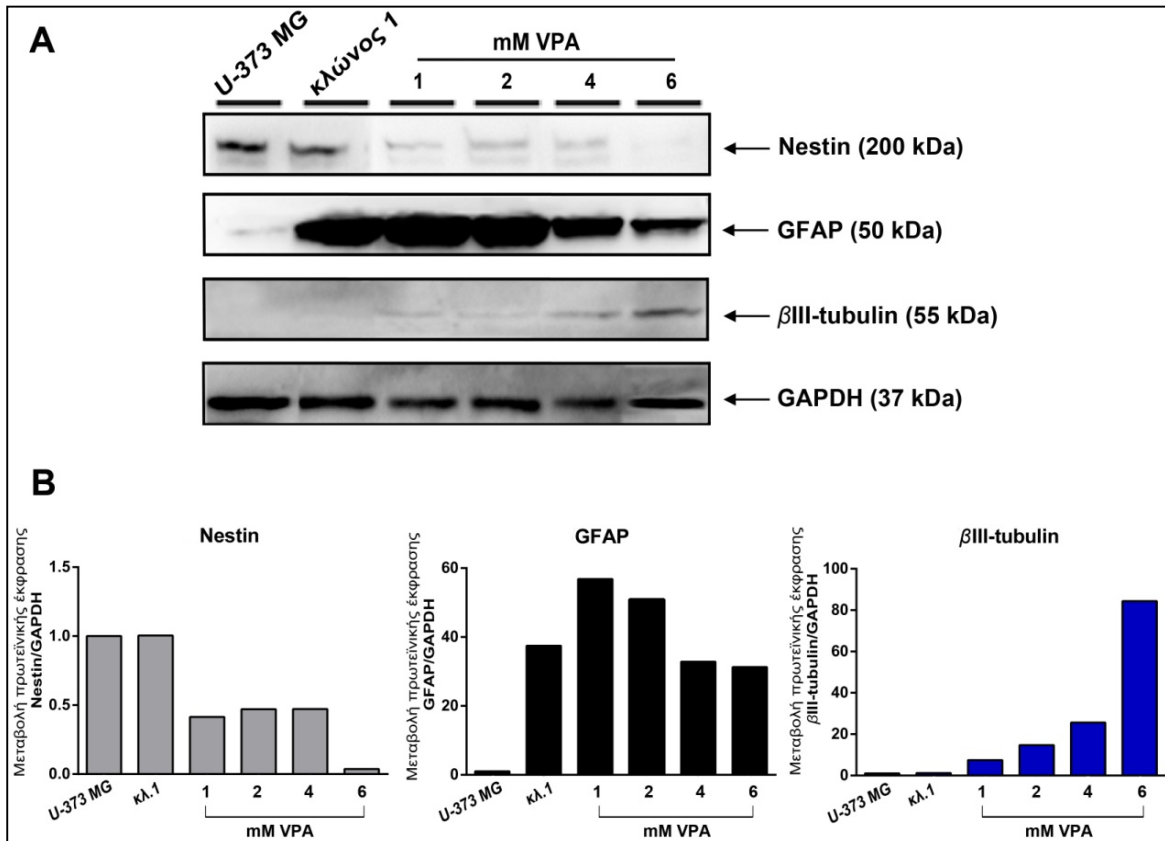
Στην παρούσα ενότητα θελήσαμε να μελετήσουμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της συντελούμενης από VPA κυτταρικής διαφοροποίησης με την επαγόμενη από VPA ρετρομετάθεση σε κύτταρα των δύο προαναφερθέντων κλώνων (U373/κλώνος 1 και U87/κλώνος 7). Η επιλογή των συγκεκριμένων κλώνων ως κυτταρικά συστήματα μελέτης της δράσης του VPA βασίστηκε στο γεγονός ότι αρχικά επέδειξαν πολύ χαμηλά ποσοστά ρετρομετάθεσης, χωρίς σημαντική μεταβολή του φαινοτύπου τους και συνεπώς θα παρείχαν μία πιο σαφή μαρτυρία πιθανούς συσχέτισης της επαγόμενης από το VPA ρετομετάθεσης με τα παρατηρούμενα κυτταρικά φαινόμενα. Σε αυτή την λογική, 120.000 κύτταρα από κάθε κλώνο επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1 έως 6 mM για 96 ώρες και εν συνεχεία παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν. Στην εικόνα 3.34 παρατίθενται χαρακτηριστικά πεδία φωτογράφισης της κυτταρικής καλλιέργειας που αντιστοιχούν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επίδρασης με VPA καθώς και αμεταχείριστων κυττάρων του κάθε κλώνου, ως μάρτυρες. Παρατηρείται ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του φαρμάκου και άρα της συχνότητας ρετρομετάθεσης, τα κύτταρα και των δύο κλώνων παρουσιάζουν μία προοδευτική αλλαγή φαινοτύπου που χαρακτηρίζεται από κύτταρα με ολοένα και πιο επιμηκυμένες κυτταρικές απολήξεις.



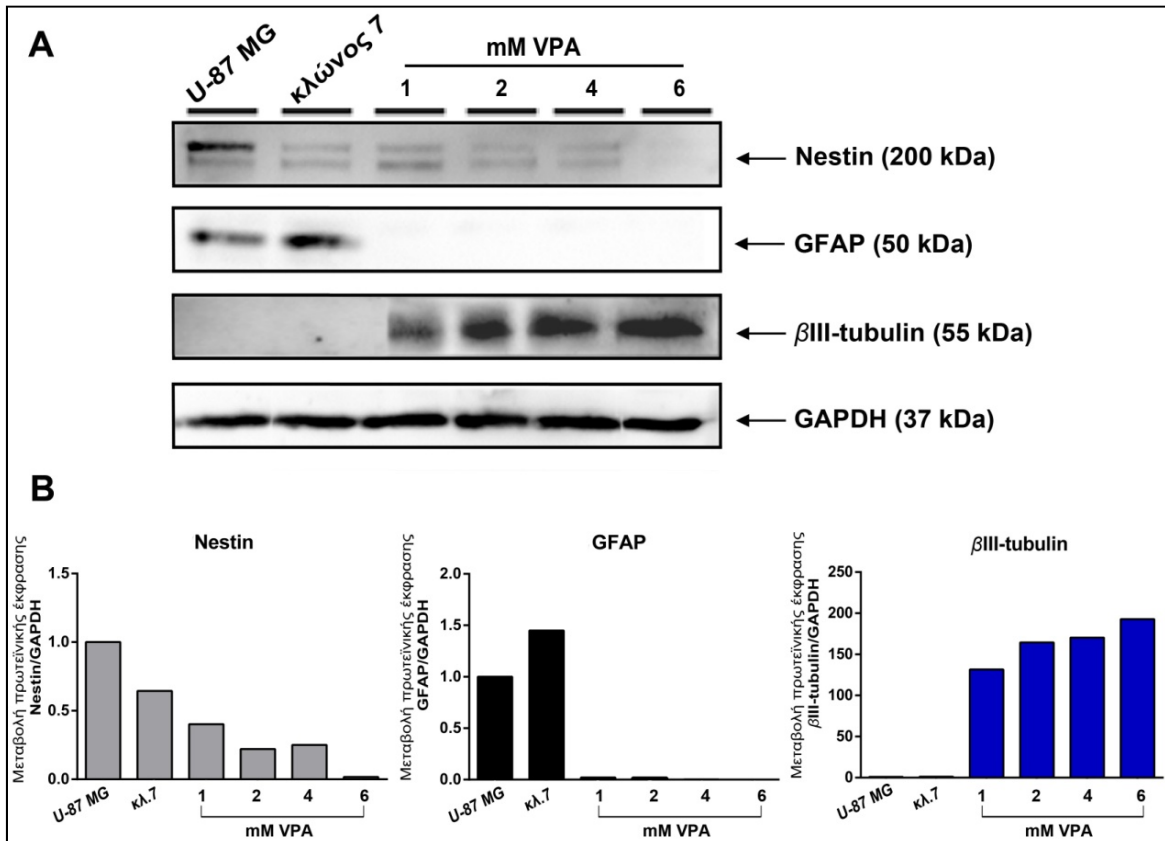
Εικόνα 3.34: Η επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση των στοιχείων *HERV-K10* σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης σε κύτταρα κλώνων U373 και U87. Μορφολογική εξέταση κυττάρων από δύο κλώνους με χαμηλά ποσοστά ρετρομετάθεσης, τα οποία επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1 έως 6 mM για 96 ώρες. Παρατηρείται μια προοδευτική αλλαγή του κυτταρικού φαινότυπου που ήταν ανάλογη της αύξησης της δόσης του φαρμάκου.

Οι ενδείξεις της συντελούμενης από το VPA κυτταρικής διαφοροποίησης μας οδήγησαν στο επόμενο στάδιο της μελέτης μας που ήταν η μοριακή ταυτοποίηση του προκύπτοντος φαινότυπου για κάθε δόση του φαρμάκου. Για τον σκοπό αυτό

πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για τους πρωτεϊνικούς δείκτες των νεστίνης, GFAP και β III-τουμπουλίνης. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1 έως 6 mM για 96 ώρες, ενώ ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τόσο αμεταχείριστα κύτταρα του κάθε κλώνου, όσο και τα αρχικά μη-διαμολυσμένα με το ρετροτρασποζόνιο κύτταρα U-373- ή U-87 MG. Τα αποτελέσματα της άνωθεν πειραματικής πορείας δίδονται στις εικόνες 3.35 και 3.36. Όπως φαίνεται, η επίδραση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA οδήγησε σε μία σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης της νεστίνης κατά 2.4- έως 27-φορές σε κύτταρα U373/κλώνου 1 και κατά 1.5- έως 59-φορές σε κύτταρα U87/κλώνου 7. Επιπλέον, για τα κύτταρα U373/κλώνου 1 φαίνεται πως η μικρότερη συγκέντρωση του 1 mM VPA, επιφέρει μία σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του αστρογλοιακού δείκτη GFAP σε σχέση με τα αμεταχείριστα κύτταρα του κλώνου, η οποία όμως προοδευτικά φθίνει καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου. Αξιοσημείωτο μάλιστα είναι το γεγονός ότι στην συγκέντρωση των 4 mM VPA τα κύτταρα εμφανίζονται θετικά στον νευρωνικό δείκτη β III-τουμπουλίνη, η έκφραση του οποίου αυξάνεται περαιτέρω στην συγκέντρωση των 6 mM. Η σταδιακή μείωση της GFAP, σε συνδυασμό με την προοδευτική αύξηση της έκφρασης της β III-τουμπουλίνης μαρτυρά ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις VPA που επιφέρουν και υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης, ένας πληθυσμός των κυττάρων δια-διαφοροποιείται από αστρογλοιακά σε νευρωνικά κύτταρα. Αυτός ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός λαμβάνει χώρα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 4 και 6 mM VPA οι οποίες αντιστοιχούν σε συχνότητες ρετρομετάθεσης, της τάξης του 15.77- και 35.96 %, αντίστοιχα. Αντιθέτως για τα κύτταρα U87 του κλώνου 7 φαίνεται πως η έκφραση της GFAP χάνεται νωρίς, μόλις από την συγκέντρωση του 1 mM, και προοδευτικά, καθώς αυξάνεται η δόση του VPA και συνεπώς η επαγόμενη από αυτό συχνότητα ρετρομετάθεσης, αυξάνεται και η έκφραση της β III-τουμπουλίνης. Συνεπώς, και τα U-87 αστρογλοιακά κύτταρα του κλώνου 7 δια-διαφοροποιούνται προς νευρώνες. Η διαφορά ως προς τα U-373, έγκειται στο ότι αυτός ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός εκκινεί νωρίτερα, ακόμα και στη μικρότερη συγκέντρωση του 1mM VPA που αντιστοιχεί σε ποσοστό ρετρομετάθεσης της τάξης του 7.33%.



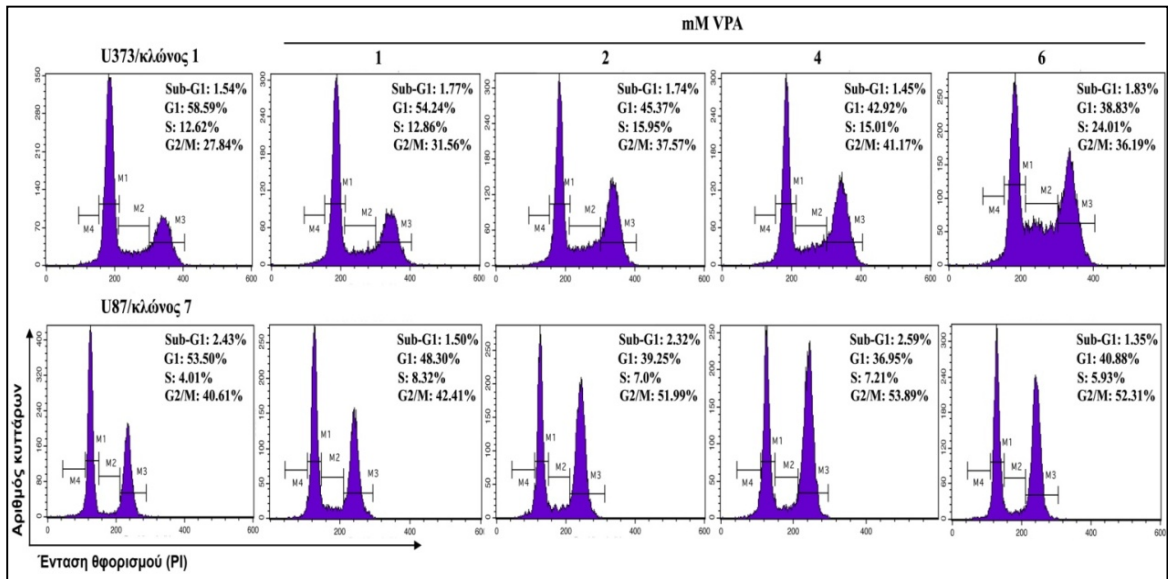
Εικόνα 3.35: Η επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση των *HERV-K10* μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνης, *GFAP* και βIII-τουμπολίνης, σε κύτταρα U373. **A:** Κύτταρα U373 κλώνου 1, που επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1 έως 6 mM για 96 ώρες, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και την πραγματοποίηση ανοσοαποτύπωσης κατά *Western*. 40 μg πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 10% δωδεκυλθειικού πολυακρυλαμιδίου. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μεταχειρίστηκαν με τα αντισώματα έναντι των νεστίνης, *GFAP*, βIII-τουμπολίνης, καθώς και *GAPDH* για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν δευτεροταγή αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο της ραφανικής υπεροξειδάσης (*HRP*). Στο πάνω μέρος της εικόνας αναγράφονται οι συγκεντρώσεις επίδρασης με VPA και στο δεξί μέρος, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών στις οποίες δεσμεύονται. **B.** Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών σε κύτταρα U373/κλώνου 1, τα οποία επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA.



Εικόνα 3.36: Η επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση των *HERV-K10* μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνης, GFAP και βIII-τουμπουλίνης, σε κύτταρα U87/κλώνου 7. 40μg πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, απομονωθέντων από κύτταρα U87 κλώνου 7 τα οποία προηγουμένως επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1-6 mM VPA, για 96 ώρες, χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στο πάνω μέρος της εικόνας αναγράφονται οι συγκεντρώσεις επίδρασης με VPA σε κύτταρα U87/κλώνου 7 και στο δεξί μέρος, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών στις οποίες δεσμεύονται. B. Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών των νεστίνης, GFAP και βIII-τουμπουλίνης σε κύτταρα U87/κλώνου 7, τα οποία επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA.

3.5.3 Η επαγόμενη από το βαλπροϊκό οξύ ρετρομετάθεση *HERV-K10* συσχετίζεται με δοδο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι το VPA περιορίζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής του κυτταρικού τους κύκλου. Έχοντας αυτό ως δεδομένο θελήσαμε να μελετήσουμε την δράση της επαγόμενης από το VPA ρετρομετάθεσης στο κυτταρικό κύκλο των δύο προαναφερθέντων απομονωμένων κλώνων. Για τον σκοπό αυτό, 250.000 κύτταρα από κάθε κλώνο (U373/κλώνος 1 ή U87/κλώνος 7) επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1 έως 6mM και μετά το πέρας 72 ωρών αναλύθηκαν με FACS για τον έλεγχο της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα του κάθε κλώνου (εικόνα 3.37).



Εικόνα 3.37: Κατανομή φάσεων κυτταρικού κύκλου κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση, U373 κλώνου 1 και U87 κλώνου 7, ύστερα από επίδραση με VPA. Κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1 έως 6 mM για 72 ώρες και στη συνέχεια έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. Η μέτρηση της έντασης φθορισμού βασίστηκε στην χρώση του DNA των υπό μελέτη δειγμάτων με 50 μg/ml ιωδιούχο προπίδιο. Στην εικόνα παρουσιάζονται ιστογραμμιακές κατανομές φθορισμού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου για τις διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου καθώς και αμεταχείριστων κυττάρων των κλώνων ως μάρτυρας. Τα αναγραφόμενα % ποσοστά αντιπροσωπεύουν τους πληθυσμούς των κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. M4:Sub-G1, M1:G0/G1, M2:S, M3:G2/M

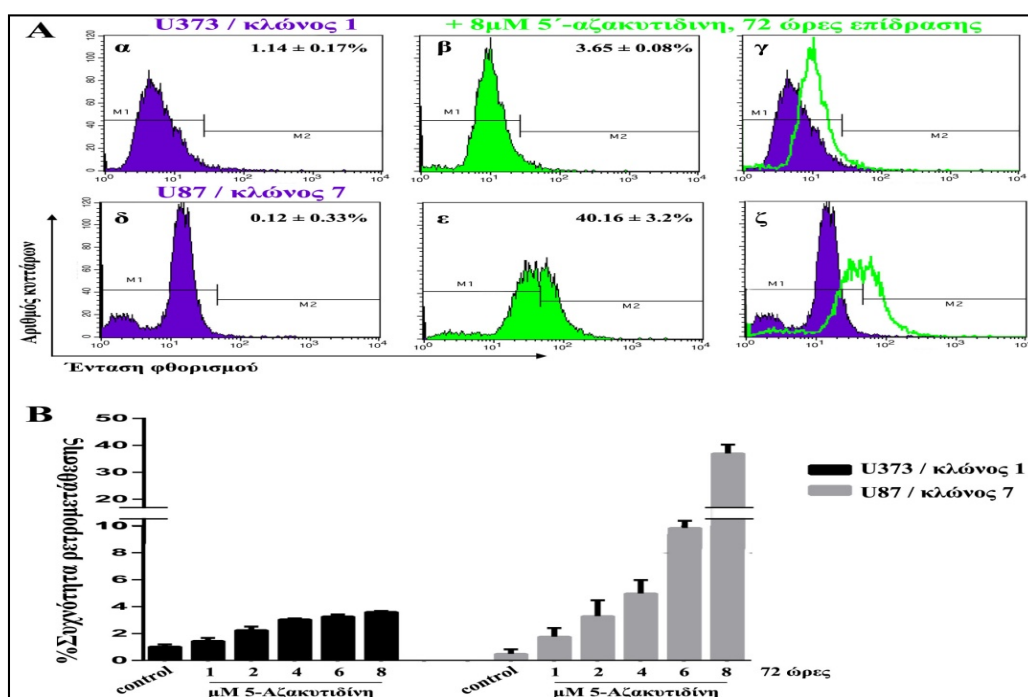
Η του κυτταρικού κύκλου κατέδειξε ότι αυξανόμενης της επαγόμενης από το VPA, συχνότητας ρετρομετάθεσης, τα κύτταρα και των δύο κλώνων εμφάνιζαν μία προοδευτική πληθυσμιακή συσσώρευση στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που παραμένουν στο σημείο ελέγχου G2/M, από 27.84- σε 41.1% για τα κύτταρα U373/κλώνου 1 και από 40.61- σε 53.89% για τα κύτταρα U87/κλώνου 7. Επιπλέον, για τα κύτταρα U373 του κλώνου 1, ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου στην οποία πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του DNA, αυξάνεται από 12.62- σε 24.1%. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα κύτταρα U87 του κλώνου 7, με την διαφορά ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται καθηλωμένα στη φάση S εντοπίζεται στην μικρότερη συγκέντρωση του φαρμάκου (από 4.01- σε 8.32%) και σταδιακά, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας το ποσοστό αυτό μειώνεται, παραμένοντας όμως σταθερά μεγαλύτερο σε σχέση με τα αμεταχείριστα κύτταρα του κλώνου.

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι αυξημένος αριθμός γεγονότων ρετρομετάθεσης που επάγονται κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο από το VPA συσχετίζεται με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου, και συγκεκριμένα με συσσώρευση μεγάλου αριθμού κυττάρων στις φάσεις S και G2/M.

3.5.4 Η 5-Αζακυτιδίνη επάγει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά δόσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό που έχει αναπτύξει το κύτταρο με στόχο την αναστολή της έκφρασης ή/και της κινητοποίησης των μεταθετών στοιχείων. Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται σε κατάλοιπα κυτοσσίνης που εντοπίζονται κυρίως σε νησίδες δινουκλεοτιδίων CpG, και έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική αποσιώπηση. Τα μεταθετά στοιχεία, και εν προκειμένω οι ενδογενείς ρετροϊοί διαθέτουν τέτοια επαναλαμβανόμενα μοτίβα CpG και φαίνεται να φέρουν μεθυλιωμένο DNA στην αλληλουχία τους.

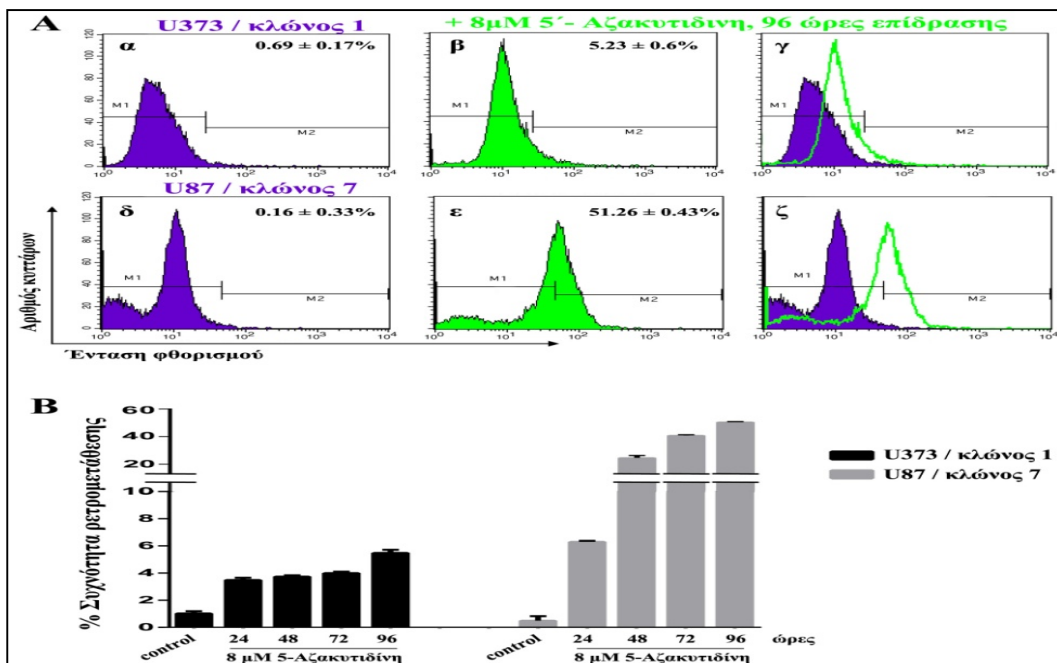
Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της μεθυλίωσης στην μεταγραφική ενεργοποίηση και ρετρομετάθεση των HERV-K10, κύτταρα από δύο χαρακτηριστικούς κλώνους με χαμηλά ποσοστά ρετρομετάθεσης επωάστηκαν με την ουσία 5-αζακυτιδίνη. Η ουσία αυτή αποτελεί έναν ευρέως διαδεδομένο από-μεθυλιωτικό παράγοντα ο οποίος εισερχόμενος στον κύτταρο, και μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA, επιφέρει παθητική απομεθυλίωσή του στα θυγατρικά κύτταρα μέσω αναστολής της δράσης των ενδοκυττάρων μεθυλοτρανσφερασών. Σε αυτή την κατεύθυνση, 120.000 κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6 και 8 μM 5-αζακυτιδίνης για 72 ώρες, και μετρήθηκαν με FACS για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης. Όπως αναμένετο, τα αποτελέσματα της μέτρησης στοιχειοθέτησαν μία δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης η οποία στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας άγγιξε τα ποσοστά του 3.65% για τα κύτταρα U373/κλώνου 1 και 40.16% για τα κύτταρα U87/κλώνου 7 (εικόνα 3.38).



Εικόνα 3.38: Δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των HERV-K10 μετά από επίδραση με 5'-αζακυτιδίνη. Κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5-αζακυτιδίνης από 1 έως 8 μM για 72 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης. A: Αντιπροσωπευτικές κατανομές της έντασης φθορισμού κυττάρων U373/κλώνου 1 (α) ή U87/κλώνου 7 (δ) ως μάρτυρας, κυττάρων U373/κλώνου 1 (β) ή U87/κλώνου 7 (ε) επωασμένων με 8 μM 5-αζακυτιδίνης για 72 ώρες, και επικάλυψη των κατανομών των δειγμάτων μάρτυρα και ελέγχου (γ, ζ).

Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτο-φθορισμού και φθορισμού EGFP, αντίστοιχα. B: Διαγραμματική απεικόνιση της συχνότητας ρετρομετάθεσης μετά από επίδραση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5-αζακυτιδίνης για 72 ώρες.

Έχοντας αποδείξει την δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της ρετρομετάθεσης από την 5-αζακυτιδίνη, θελήσαμε σε ένα επόμενο στάδιο να εξακριβώσουμε την ειδικότητα του φαινομένου εκθέτοντας τα κύτταρα σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση της ουσίας και μεταβάλλοντας τους χρόνους επίδρασής τους με αυτήν. Πιο συγκεκριμένα, 120.000 κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επώαστηκαν με 8 μ M 5-αζακυτιδίνης, τη συγκέντρωση που οδήγησε στη μέγιστη επαγωγή στο προηγούμενο πείραμα. Μετρήθηκε η συχνότητα ρετρομετάθεσης με μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα του εκάστοτε κλώνου έπειτα από 24, 48, 72 και 96 ώρες καλλιέργειας παρουσία 8 μ M της ουσίας στο θρεπτικό μέσο (εικόνα 3.39).

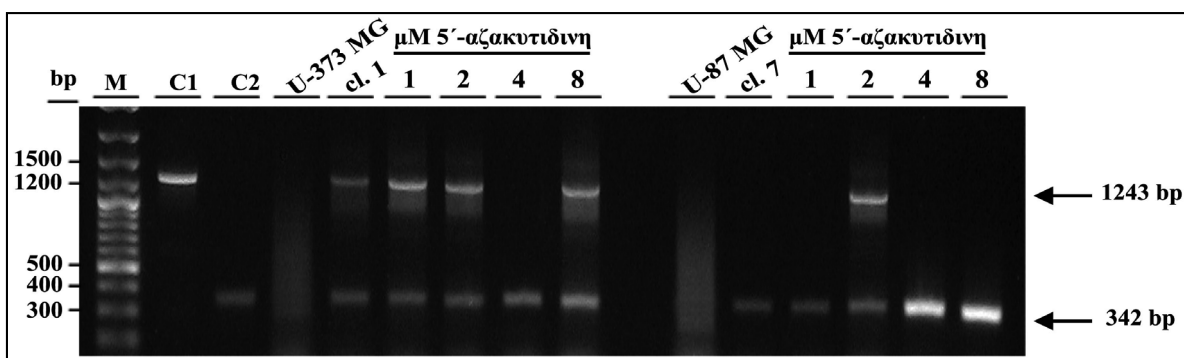


Εικόνα 3.39: Χρονο-εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των *HERV-K10* μετά από επίδραση με 5'-αζακυτιδίνη. Κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επώαστηκαν με 8 μ M 5-αζακυτιδίνης σε αυξανόμενους χρόνους επίδρασης 24, 48, 72 και 96 ωρών και μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης. A: Αντιπροσωπευτικές κατανομές της έντασης φθορισμού κυττάρων U373/κλώνου 1 (α) ή U87/κλώνου 7 (δ) ως μάρτυρες, κυττάρων U373/κλώνου 1 (β) ή U87/κλώνου 7 (ε) επωασμένων με 8 μ M 5-αζακυτιδίνης για 96 ώρες, και επικάλυψη των κατανομών των δειγμάτων μάρτυρα και ελέγχου (γ, ζ). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτο-φθορισμού και φθορισμού EGFP, αντίστοιχα. B: Διαγραμματική απεικόνιση της συχνότητας ρετρομετάθεσης μετά από επίδραση των κυττάρων με 8 μ M 5-αζακυτιδίνης σε διάφορα χρονικά σημεία.

Βρέθηκε ότι η 5-αζακυτιδίνη επάγει ισχυρά τη συχνότητα ρετρομετάθεσης με μέγιστο ποσοστό 5.23% για τα κύτταρα U373 κλώνου 1, και 51.26% για τα κύτταρα U87 κλώνου 7. Τα παραπάνω ποσοστά ελήφθησαν στον μέγιστο χρόνο επίδρασης που ήταν οι 96 ώρες.

Και σε αυτή την περίπτωση οι συχνότητες ρετρομετάθεσης παρουσίασαν μία προοδευτική αύξηση που ήταν ανάλογη της αύξησης του χρόνου επίδρασης με τον από-μεθυλιωτικό παράγοντα.

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω επαγόμενα από την 5'-αζακυτιδίνη γεγονότα ρετρομετάθεσης σε επίπεδο ενσωματώσεων στο DNA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR. Προς αυτή την κατεύθυνση, απομονώθηκαν εκχυλίσματα DNA από κύτταρα U373-HERV-K10 κλώνου 1 ή U87-HERV-K10 κλώνου 7 στα οποία είχε προηγηθεί επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1-8μM 5'-αζακυτιδίνης για 72 ώρες. Ως κύτταρα-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα αρχικά μη-διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς, όσο και μη επιδρούμενα με την ουσία κύτταρα του κάθε κλώνου (U373-HERV-K10 κλώνος 1 ή U87-HERV-K10 κλώνος 7). Ακολούθησε ανάλυση PCR (εικόνα 3.40).



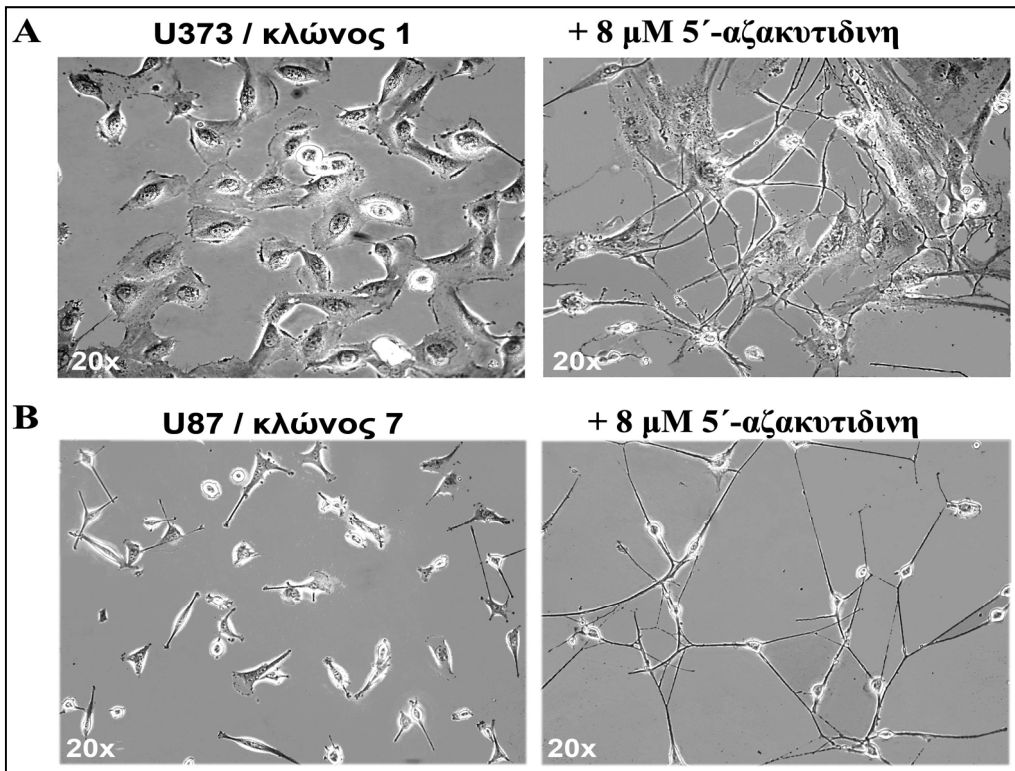
Εικόνα 3.40: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε γενωμικό επίπεδο μετά από επίδραση με 5'-αζακυτιδίνη. Ανάλυση PCR για το γονίδιο της EGFP προς ταυτοποίηση ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων σε κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 μεταχειρισμένα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις από 1 έως 8 μM 5'-AZA για 72 ώρες. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα U-373 MG ή U-87 MG καθώς και μη μεταχειρισμένα με 5'-AZA κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7.

Η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης ειβεβαιώθηκε μέσω ανίχνευσης της διαγνωστικής δέσμης των 342 bp σε όλα τα δείγματα ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων και των μη επιδρούμενων με την ουσία κυττάρων του εκάστοτε κλώνου. Μάλιστα, παρατηρούμε μία δοδο-εξαρτώμενη αύξηση της πυκνότητας της εν λόγω ζώνης γεγονός που σηματοδοτεί τον μεγαλύτερο αριθμό ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων που παρήχθησαν καθώς αυξανόταν η δόση του από-μεθυλιωτικού παράγοντα που χορηγούνταν στα κύτταρα κάθε φορά.

3.5.5 Η επαγόμενη από την 5'-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση που έγινε κατά την επίδραση κυττάρων U373-HERV-K10 ή U87-HERV-K10 με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα, 5'-αζακυτιδίνη, ήταν ότι η δράση της οδήγησε σε φαινοτυπικές αλλαγές που ήταν εντονότερες στην μέγιστη συγκέντρωση των 8μM. Εν προκειμένω, πραγματοποιήθηκε επίδραση κυττάρων U373-HERV-K10/κλώνου 1 ή U87-HERV-K10/κλώνου 7 με 8μM της ουσίας, και μετά το πέρας 72 ωρών τα κύτταρα εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Στην εικόνα 3.41 παρατίθενται χαρακτηριστικά πεδία φωτογράφισης των κυττάρων τόσο των αρχικών κλώνων (χωρίς την προσθήκη της ουσίας) όσο και των μεταχειρισμένων με την μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας κυττάρων.

Τα κυτταρικά φαινόμενα που παρατηρούνται είναι ανάλογα με εκείνα που προκλήθηκαν από την δράση του VPA στους ίδιους κλώνους. Πιο ειδικά, και στην περίπτωση της επίδρασης με 5'-αζακυτιδίνη, τα κύτταρα των κλώνων 1 και 7 εμφανίζουν μία χαρακτηριστική μεταβολή του φαινοτύπου τους που συνίσταται σε κύτταρα με μακρές κυτταρικές απολήξεις, ενδεικτικές της κυτταρικής διαφοροποίησης που συντελέστηκε σε αυτά.



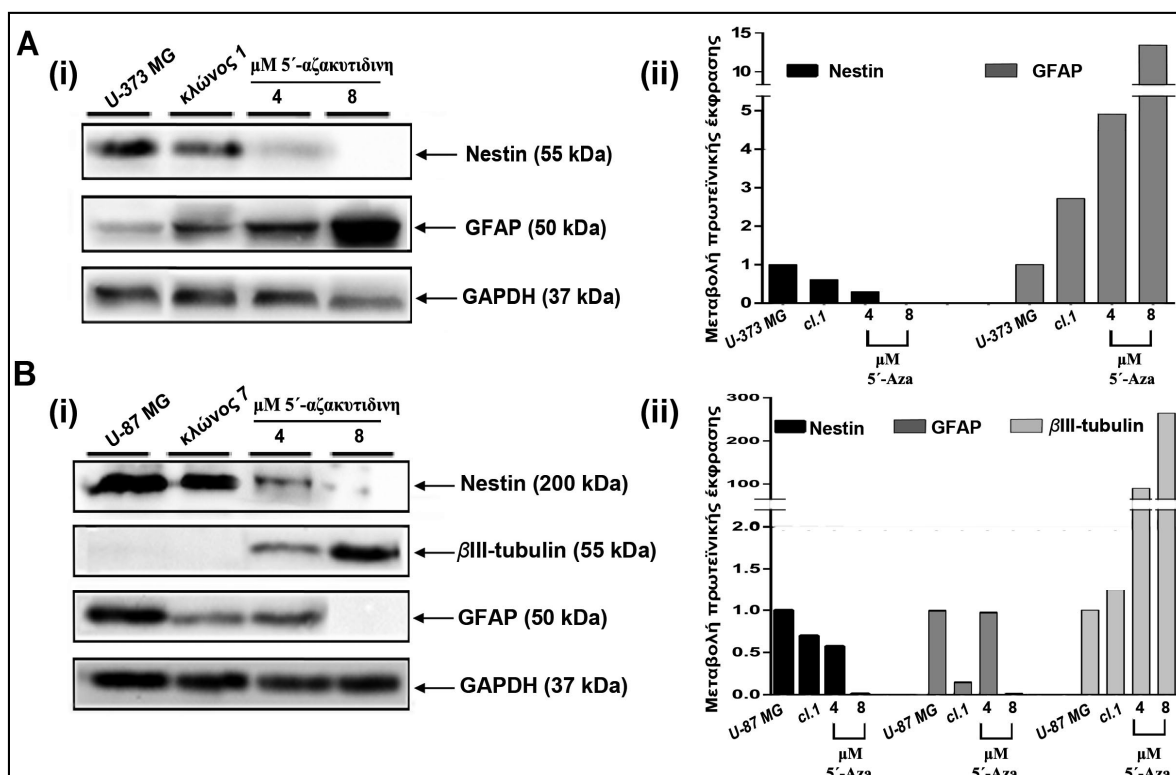
Εικόνα 3.41: Η επαγόμενη από την 5'-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση των στοιχείων *HERV-K10* σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης σε κύτταρα κλώνων U373 και U87. Μορφολογική εξέταση κυττάρων από δύο κλώνους οι οποίοι επωάστηκαν με 8 μM 5'-αζακυτιδίνης για 72 ώρες. Παρατηρείται μια έντονη αλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου που χαρακτηρίζεται από κύτταρα με μακρές και λεπτές αποφυάδες.

Η διαφαινόμενη κυτταρική διαφοροποίηση στοιχειοθετήθηκε περαιτέρω με ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης των δεικτών νεστίνης, GFAP και β III-τουμπουλίνης. Συγκεκριμένα, κύτταρα των προαναφερθέντων κλώνων επωάστηκαν με συγκεντρώσεις 4 και 8 μM ουσίας, για 72 ώρες, συνθήκες στις οποίες παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες συχνότητες ρετρομετάθεσης, αλλά και οι πιο έντονες φαινοτυπικές αλλαγές, και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα αρχικά μη-διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα, όσο και κύτταρα του εκάστοτε κλώνου χωρίς την προσθήκη του από-μεθυλιωτικού παράγοντα.

Η μικρότερη συγκέντρωση των 4 μM 5'-AZA που επάγει συχνότητες ρετρομετάθεσης της τάξης του 3.0% σε κύτταρα U373/κλώνου 1 προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της νεστίνης κατά 48 φορές και ταυτόχρονα αύξηση των επιπέδων έκφρασης της GFAP κατά 1.6 φορές, συγκριτικά με τα αμεταχειρίιστα κύτταρα του κλώνου. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των 8 μM 5-AZA που επάγει συχνότητες

ρετρομετάθεσης της τάξης του 3.65, αναστέλλει εντελώς την έκφραση της νεστίνης και επάγει κατά 13.4 φορές την GFAP (εικόνα 3.42 A).

Παρομοίως, για τα κύτταρα U87/κλώνου 1 οι συγκεντρώσεις των 4 και 8 μM 5'-AZA, που επάγουν συχνότητες ρετρομετάθεσης 5.8 και 40.16%, προκαλούν μία σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της νεστίνης κατά 82 και 100 φορές, αντίστοιχα. Επιπλέον επάγεται η βIII -τουμπουλίνη η οποία παρουσιάζει μία δοσο-εξαρτώμενη από την 5'-AZA αύξηση της έκφρασής της, συγκριτικά με τα αμεταχειρίιστα κύτταρα του κλώνου. Τέλος, η GFAP εμφανίζει αύξηση της έκφρασής της στην μικρότερη συγκέντρωση των 4 μM , η οποία όμως χάνεται ολοσχερώς στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 8 μM (εικόνα 3.42 B).

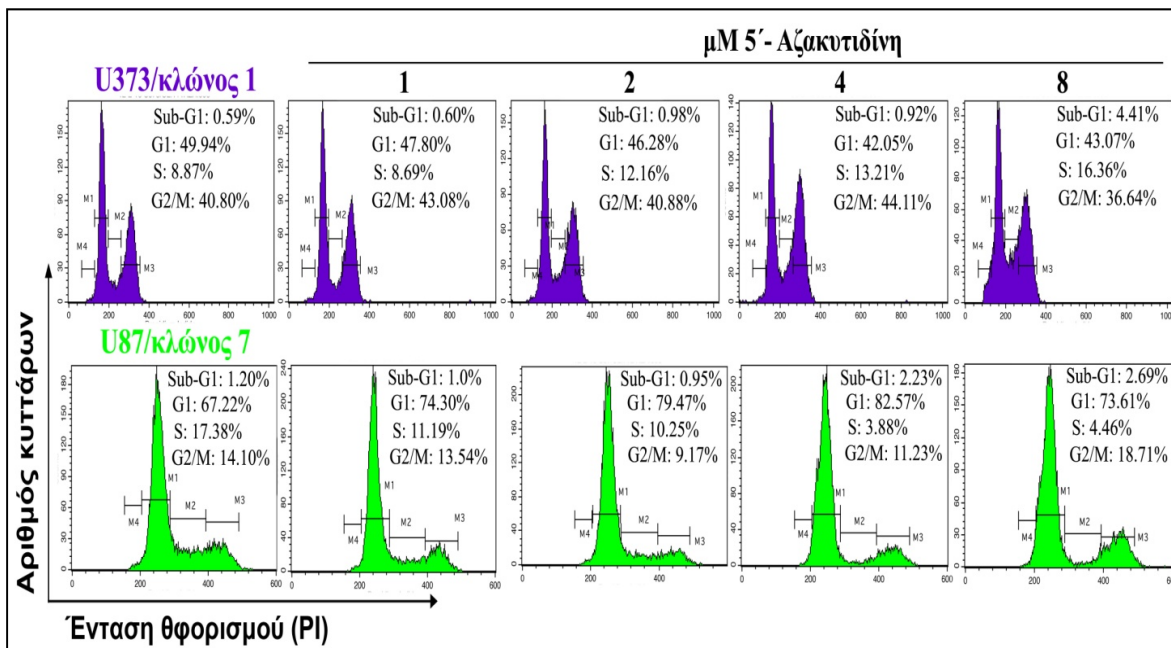


Εικόνα 3.42: Η επαγόμενη από την 5'-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση των *HERV-K10* μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνης, GFAP και βIII -τουμπουλίνης, σε κύτταρα U373 και U87. A(i), B(i): Κύτταρα U373 κλώνου 1 ή U87 κλώνου 7 που επωάστηκαν με 4 και 8 μM 5'-αζακυτιδίνης για 72 ώρες, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και την πραγματοποίηση ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταχειρίστηκαν με τα αντισώματα έναντι των νεστίνης, GFAP, βIII -τουμπουλίνης, καθώς και GAPDH για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. A(ii), B(ii). Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών σε κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7, τα οποία επωάστηκαν με τις δύο συγκεντρώσεις του από-μεθυλιωτικού παράγοντα,

3.5.6 Η επαγόμενη από τη 5'-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση των στοιχείων *HERV-K10* συσχετίζεται με δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Σε ένα επόμενο στάδιο θελήσαμε να μελετήσουμε την δράση της επαγόμενης από την 5'-AZA ρετρομετάθεσης στο κυτταρικό κύκλο των δύο προαναφερθέντων απομονωμένων κλώνων. Για τον σκοπό αυτό, 250.000 κύτταρα από κάθε κλώνο (U373/κλώνος 1 ή U87/κλώνος 7) επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5'-AZA από 1 έως 8 μM και μετά το πέρας 72 ωρών αναλύθηκαν με FACS για τον έλεγχο της κατανομής των φάσεων

του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα αμεταχείριστα κύτταρα του κάθε κλώνου (εικόνα 3.43).



Εικόνα 3.43: Κατανομή φάσεων κυτταρικού κύκλου κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση, U373 κλώνου 1 ή U87 κλώνου 7, ύστερα από επίδραση με 5'-αζακυτιδίνη. Κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 5'-AZA από 1 έως 8 μM για 72 ώρες και στη συνέχεια έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω μέτρησης της ποσότητας DNA με FACS. Η μέτρηση της έντασης θρορισμού βασίστηκε στην χρώση του DNA των υπό μελέτη δειγμάτων με 50 μg/ml ιωδιούχο προπίδιο. Στην εικόνα παρουσιάζονται ιστογραμιατικές κατανομές θρορισμού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου για τις διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου καθώς και αμεταχείριστων κυττάρων των κλώνων ως μάρτυρας. Τα αναγραφόμενα % ποσοστά αντιπροσωπεύουν τους πληθυσμούς των κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. M4:Sub-G1, M1:G0/G1, M2:S, M3:G2/M.

Η ανάλυση για την κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου κατέδειξε ότι αυξανόμενης της επαγόμενης από την 5'-AZA, συχνότητας ρετρομετάθεσης, τα κύτταρα U373 κλώνου 1 εμφάνιζαν μία προοδευτική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, από 8.87- σε 16.36%. Επιπλέον στην μέγιστη συγκέντρωση των 8 μM παρατηρείται αύξηση του αριθμού των υποδιπλοειδών κυττάρων (subG1) από 0.59- σε 4.41%.

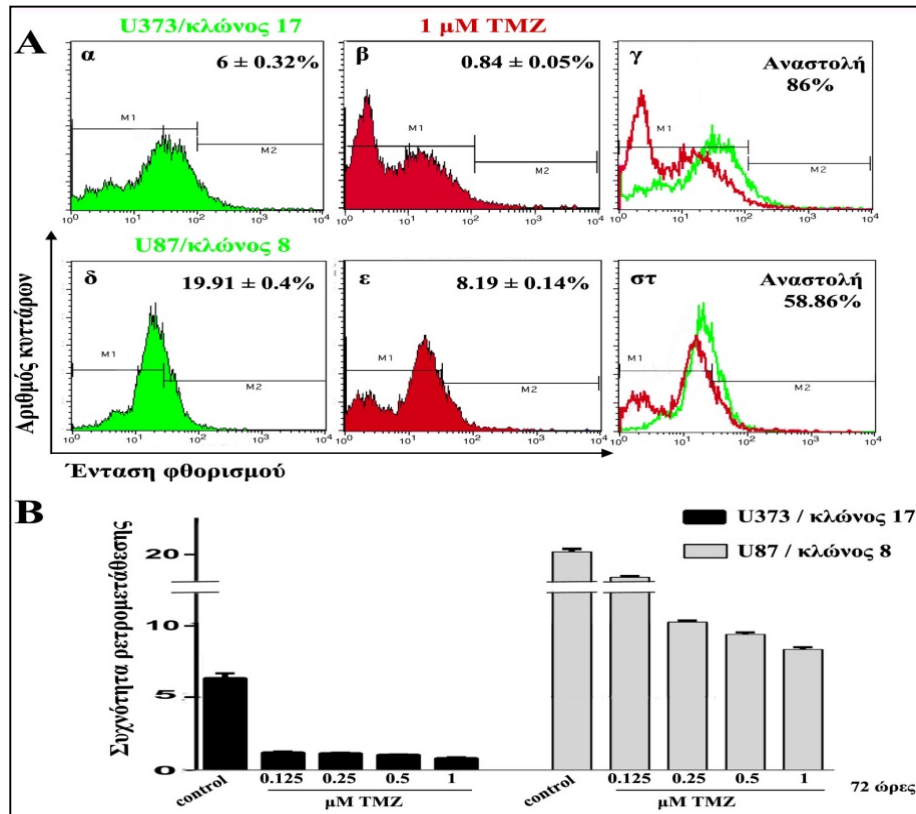
Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου για τα κύτταρα U87 κλώνου 7 αποκάλυψε ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του απομεθυλιωτικού παράγοντα από 1 – 4 μM, αυξάνεται κατά αντιστοιχία και το ποσοστό των κυττάρων που εντοπίζονται στο σημείο ελέγχου G1 από 67.22- σε 82.57%. Στη μέγιστη συγκέντρωση των 8 μM ωστόσο, παρατηρείται μία μικρή πτώση του ποσοστού των κυττάρων που εντοπίζονται στη φάση G1, ενώ παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται καθηλωμένα στο σημείο ελέγχου G2/M από 14.10- σε 18.71% (εικόνα 14).

3.5.7 Η τεμοζολομίδη αναστέλλει την ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10, κατά δόσο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο.

Η τεμοζολομίδη αποτελεί έναν αλκυλιωτικό παράγοντα που έχει πρόσφατα εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές για την θεραπεία ασθενών με πρωτογενές ή υποτροπιάζων γλοιώμα υψηλού βαθμού, συμπεριλαμβανομένων του αναπλαστικού αστροκυττώματος και του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (352), (353). Η τεμοζολομίδη φέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων αλκυλιωτικών παραγόντων που εφαρμόζονται στη χημειοθεραπεία κακοηθειών. Μεταξύ αυτών είναι και η ίδια η δομή της ουσίας η οποία επιτρέπει την από του στόματος χορήγηση της στον ασθενή καθώς αποτελεί ένα μικρό λιπόφιλο μόριο, μοριακού βάρους 194 Da το οποίο μπορεί και διαπερνά αποτελεσματικά τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό. Θεωρείται ακόμα ότι οι παρενέργειες του φαρμάκου αυτού είναι σχετικά πιο ήπιες συγκρινόμενες με εκείνες αντίστοιχων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων (354). Τα επίπεδα της τεμοζολομιδης που εντοπίζονται στον εγκέφαλο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό αγγίζουν το 30-40% των επιπέδων της ουσίας στο πλάσμα. Επιπλέον, η τεμοζολομίδη είναι λιγότερο τοξική ως προς τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα συγκριτικά με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, εξαιτίας του ότι τροποποιεί μία μονή βάση του DNA χωρίς να οδηγεί στον σχηματισμό χιαστών συνδέσεων στο DNA (cross-linking).

Η κυτταροτοξότητα της δράσης έγκειται στην αλκυλίωση του DNA στις θέσεις N⁷ και O⁶ των καταλοίπων γουανίνης καθώς και στην θέση O³ των καταλοίπων αδενίνης. Ιδιαίτερα, η μεθυλίωση στην θέση O⁶ της γουανίνης φαίνεται ότι συνδράμει σημαντικά στην κυτταροτοξικότητα του φαρμάκου καθώς οδηγεί στον σχηματισμό της O⁶-μεθυλογουανίνης η οποία αναγνωρίζεται από τις DNA πολυμεράσες ως αδενίνη και οδηγεί σε λανθασμένο ζευγάρισμα με την θυμιδίνη σε κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA (355), (356). Το τελικό αποτέλεσμα της κυτταροτοξικής δράσης της τεμοζολομιδης είναι η απόπτωση του καρκινικού κυττάρου.

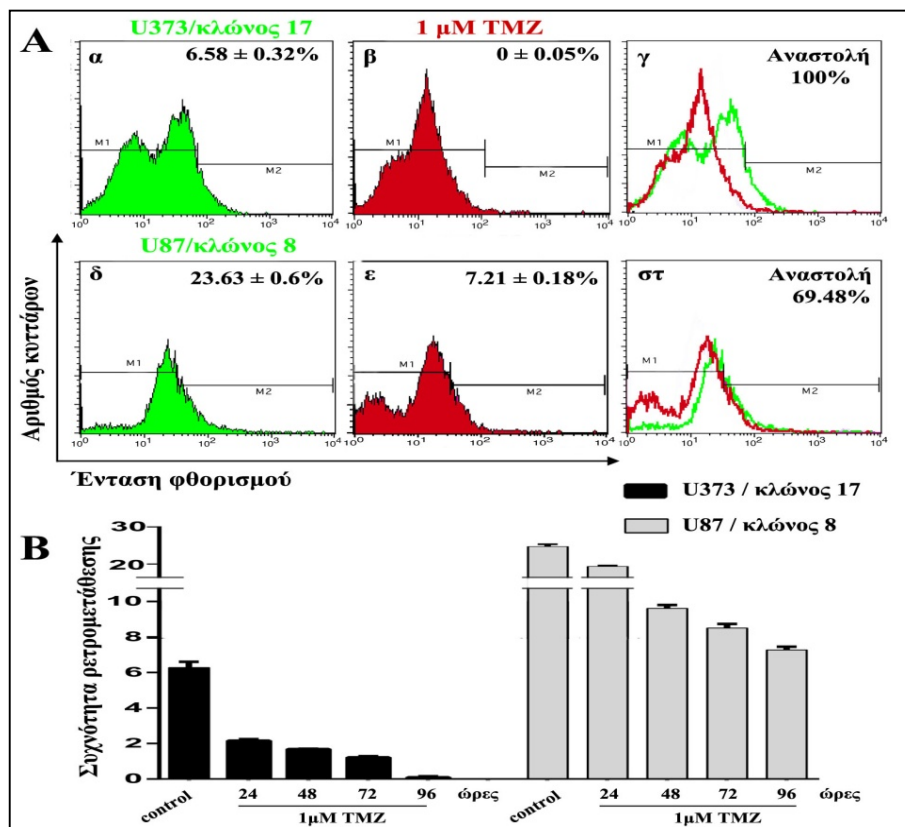
Θέλοντας να μελετήσουμε την δράση της τεμοζολομιδης στην ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10, επιλέξαμε το κυτταρικό σύστημα μελέτης μας βασιζόμενοι στη υπόθεση της πιθανούς αναστολής της ρετρομετάθεσης από το συγκεκριμένο φάρμακο. Έχοντας αυτό ως δεδομένο, κρίθηκε αναγκαία η επιλογή κυτταρικών συστημάτων μελέτης της δράσης του φαρμάκου που θα εμφάνιζαν αρχικά υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης για να είναι πιο ξεκάθαρη και αξιολογήσιμη η ενδεχόμενη μείωσή τους από την τεμοζολομίδη. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε ένας κλώνος από κάθε κυτταρική σειρά (U373/κλώνος 17 ή U87/κλώνος 8) ο οποίος είχε εμφανίσει υψηλά ποσοστά ρετρομετάθεσης και ελέγχθηκε εκ νέου ως προς αυτά, την δεδομένη χρονική στιγμή με FACS. Τα ποσοστά των κυττάρων-θετικών σε ρετρομετάθεση κυμάνθηκαν στο 6% για τα κύτταρα U373 του κλώνου 17 και στο 19.91% για τα κύτταρα U87 του κλώνου 8. Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις στα ποσοστά της συγκεκριμένης μέτρησης από τα ποσοστά που καταγράφηκαν αρχικά, ύστερα από την διαμόλυνση και επιλογή των κυτταρικών κλώνων, οφείλονται στο γεγονός ότι η ρετρομετάθεση είναι ένα δυναμικό φαινόμενο και η συχνότητα με την οποία πραγματοποιείται μεταβάλλεται σε συνάρτηση με τον χρόνο σε συνθήκες συνεχούς καλλιέργειας. Αφού επιβεβαιώθηκαν εκ νέου οι υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης των εν λόγω κλώνων, εν συνεχεία προχωρήσαμε στην επίδραση αυτών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τεμοζολομιδης. Προς αυτή την κατεύθυνση, 100.000 κύτταρα U373/κλώνου 17 ή U87/κλώνου 8 μεταχειρίστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τεμοζολομιδης (TMZ), από 0.125 έως 1 μM για 72 ώρες. Εν συνεχεία, τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης (εικόνα 3.44).



Εικόνα 3.44: Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των *HERV-K10* μετά από επίδραση με τεμοζολομίδη. Κύτταρα U373/κλώνου 17 ή U87/κλώνου 8 μεταχειρίστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις TMZ από 0.125 έως 1 μM για 96 ώρες και αναλύθηκαν με FACS. **A:** αντιπροσωπευτικές κατανομές της έντασης φθορισμού αμεταχειριστων κυττάρων του κάθε κλώνου (**α**, **δ**), κυττάρων επωασμένων με 1 μM TMZ για 72 ώρες (**β**, **ε**) και οι αντίστοιχες επικαλύψεις των δειγμάτων μάρτυρα και ελέγχου (**γ**, **στ**). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής. Όπου M1 και M2 τα παράθυρα αυτοφθορισμού και φθορισμού EGFP, αντίστοιχα. **B:** διαγραμματική απεικόνιση των % μετρούμενων συχνότητων ρετρομετάθεσης.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης κατέδειξαν μία δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης. Η μέγιστη % αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης από την TMZ παρατηρήθηκε στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του 1 μM και κυμάνθηκε στο 86% για τα κύτταρα U373 του κλώνου 17 και στο 58.86% για τα κύτταρα U87 του κλώνου 8.

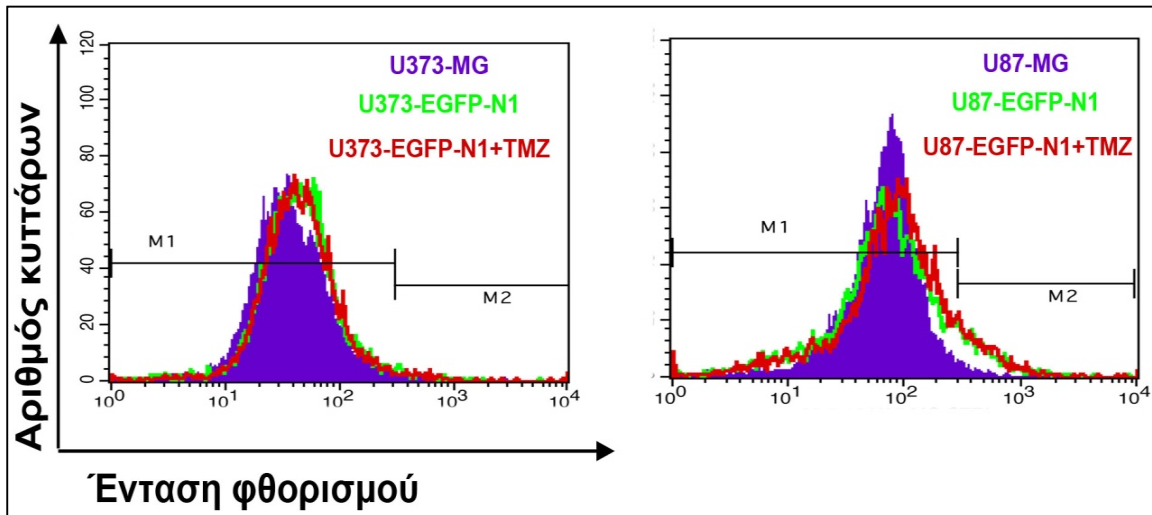
Σε ένα επόμενο στάδιο θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν η αναστολή αυτή παρατηρείται και σε συνάρτηση με τον χρόνο επίδρασης των κυττάρων με TMZ. Σε αυτή την κατεύθυνση, 100.000 κύτταρα των προαναφερθέντων κλώνων εκτέθηκαν σε 1 μM TMZ για 24, 48, 72 και 96 ώρες. Σε κάθε χρονικό σημείο τα κύτταρα αναλύονταν με FACS για την μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης (εικόνα 3.45).



Εικόνα 3.45: Χρονο-εξαρτώμενη αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των *HERV-K10* μετά από επίδραση με τεμοζολομίδη. Σε κύτταρα U373/κλώνου 17 ή U87/κλώνου 8 πραγματοποιήθηκε επίδραση με 1 μ M TMZ σε αυξανόμενους χρόνους έκθεσης, 24, 48, 72 και 96 ώρες, και αναλύθηκαν με FACS. A: αντιπροσωπευτικές κατανομές της έντασης φθορισμού αμεταχειριστων κυττάρων του κάθε κλώνου (α, δ), κυττάρων επωασμένων με 1 μ M TMZ για 96 ώρες (β, ε) και οι αντίστοιχες επικαλύψεις των δειγμάτων μάρτυρα και ελέγχου (γ, στ). Το ποσοστό που αναγράφεται εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος αντιστοιχεί στο μέσο όρο της συχνότητας ρετρομετάθεσης που μετρήθηκε από δύο ανεξάρτητα πειράματα ($n=2$) \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής B: διαγραμματική απεικόνιση των % μετρούμενων συχνοτήτων ρετρομετάθεσης.

Και σε αυτή την περίπτωση διαπιστώθηκε μία χρονο-εξαρτώμενη αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης. Η μέγιστη % αναστολή παρατηρήθηκε στις 96 ώρες επίδρασης και άγγιξε το 100% για τα κύτταρα U373 του κλώνου 17 και το 69.48% για τα κύτταρα U87 του κλώνου 8.

Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα λήψης ψευδών αποτελεσμάτων λόγω επίδρασης της τεμοζολομίδης στο γονίδιο της EGFP πρωτεΐνης και όχι στη ρετρομετάθεση, κρίθηκε σκόπιμη η επώαση κυττάρων U373/EGFP-N1 και U87/EGFP-N1 με την εν λόγω ουσία και εν συνεχεία, η μέτρηση του ποσοστού των EGFP-θετικών για κάθε περίπτωση κυττάρων, πριν και μετά την επίδραση. Προς αυτή την κατεύθυνση 100.000 κύτταρα U373/EGFP-N1 ή U87/EGFP-N1 επώαστηκαν με 1 μ M TMZ, για 96 ώρες (συνθήκες στις οποίες παρατηρήθηκε η μέγιστη αναστολή) και ακολούθησε ανάλυσή τους με FACS χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες τα αντίστοιχα μη μεταχειρισμένα με TMZ κύτταρα.

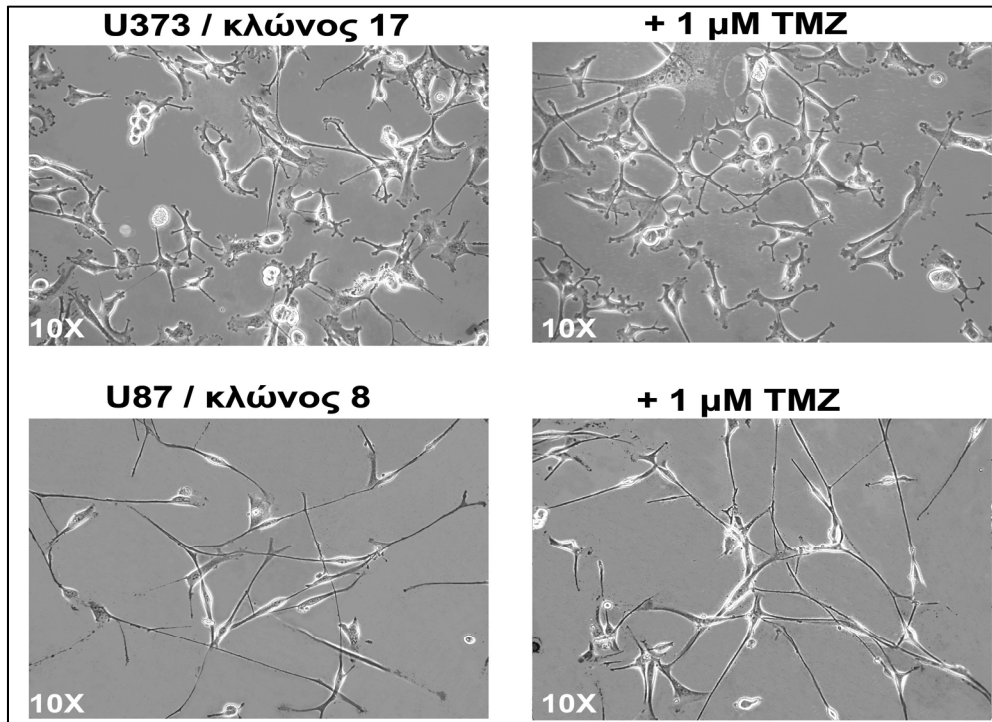


Εικόνα 3.47: Η τεμοζολομίδη δεν επηρεάζει την έκφραση της EGFP σε κύτταρα U373/EGFP-N1 ή U87/EGFP-N1. Σε κύτταρα U373/EGFP-N1 ή U87/EGFP-N1 πραγματοποιήθηκε επίδραση με 1 μ M TMZ για 96 ώρες και εν συνεχεία ακολούθησε ανάλυσή τους με FACS. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές επικαλύψεις κατανομών έντασης φθορισμού κυττάρων: με διαμολυσμένων με το πλασμίδιο της EGFP U373- ή U-87 MG (μωβ χρώμα), U373- ή U87/EGFP-N1 (πράσινο χρώμα) και U373- ή U87-EGFP-N1+TMZ (κόκκινο χρώμα).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν κατέδειξαν μεταβολές στην ένταση φθορισμού της EGFP μετά από επίδραση με TMZ σε κύτταρα U373/EGFP-N1 ή U87/EGFP-N1.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η τεμοζολομίδη αναστέλλει την ρετρομετάθεση των HERV-K10 κατά ειδικό τρόπο.

Η μορφολογική εξέταση των μεταχειρισμένων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τεμοζολομίδης κυττάρων U373/κλώνος 17 ή U87/κλώνος 8, δεν υπέδειξε κάποια μεταβολή στον φαινότυπό τους συγκριτικά πάντα με τα αρχικά αμεταχειρίστα κύτταρα του εκαστοτε κλώνου (εικόνα 3.47).



Εικόνα 3.47: Μορφολογία κυττάρων θετικών ρετρομετάθεσης ύστερα από επίδραση με τεμοζολομίδη. Κύτταρα U373/κλώνου 17 ή U87/κλώνου 8 στα οποία πραγματοποιήθηκε επίδραση με 1 μM TMZ για 72 ώρες, καθώς και αμεταχείριστα κύτταρα του εκάστοτε κλώνου φωτογραφήθηκαν σε μεγέθυνση 10x.

3.5.8 Η επίδραση του αναστολέα των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών Efavirenz στην επαγωγική ρετρομετάθεση των HERV-K10.

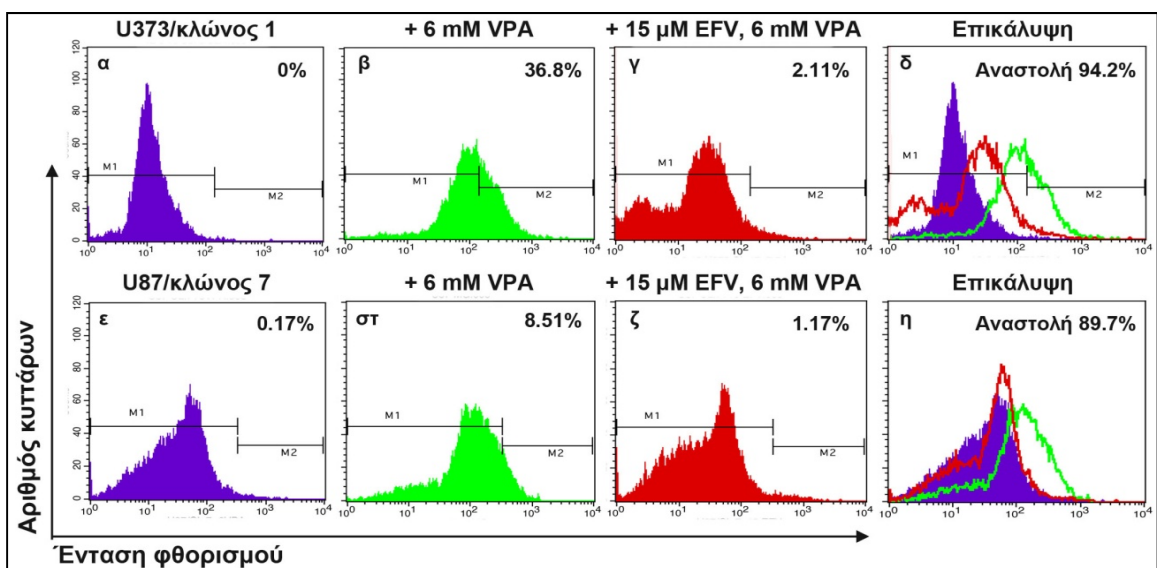
Προκειμένου να στοιχειοθετηθεί περαιτέρω η συσχέτιση της ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 με την επαγωγή κυτταρικής διαφοροποίησης σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη των εν λόγω φαινομένων ακολουθώντας μία αντίστροφη προσέγγιση. Πιο ειδικά, και στα πλαίσια μελέτης του μηχανισμού ρύθμισης της ρετρομετάθεσης, η λογική αυτής της προσέγγισης επικεντρώθηκε στην επίδραση ουσιών που λειτουργούν ως παράγοντες αναστολής της ρετρομετάθεσης των HERV-K10 και στην μελέτη της επακόλουθης πιθανούς αναστολής φαινομένων κυτταρικής διαφοροποίησης σε αυτά.

Η επαγωγή γεγονότων ρετρομετάθεσης από ένα μη αυτόνομο ρετρομεταθετό στοιχείο όπως είναι τα HERV-K10, συνεπάγεται πέραν της μεταγραφικής ενεργοποίησης του στοιχείου και την ταυτόχρονη *in trans* επαγωγή ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών που επιτελούν ένα θεμελιώδες σημασίας στάδιο της πορείας ενσωμάτωσής του προϊόντος σε μία νέα θέση στο κυτταρικό γένωμα που είναι η αντίστροφη μεταγραφή του ρετροτρανσποζονιακού γενώματος.

Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στον σχεδιασμό μίας πειραματικής διαδικασίας που θα στόχευε στην αναστολή της ρετρομετάθεσης εν τη γενέσει της με την χρήση ενός ειδικού αναστολέα των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών (enRTs), και την συσχέτιση αυτής της αναστολής με ενδεχόμενη αναχαίτιση της διαφοροποίησης των κυττάρων-ελέγχου. Προς αυτή την κατεύθυνση επιλέχθηκαν αυτή την φορά ως κυτταρικά συστήματα μελέτης ένας κλώνος από κάθε κυτταρική σειρά ο οποίος ήταν αρνητικός ή

εμφάνιζε χαμηλά επίπεδα τόσο ρετρομετάθεσης όσο και διαφοροποίησης (U373/κλώνος 1 και U87/κλώνος 7). Ως αναστολέας των ενδογενών ενRTs επιλέχθηκε η ουσία Efavirenz.

Αρχικά, κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 προεπώσθησαν για δύο ώρες με 15 μM Efavirenz (EFV) και έπειτα ακολούθησε η προσθήκη 6mM VPA για 72 ώρες. Ως θετικός μάρτυρας τόσο της επαγόμενης ρετρομετάθεσης όσο και διαφοροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα κύτταρα μεταχειρισμένα μόνο με 6mM της ουσίας VPA, για 72 ώρες επίδρασης, που όπως παρατηρήσαμε παραπάνω ενισχύει σημαντικά τόσο την συχνότητα ρετρομετάθεσης, όσο και την κυτταρική διαφοροποίηση. Μετά το πέρας των 72 ωρών όλα τα προαναφερθέντα δείγματα, ελέγχου (U373/κλώνος 1 ή U87/κλώνος 7 + 15 μM EFV + 6 mM VPA), θετικού μάρτυρα (U373/κλώνος 1 ή U87/κλώνος 7 + 6 mM VPA) και αρνητικού μάρτυρα (U373/κλώνος 1 ή U87/κλώνος 7) αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης (εικόνα 3.48).

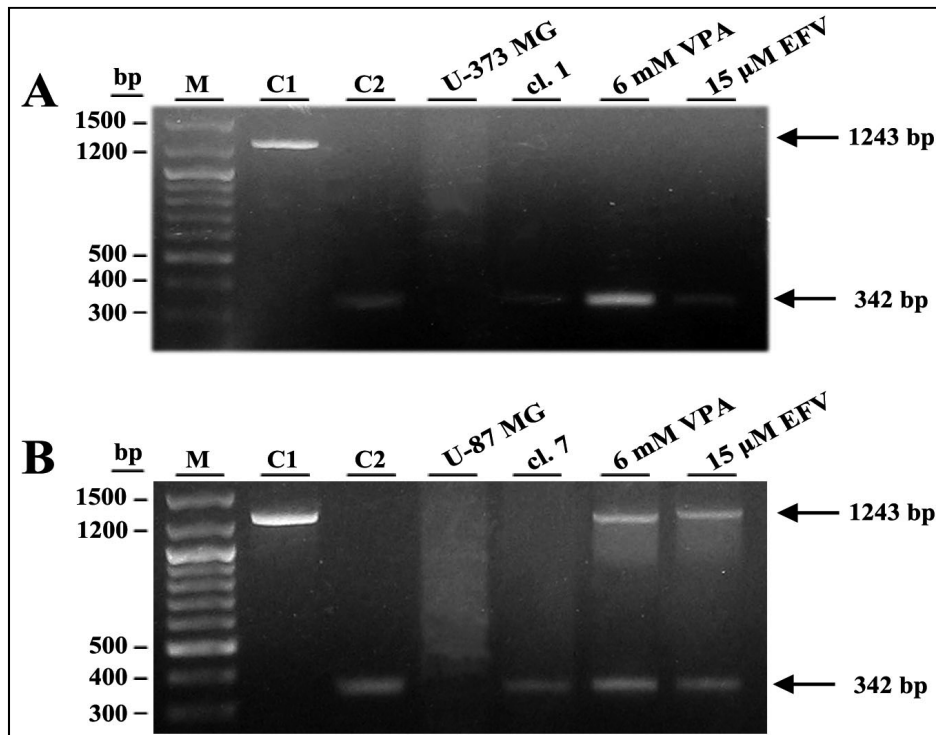


Εικόνα 3.48: Αναστολή της επαγόμενης από VPA συχνότητας ρετρομετάθεσης των *HERV-K10* μετά από επίδραση με *Efavirenz*. 200.000 κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 προεπώσθησαν για διάστημα δύο ωρών με 15 μM Efavirenz και εν συνεχεία προστέθηκαν σε αυτά 6 mM της ουσίας VPA για διάστημα 72 ωρών. Τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης, χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα τα αρχικά αμεταχειριστά κύτταρα του κλώνου για κάθε κυτταρική σειρά και ως θετικό μάρτυρα τα κύτταρα του εκάστοτε κλώνου επωασμένα με 6 mM VPA για 72 ώρες. Παρατίθενται αντιπροσωπευτικές κατανομές της έντασης φθορισμού κυττάρων U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 (α, ε), κυττάρων U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επωασμένα με 6 mM VPA για 72 ώρες (β, στ), κυττάρων U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 επωασμένα με 15 μM EFV + 6 mM VPA για 72 ώρες και τέλος οι επικαλύψεις των κατανομών των ανωτέρω δειγμάτων για κάθε κυτταρική σειρά (δ, η). Εντός του πλαισίου κάθε ιστογράμματος δίδεται η καταγεγραμμένη % συχνότητα ρετρομετάθεσης που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο κάθε φορά δείγμα.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η επαγόμενη από το VPA συχνότητα ρετρομετάθεσης αναστέλεται από την δράση του EFV, σε ποσοστό 94.2% για τα κύτταρα U373/κλώνου 1 και 89.7% για τα κύτταρα U87/κλώνου 7.

Ακολούθησε η επιβεβαίωση των ρετροτρανσποζονιακών ενθέσεων στο γένωμα και σε επίπεδο DNA. Προς αυτή την κατεύθυνση, απομονώθηκαν εκχυλίσματα DNA από όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις δειγμάτων ελέγχου και μάρτυρα και ακολούθησε

ανάλυση PCR με σκοπό την ανίχνευση της ειδικής διαγνωστικής για γεγονότα ρετρομετάθεσης δέσμης των 342bp.

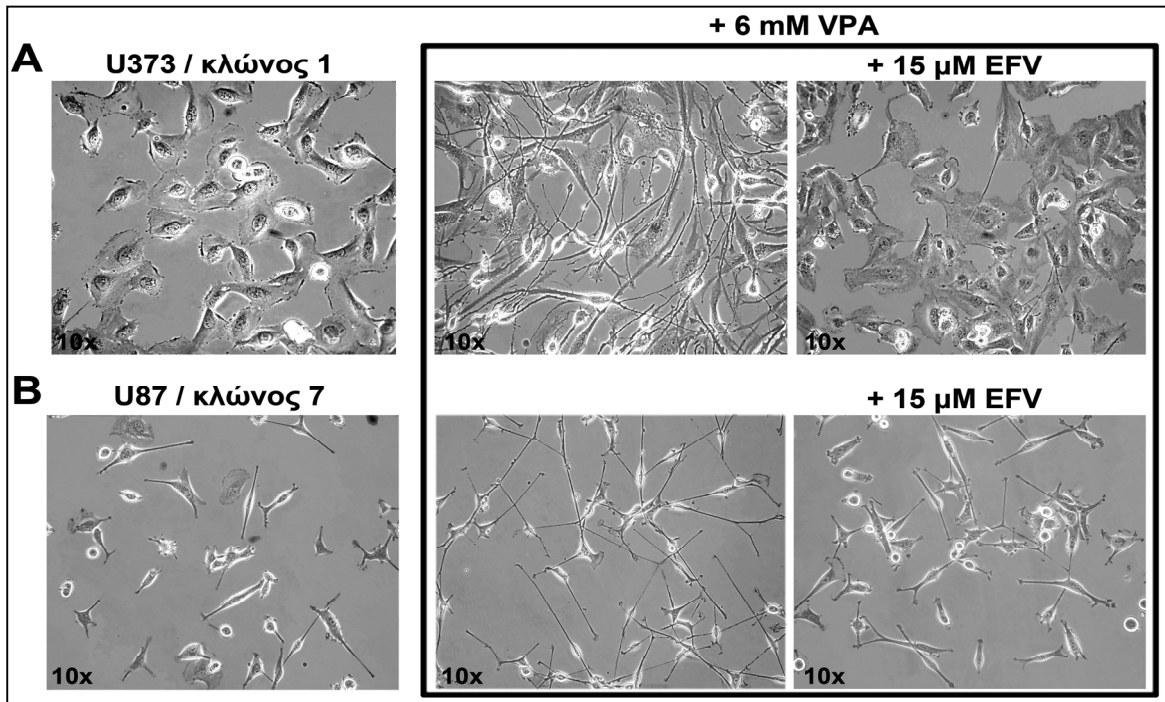


Εικόνα 3.49: Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε γενωμικό επίπεδο μετά από επίδραση με *Efavirenz*. Ανάλυση PCR για το γονίδιο της *EGFP* προς ταυτοποίηση ρετρομεταθετικών ενσωματώσεων σε κύτταρα U373/κλώνου 1 ή U87/κλώνου 7 μεταχειρισμένα με 6 mM VPA ή 6 mM VPA + 15 μM EFV, για 72 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα με το ρετροτρανσποζόνιο κύτταρα U-373 MG ή U-87 MG και ως θετικός μάρτυρας κύτταρα των προαναφερθέντων κλώνων επωασμένων με 6 mM VPA για 72 ώρες.

Όπως διαπιστώνεται στην εικόνα 3.49, η ζώνη των 342bp ανιχνεύεται σε όλα τα δείγματα (πλην των πατρικών-μη διαμολυσμένων με το ρετροτρανσποζόνιο κυττάρων U-373 MG ή U-87 MG) εμφανίζοντας μια σημαντική αύξηση της πυκνότητάς της στα δείγματα του εκάστοτε κλώνου-επωασμένου με 6 mM VPA για 72 ώρες, επιβεβαιώνοντας τον μεγάλο αριθμό ρετροτρανσποζονικών ενθέσεων που συντελέστηκαν σε αυτές τις συνθήκες. Αντίθετα, τα δείγματα που αντιστοιχούν στους κλώνους που επώαστηκαν με EFV, η πυκνότητα της δέσμης μειώνεται σημαντικά προσεγγίζοντας αυτή των αρχικών κλώνων, γεγονός που σηματοδοτεί ότι συντελέστηκε ένας σημαντικά μικρότερος αριθμός ενσωματώσεων εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης του αναστολέα των ενδοκυττάρων αντίστροφων μεταγραφασών.

3.5.9 Η επίδραση της διαμεσολαβούμενης από *Efavirenz* αναστολής της ρετρομετάθεσης στο φαινότυπο κύτταρων U373/HERV-K10 και U87/HERV-K10.

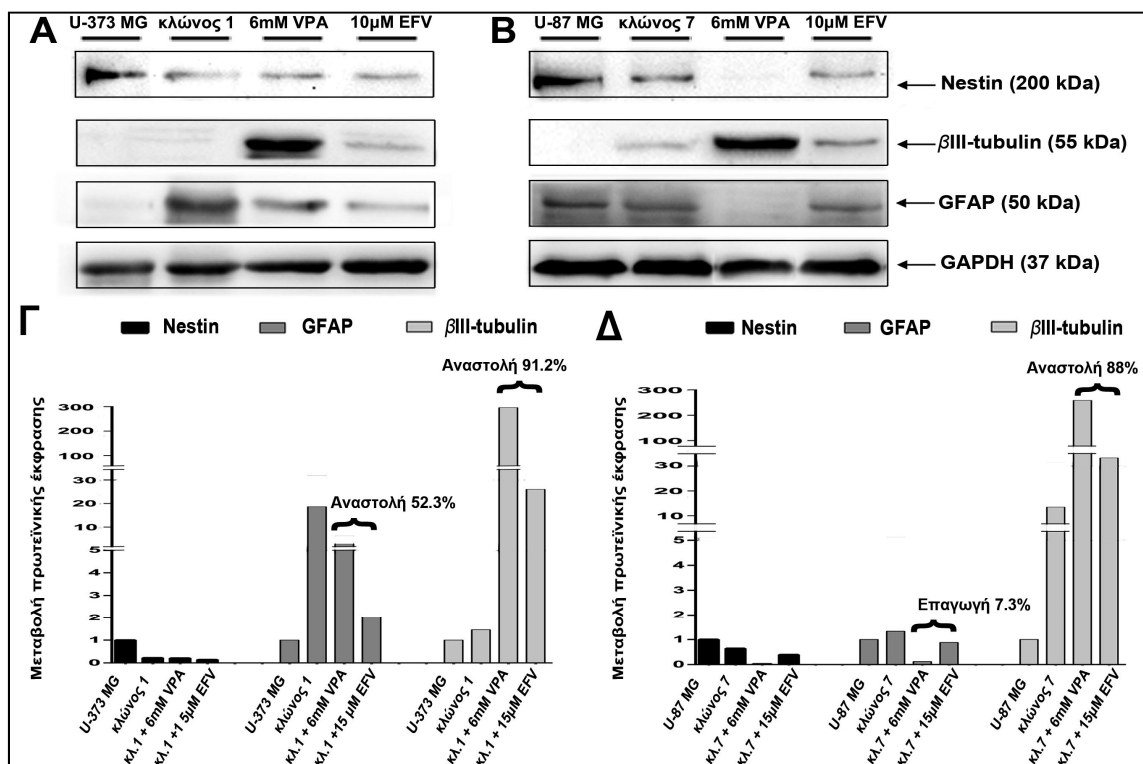
Το επόμενο βήμα της μελέτης μας ήταν η μελέτη πιθανών φαινοτυπικών μεταβολών σε κύτταρα κλώνων U373/HERV-K10 και U87/HERV-K10 με επαγμένη από VPA ρετρομετάθεση ύστερα από επίδραση με EFV.



Εικόνα 3.50: Η αναστολή της ρετρομετάθεσης *HERV-K10* από το *Efavirenz* αποτρέπει την επαγόμενη από το *VPA* διαφοροποίηση κυττάρων κλώνων *U373/HERV-K10* και *U87-HERV-K10*. **A)** Από αριστερά προς τα δεξιά: Μορφολογική εξέταση κυττάρων *U373/κλώνου 1*, *U373/κλώνου 1 + 6 mM VPA* για 72 ώρες επίδρασης και *U373/κλώνου 1 + 15 μM EFV + 6 mM VPA* για 72 ώρες επίδρασης. **B)** Από αριστερά προς τα δεξιά: Μορφολογική εξέταση κυττάρων *U87/κλώνου 7*, *U87/κλώνου 7 + 6 mM VPA* για 72 ώρες επίδρασης και *U87/κλώνου 7 + 15 μM EFV + 6 mM VPA* για 72 ώρες επίδρασης.

Στην εικόνα 3.50 φαίνεται ότι η επίδραση των κλώνων με *VPA* επέφερε μία αξιοσημείωτη μεταβολή του φαινοτύπου προς ένα πιο διαφοροποιημένο στάδιο, γεγονός αναμενόμενο αφού έχουμε ήδη αποδείξει ότι το *VPA* μέσω επαγωγής της ρετρομετάθεσης προκαλεί φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης. Το σημαντικό εύρημα όμως αυτού του πειράματος ήταν ότι η δράση του *EFV* φαίνεται να αναστέλει την επαγόμενη από *VPA* κυτταρική διαφοροποίηση καθώς ο φαινότυπος των κυττάρων, στα οποία έγινε επίδραση με *EFV*, προσεγγίζει περισσότερο εκείνον των αμεταχειριστων αρχικών κλώνων. Τα εν λόγω κύτταρα δεν φέρουν εξίσου μακρές αποφυάδες σε σχέση με τα αντίστοιχα μεταχειρισμένα μόνο με *VPA* κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας.

Η επιβεβαίωση των παρατηρούμενων φαινοτυπικών μεταβολών πραγματοποιήθηκε με την μοριακή ανίχνευση χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών δεικτών διαφοροποίησης μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά *Western*. Όπως και προηγουμένως, κύτταρα του εκάστοτε κλώνου (αρνητικός μάρτυρας) στα οποία έγινε επίδραση είτε μόνο με 6 mM *VPA* (θετικός μάρτυρας), είτε με 15 μM *EFV* (2 ώρες προεπάση πριν την προσθήκη *VPA*) και 6 mM *VPA* για 72 ώρες (κύτταρα ελέγχου), χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά *Western* για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης των νευρογλοιακών δεικτών διαφοροποίησης *Νεστίνη*, *GFAP* και *βIII-τουμπουλίνη*. Τα αποτελέσματα της άνωθεν ανάλυσης δίδονται στην εικόνα 3.51.



Εικόνα 3.51: Η αναστολή της ρετρομετάθεσης των *HERV-K10* από τον αναστολέα των *enRTs*, *Efavirenz*, μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών νεστίνης, *GFAP* και *βIII-τουμπουλίνης*, σε κύτταρα *U-373* και *U-87*. Κύτταρα *U373/κλώνου* (**A**) 1 ή *U87/κλώνου* 7 (**B**) που επωάστηκαν είτε με 6 mM *VPA* για 72 ώρες, είτε με 6 mM *VPA* και 15 μM *EFV* για 72 ώρες (προηγήθηκε προεπάωση με *EFV* για δύο ώρες πριν την προσθήκη *VPA*) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και την πραγματοποίηση ανοσοαποτύπωσης κατά *Western*. Οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες μεταχειρίστηκαν με αντισώματα έναντι των νεστίνης, *GFAP*, *βIII-τουμπουλίνης*, καθώς και *GAPDH* για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. **Γ**, **Δ**: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών σε κύτταρα *U373/κλώνου* 1 ή *U87/κλώνου* 7, τα οποία επωάστηκαν είτε με *VPA*, είτε με *VPA* και *EFV*.

Η ανοσοαποτύπωση κατά *Western* αποκάλυψε μία ριζική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών τόσο μεταξύ των αρχικών αμεταχειριστων (με *VPA* ή *EFV*) κλώνων της εκάστοτε κυτταρικής σειράς και των αντίστοιχων κυττάρων-επωασμένων με *VPA*, όσο και μεταξύ των επιδρούμενων μόνο με *VPA* κυττάρων και των αντίστοιχων που σενεπωάστηκαν με *VPA* και *EFV*. Πιο ειδικά, η επίδραση κυττάρων *U373/κλώνου* 1 ή *U87/κλώνου* 7 μόνο με τον αναστολέα των αποακετυλασών *VPA* επέφερε μία αύξηση των επιπέδων έκφρασης του νευρο-ειδικού δείκτη *βIII-τουμπουλίνης* κατά 296 και 259 φορές αντίστοιχα, σε σχέση με τα αμεταχειρίιστα κύτταρα του κάθε κλώνου, γεγονός αναμενόμενο όπως καταγράφηκε και παραπάνω (αποτελέσματα με βαλπροϊκό οξύ). Ο αναστολέας των *enRTs*, *Efavirenz*, προκάλεσε ακολούθως μία αναστολή στην έκφραση της *βIII-τουμπουλίνης* της τάξης του 91,2% για τα κύτταρα *U373/κλώνου* 1, και 88% για τα κύτταρα *U87/κλώνου* 7 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα του κάθε κλώνου που επωάστηκαν μόνο με *VPA*. Τα επίπεδα έκφρασης του αστρογλοιακού δείκτη *GFAP* στα επιδρούμενα με *EFV* κύτταρα παρουσίασαν μείωση κατά 52,3% στα κύτταρα *U373/κλώνου* 1 και επαγωγή κατά 7,3% στα κύτταρα *U87/κλώνου* 7, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα κάθε κλώνου στα οποία έγινε επίδραση μόνο με *VPA*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Τα ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης

Στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι τα ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα U373 και U87 παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον τέλεσης γεγονότων ρετρομετάθεσης του ενδογενούς ρετροϊκού στοιχείου HERV-K10. Αυτό συνάγεται από το γεγονός ότι ανιχνεύθηκε ένα ποσοστό κυττάρων-θετικών σε ρετρομετάθεση της τάξης του 0.33% για τα U373 (Ενότητα 3, εικόνα 3.2) και 1.82% για τα U87 (Ενότητα 3, εικόνα 3.3) σε μόλις 48 ώρες μετά την διαμόλυνσή τους. Επιπλέον, υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης μετρήθηκαν και σε μαζικούς κλώνους κυττάρων U373 και U87, με τους πρώτους να καταγράφουν το ποσοστό του 0.77% και τους δεύτερους να αγγίζουν το ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό του 25%. Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι λαμβάνοντας υπόψη την φυσική συχνότητα ρετρομετάθεσης που έχει υπολογιστεί ότι είναι 1×10^{-6} γεγονότα ρετρομετάθεσης ανά κύτταρο και ανά κυτταρική γενεά, τα προαναφερθέντα ποσοστά αντιστοιχούν σε 77.000 και 250.000 φορές, υψηλότερη συχνότητα σε σχέση με τη φυσική.

Ακόμη, στους μονήρεις κλώνους κάθε κυτταρικής σειράς μετρήθηκε ένα εύρος συχνοτήτων ρετρομετάθεσης που διακυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0.16-6.99% για τα κύτταρα U373 / pHERV-K10*/EGFP-INT (Ενότητα 3, εικόνα 3.2) και 4.34-25% για τα κύτταρα U87 / pHERV-K10*/EGFP-INT (Ενότητα 3, εικόνα 3.3), αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επιχειρηθεί η ερμηνεία της σημαντικής απόκλισης που παρατηρείται στα καταγραμμένα ποσοστά ρετρομετάθεσης τόσο μεταξύ των διαφόρων κλώνων της ίδιας κυτταρικής σειράς, όσο και μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Όσον αφορά στο πρώτο σκέλος του άνωθεν προβληματισμού, οι διαφοροποιήσεις στις τιμές της συχνότητας ρετρομετάθεσης μεταξύ διαφορετικών κλώνων της ίδιας κυτταρικής σειράς είναι δυνατό να οφείλονται σε παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και ανίχνευση της πρωτεΐνης EGFP. Πιο συγκεκριμένα, μία ερμηνεία αυτού του φαινομένου θα μπορούσε να είναι η πιθανή ενσωμάτωση νέων αντιγράφων HERV σε γενωμικές περιοχές παρακείμενων αρνητικών ρυθμιστικών στοιχείων που καταστέλλουν την έκφραση της EGFP. Επίσης, είναι πιθανό να έλαβαν χώρα φαινόμενα επιγενετικής αποσιώπησης των HERV-K10 μετά από την ένθεσή τους στο γονιδίωμα, ιδιαίτερα δε μετά από παρατεταμένη παραμονή των κυτταρικών κλώνων σε καλλιέργεια που προηγήθηκε της ανάλυσής τους με FACs. Ακόμη, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα να έχουν προκύψει μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του στοιχείου, οι οποίες καθιστούν την λειτουργική EGFP ανενεργή. Ο αριθμός των νέων αντιγράφων HERV-K10 μπορεί να συνέβαλε σε κυτταροτοξικά/αποπτωτικά φαινόμενα επιτρέποντας την επιβίωση κυττάρων μόνο με χαμηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης. Έτσι λοιπόν, είναι πολύ πιθανό να μην έχουν καταμετρηθεί κύτταρα θετικά σε ρετρομετάθεση τα οποία έχουν οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο, καθώς η μέτρηση της ρετρομετάθεσης γίνεται βάσει των επιπέδων φθορισμού των ζωντανών κυττάρων. Οι παραπάνω λόγοι ίσως συνεισφέρουν ότι η πραγματική συχνότητα ρετρομετάθεσης μπορεί να είναι αρκετά υψηλότερη από αυτή που έχει καταγραφεί πειραματικά.

Σημαντικές είναι όμως και οι διαφοροποιήσεις στις καταγεγραμμένες συχνότητες ρετρομετάθεσης μεταξύ των κυττάρων U373 και U87 καθώς τα δεύτερα εμφανίζουν σταθερά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τα πρώτα. Πρόσφατα έχει προταθεί ότι η ρετρομετάθεση των L1 στοιχείων πραγματοποιείται σε κύτταρα τα οποία είναι πολλαπλασιαστικά ενεργά, γεγονός που ερμηνεύει το ότι η ρετρομετάθεση ως φαινόμενο απαντάται κυρίως σε κύτταρα της γαμετικής σειράς, κατά την εμβρυογένεση και σε καρκινικά κύτταρα και σπανίως εμφανίζεται σε φυσιολογικά σωματικά κύτταρα. Ο μειωμένος ρυθμός κυτταρικών διαιρέσεων αποτελεί παράγοντα

ανασταλτικό ως προς την τέλεση γεγονότων ρετρομετάθεσης (357). Έχοντας αυτό ως δεδομένο, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι σταθερά υψηλότεροι ρυθμοί πολλαπλασιασμού που εμφανίζουν οι κλώνοι U87-HERV-K10 επιτρέπουν την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης με μεγαλύτερη συχνότητα, συγκριτικά με τους κλώνους U373-HERV-K10, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από έντονη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και μεγάλο χρόνο διπλασιασμού. Επιπλέον, ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας διαμόλυνσης των δύο κυτταρικών σειρών (μέσω διαμόλυνσής με το πλασμίδιο EGFP-N1, και μέτρησης του ποσοστού των EGFP-θετικών κυττάρων με FACS ύστερα από 48 ώρες), απέδειξε ότι τα κύτταρα U87 ενσωματώνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό την πλασμιδιακή κατασκευή, συγκριτικά με τα U373, γεγονός που επίσης μπορεί να συνέβαλε στην λήψη μεγαλύτερων συχνοτήτων ρετρομετάθεσης από τα πρώτα. Παρότι οι δύο αυτές κυτταρικές σειρές έχουν κοινή ιστολογική προέλευση (ανθρώπινοι γλοιοωματικοί όγκοι), εμφανίζουν ένα αρκετά διαφοροποιημένο γενετικό προφίλ καθώς χαρακτηρίζονται από διαφορετικές μεταλλάξεις. Επιπλέον, η μεταγραφική ενεργότητα των ενδογενών ρετροϊών εξαρτάται από το επιγενετικό πρόγραμμα του εκάστοτε κυτταρικού τύπου, καθώς και από την έκφραση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, που προσδένονται στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του προϊκτού 5'-LTR-αντιγράφου, επάγοντας την έκφρασή του. Μια τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας c-myc. Πιο ειδικά, τα κύτταρα U87 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του c-myc συγκριτικά με τα U373 (358). Το ογκογονίδιο αυτό έχει αποδειχθεί από προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου μας ότι επάγει τόσο την μεταγραφική ενεργοποίηση, όσο και την ρετρομετάθεση των στοιχείων VL30 που αποτελούν τα ανάλογα των HERV-K10 ενδογενών ρετροϊών στον ποντικό και πιθανώς να εμφανίζουν κάποιους κοινούς μηχανισμούς ρύθμισής των. Αυτό σημαίνει ότι το c-myc, όπως στα κύτταρα μυός πλειορυθμίζει την έκφραση των VL30, ενδεχομένως να επάγει την έκφραση των HERV-K10 και σε ανθρώπινα κύτταρα. Με ανάλογο τρόπο, ενδεχομένως και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που εμφανίζουν ένα αρκετά διαφοροποιημένο προφίλ έκφρασης στις δύο γλοιοωματικές κυτταρικές σειρές, να εμπλέκονται στην ρύθμιση των HERV-K10.

4.2 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 επάγει κυτταρική διαφοροποίηση σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος

Μελετώντας τις πιθανές επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης των HERV-K10 κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια μονήρων κλώνων, παρατηρήσαμε μία έντονη μεταβολή του φαινοτύπου τους σε σχέση με τα αρχικά, αμεταχείριστα κύτταρα. Η μεταβολή αυτή συνίσταται σε κύτταρα που φέρουν μακρές και λεπτές κυτταρικές αποφυάδες οι οποίες εκτείνονται από ένα μικρότερο, ωοειδές κυτταρικό σώμα (Ενότητα 3, εικόνα 3.6). Η μορφομετρική ανάλυση των θετικών σε ρετρομετάθεση κλώνων και των δύο κυτταρικών σειρών, αποκάλυψε μία σημαντική αύξηση του μήκους των κυτταρικών απολήξεων (Ενότητα 3, εικόνα 3.7), παρέχοντας μία πρώτη ένδειξη της κυτταρικής διαφοροποίησης που συντελέστηκε. Οι τεχνικές του έμμεσου ανοσοφθορισμού και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western επιβεβαίωσαν την κυτταρική διαφοροποίηση των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων U373 από έναν προγονικό φαινότυπο προς ώριμα αστροκύτταρα (Ενότητα 3, εικόνες 3.8, 3.9). Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε γλοιοωματικά κύτταρα U87 συσχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης (trans-differentiation) ή κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (cell reprogramming) μέσω του οποίου προγονικά αστρογλοιακά μετατράπηκαν σε νευρωνικά κύτταρα (Ενότητα 3, εικόνες 3.6, 3.10, 3.11).

Ένα επίσης ενδιαφέρον συμπέρασμα που εξάγεται αναλύοντας τα πειραματικά μας δεδομένα, είναι η συσχέτιση μεταξύ των υψηλών συχνοτήτων ρετρομετάθεσης που

καταγράφονται σε επιλεχθέντες μονήρεις κλώνους της εκάστοτε κυτταρικής σειράς και της επαγωγής υψηλών επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνικών δεικτών διαφοροποίησης. Παρατηρήσαμε ότι οι κλώνοι 14 και 17 των κυττάρων U373-HERV-K10 με τις υψηλότερες συχνότητες ρετρομετάθεσης της τάξης του ~3 και 7.3% (Ενότητα 3, εικόνα 3.2), καταγράφουν κατ' αντιστοιχία και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του δείκτη αστροκυτταρικής διαφοροποίησης GFAP (Ενότητα 3, εικόνα 3.9). Παρομοίως, οι κλώνοι 2 και 8 των κυττάρων U87-HERV-K10 με καταγεγραμμένες συχνότητες ρετρομετάθεσης ~10 και 17% (Ενότητα 3, εικόνα 3.3), αντίστοιχα, εμφανίζουν αναλογικά και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της νευρο-ειδικής πρωτεΐνης βIII-τουμπουλίνης (Ενότητα 3, εικόνα 3.11). Στον πίνακα 4.1 καταγράφονται αναλυτικά τα ποσοστά ρετρομετάθεσης και τα επαγόμενα επίπεδα έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών σε χαρακτηριστικούς μονήρεις κλώνους και των δύο διαμολυσμένων γλοιοματικών κυτταρικών σειρών.

U373-HERV-K10	%ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	ΕΠΑΓΩΓΗ GFAP
<i>ΚΛΩΝΟΙ</i>		
Μαζικοί	0.71	X4.3
18	0.19	X8.7
21	2.84	X11.6
14	3.04	X15
17	6.99	X16
U87-HERV-K10	%ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	ΕΠΑΓΩΓΗ βIII-τουμπουλίνης
<i>ΚΛΩΝΟΙ</i>		
1	2.66	X9.12
10	4.68	X11.13
2	9.96	X11.9
8	16.85	X17.5
Μαζικοί	25.52	X18.3

Πίνακας 4.1: Συσχέτιση ρετρομετάθεσης και επαγόμενης έκφρασης νευρογλοιακών δεικτών διαφοροποίησης

Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την συσχέτιση μεταξύ των υψηλών συχνοτήτων ρετρομετάθεσης και των υψηλών επιπέδων έκφρασης των ειδικών δεικτών διαφοροποίησης των νευρογλοιακών κυττάρων.

Στην βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά η *in vitro* πρόκληση κυτταρικής διαφοροποίησης σε γλοιοματικά κύτταρα από την βιταμίνη Α καθώς και από φυσικά και συνθετικά παράγωγά της, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης της (359), (360), (361), (362), (363). Στην παρούσα μελέτη, αποδείξαμε ότι το ρετινοϊκό οξύ επάγει την συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 σε γλοιοματικά κύτταρα κατά δοσο και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Η επαγωγή της ρετρομετάθεσης άγγιξε το ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό του 57.6 % (Ενότητα 3, εικόνα 3.13) για τα κύτταρα U87 που αντιστοιχεί σε 576.000-φορές υψηλότερη της φυσικής συχνότητας. Είναι γνωστό ότι οι μακρές τερματικές αλληλουχίες (LTRs) των VL30 (που αποτελούν τα αντίστοιχα με τα HERVs ενδογενή ρετροϊκά στοιχεία στον ποντικό) φέρουν στοιχεία απόκρισης X των ρετινοειδών (RXRE), στα οποία προσδένονται οι διμερισμένοι υποδοχείς ρετινοειδών X (RXR) και εν συνεχεία επάγουν την μεταγραφική ενεργοποίηση των VL30 (364). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη αποδείχθηκε ότι η επίδραση του ρετινοϊκού οξέος σε ανθρώπινα καρκινικά εμβρυονικά κύτταρα (NT2D1) προκάλεσε μία παροδική υπερενεργοποίηση των μεταγραφικών επιπέδων των στοιχείων HERV-K10, η οποία θεωρήθηκε από τους

συγγραφείς ως ένα πρώιμο στάδιο απόκρισης στην επαγόμενη από ρετινοϊκό οξύ κυτταρική διαφοροποίηση (365). Οι βιβλιογραφικές αυτές αναφορές σε συνδιασμό με τα δικά μας προαναφερθέντα αποτελέσματα καθιστούν την ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 ως πιθανό στόχο του μηχανισμού δράσης του ρετινοϊκού οξέος.

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας αποδεικνύουν ότι η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης σε γλοιωματικά κύτταρα. Επιπλέον, το ρετινοϊκό οξύ επάγει κατά ειδικό τρόπο τη ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10, συσχετίζοντας την επαγόμενη από ρετινοϊκό οξύ κυτταρική διαφοροποίηση με τη ρετρομετάθεση.

4.3 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 μεταβάλλει το αναπτυξιακό προφίλ των γλοιωματικών κυττάρων U-373- και U-87 MG

Οι διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης επιδεικνύουν μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ τους, ενώ ο αυστηρός κυτταρικός έλεγχος στον οποίο υπόκεινται είναι καθοριστικής σημασίας για την διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Τα προγονικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ένα ενισχυμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού το οποίο και διατηρούν μέχρις ότου εισέλθουν σε διαδικασία διαφοροποίησης, ενώ το τελικό μετα-μιτωτικό στάδιο της διαφοροποίησής τους συνοδεύεται από αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μόνιμη έξοδο από τον κύκλο κυτταρικής διαίρεσης. Ο ακριβής συγχρονισμός μεταξύ άρσης του κυτταρικού κύκλου και έναρξης της κυτταρικής διαφοροποίησης είναι καθοριστικός για την φυσιολογική ανάπτυξη, την ομοιόσταση των ιστών και την κυτταρική αποκατάσταση κατά την διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Στον αντίποδα, η αποτυχία αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή κυτταρικής διαφοροποίησης, δύναται να οδηγήσει σε ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων με πιο χαρακτηριστική από αυτές τον καρκίνο. Η αδυναμία ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι ευρέως αποδεκτή ως μία από τις κυριότερες αιτίες καρκινογένεσης. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική διαφοροποίηση ελέγχονται στη φάση G1 και κατά την μετάβαση από την G1 στην S (G1/S) (366).

Στην παρούσα εργασία αποδείξαμε ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 που πραγματοποιείται με υψηλή συχνότητα σε δύο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές γλοιώματος, συνδέεται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης συνεπικουρούμενης από μία σημαντική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Εν προκειμένω, τόσο οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι U373-HERV-K10, όσο και οι U87-HERV-K10, επέδειξαν ένα εξαιρετικά χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς (Ενότητα 3, εικόνες 3.14, 3.15). Αυτός ο χαμηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού αποδείχθηκε αρχικά με την χρήση της τεχνολογίας RTCA DP, η οποία κατέδειξε ότι κατά τις αρχικές ώρες ανάπτυξης των κυττάρων σε ειδικά σχεδιασμένα πολυτριβλία, το CI των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U373/HERV-K10 ή U87/HERV-K10 είναι σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο των κυττάρων-μαρτύρων για κάθε κυτταρική σειρά (Ενότητα 3, Εικόνα 3.14). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα κύτταρα τόσο των κλώνων U373-HERV-K10 όσο και των U87-HERV-K10 έχουν διαφοροποιηθεί και συνεπώς έχουν αλλάξει μορφολογία σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Πιο ειδικά, το μέγεθος των εν λόγω κυττάρων έχει αυξηθεί καθώς έχουν σχηματιστεί μακρές κυτταρικές απολήξεις οι οποίες μοιραία, αυξάνουν το CI στις καμπύλες ανάπτυξης. Σε αυτή την κατεύθυνση ενδεχομένως συνεισφέρει και το γεγονός ότι τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα προσκολλώνται πιο γρήγορα στην καλλιεργητική επιφάνεια του τρυβλίου σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες αυξάνοντας περαιτέρω το CI. Ωστόσο, μετά το πέρας των προαναφερθέντων χρονικών διαστημάτων, το CI των θετικών

ρετρομετάθεσης κλώνων κάθε περίπτωσης κυττάρων μειώνεται σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα, γεγονός που ερμηνεύεται από την μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Το συμπέρασμα συνεπώς που εξάγεται από την μελέτη του αναπτυξιακού προφίλ με την χρήση του αναλυτή RTCA DP είναι ότι τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα αλλάζουν μορφολογία και προσκολλώνται πιο γρήγορα στο ταπήτιο του τρυβλίου και συγχρόνως πολλαπλασιάζονται πιο αργά σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.

Περεταίρω στοιχειοθέτηση του χαμηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού έγινε με υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων συγκριτικά με τα αντίστοιχα για κάθε περίπτωση κύτταρα-μάρτυρες, μέσω καταμέτρησης του αριθμού κυττάρων ανά 24 ώρες καλλιέργειάς τους (Ενότητα 3, Εικόνα 3.15). Ο χρόνος διπλασιασμού για τους κλώνους U373-HERV-K10 υπολογίστηκε κατά μέσο όρο στις 65,1 ώρες έναντι των 44 ωρών που υπολογίστηκαν για τα κύτταρα-μάρτυρες (Ενότητα 3, Πίνακας 3.1). Ομοίως, ο χρόνος διπλασιασμού των θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U87-HERV-K10 βρέθηκε πως ήταν κατά μέσο όρο οι 50,4 ώρες, την στιγμή που ο ίδιος χρόνος για τα κύτταρα-μάρτυρες κυμαίνονταν στις 35 ώρες (Ενότητα 1, πίνακας 3.1). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία και στην ουσία έρχονται να επιβεβαιώσουν την κυτταρική διαφοροποίηση που συντελέστηκε σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα ύστερα από την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης.

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβες DNA ρυθμίζεται από κάποια χαρακτηριστικά σημεία ελέγχου. Στην G1 γίνεται έλεγχος του DNA πριν την αντιγραφή του, ενώ στην G2 πραγματοποιείται ένας δεύτερος έλεγχος πριν το κύτταρο εισέλθει στην μίτωση. Το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης αποτελεί έναν βασικό παράγοντα πρόκλησης γενεοτοξικών φαινομένων καθώς συσχετίζεται με μη φυσιολογικές χρωμοσωμικές δομές και συνακόλουθη γενωμική αστάθεια. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε συγκεκριμένα σημεία ελέγχου του ή και η πρόκληση κυτταρικού θανάτου αποτελούν συχνά φαινόμενα κυτταρικής απόκρισης σε επαγόμενες από ρετρομετάθεση βλάβες του DNA. Στην παρούσα εργασία η μελέτη της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U373- και U87-HERV-K10, αποκάλυψε εκτεταμένες διαταραχές. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα U87-HERV-K10 παρουσίασαν μία πληθυσμιακή συσσώρευση τους στις φάσεις G1 και S (Ενότητα 3, εικόνα 3.17). Αξιοσημείωτη είναι μάλιστα η παρατήρησή μας ότι αυξανόμενης της συχνότητας ρετρομετάθεσης στους εξετασθέντες κλώνους, αυξάνεται και ο αριθμός των κυττάρων που συσσωρεύεται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Συγχρόνως, τα εν λόγω κύτταρα εμφάνισαν και μία μικρή αλλά σημαντική αύξηση του πληθυσμού που εντοπίζεται στην φάση sub-G1, η οποία υποδηλώνει τον κυτταρικό θάνατο που συντελέστηκε. Ενώ λοιπόν τα αμεταχείρηστα κύτταρα-μάρτυρες εμφανίζουν σχεδόν μηδαμινό ποσοστό κυττάρων στην εν λόγω φάση (0.03%), οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι παρουσιάζουν σχετικά αυξημένο ποσοστό κυττάρων που εντοπίζονται στην sub-G1 (0.74-, 1.61- και 1.89%). Η πρόκληση κυτταρικού θανάτου ως συνέπεια ρετρομετάθετικών γεγονότων δεν αποτελεί νέο εύρημα, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί νωρίτερα, στο εργαστήριό μας έχει αποδειχθεί ότι η ρετρομετάθεση των VL30 στοιχείων μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο-εξαρτώμενο από την p53 (367). Έχοντας κατά νου ότι τα κύτταρα U-87 MG φέρουν το άγριου τύπου γονίδιο της p53 (368) και με δεδομένο ότι η εν λόγω πρωτεΐνη αποτελεί κύριο ρυθμιστή τόσο της G1 φάσης όσο και του κυτταρικού θανάτου, ερμηνεύονται σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματά μας που δείχνουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις συγκεκριμένες φάσεις. Τέλος, ένα επιπλέον σημαντικό εύρημα των πειραμάτων αυτών αποτέλεσε και η διαπίστωση ανευπλοειδίας στον θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10, και συγκεκριμένα υπερδιπλοειδίας (Ενότητα

3, εικόνα 3.18). Ενδεχομένως η προκληθείσα από ρετρομετάθεση χρωμοσωμική αστάθεια να προκάλεσε μία εξαρτώμενη από την p53 συσσώρευση των τετραπλοειδικών (κατά κύριο λόγο) κυττάρων στο σημείο ελέγχου G1/S καθώς και στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου.

Αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση S παρατηρήθηκε και σε θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 (Ενότητα 3, εικόνα 3.16). Και σε αυτή την περίπτωση διαπιστώθηκε ότι αυξανόμενη της συχνότητας ρετρομετάθεσης, αυξανόταν κατ' αντιστοιχία και το ποσοστό των κυττάρων που εντοπίζονταν στην φάση S. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του κλώνου 17, με την υψηλότερη συχνότητα ρετρομετάθεσης, ο οποίος εμφάνισε επιπροσθέτως της αναστολής στην S φάση, και μία δραματική αύξηση του αριθμού των κυττάρων που συσσωρεύονται στην φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου (43.01%). Η διαφορά λοιπόν των U373 θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων συγκριτικά με τα αντίστοιχα U87 είναι ότι τα πρώτα εμφανίζουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις S και G2/M, ενώ τα δεύτερα στις φάσεις sub-G1, G0/G1 και S. Αυτή η διαφορά δεν προκαλεί εντύπωση καθώς τα U373 γλοιωματικά κύτταρα φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο της p53 (368), γεγονός που συνεπάγεται την παράκαμψη του σημείου ελέγχου G1 (λόγω ανεπάρκειας της p53, που αποτελεί βασικό ρυθμιστή του σημείου ελέγχου G1) και την ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου G2, το οποίο διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο πριν τα κύτταρα εισέλθουν στην φάση της μίτωσης. Ενδεχομένως, εξαιτίας της μεταλλαγμένης p53, και με βάση όσα αναφέρθηκαν και πιο πάνω, δεν παρατηρούνται φαινόμενα κυτταρικού θανάτου, όπως καταμαρτυρείται από τα ποσοστά των κυττάρων στην φάση sub-G1 τα οποία δεν εμφανίζουν σημαντικές αποκλίσεις συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό των πατρικών κυττάρων.

4.4 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συσχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού μέσω επαγωγής καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος

Στην παρούσα εργασία, η διαμόλυνση δύο ανθρώπινων κυτταρικών σειρών γλοιώματος με το μη αυτόνομο ανασυνδιασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10 παράγαγε γεγονότα ρετρομετάθεσης σε υψηλή συχνότητα, τα οποία συσχετίστηκαν με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης. Εν προκειμένω, στην μία εκ των δύο κυτταρικών σειρών, την U-87 MG, διαπιστώθηκε ότι η ρετρομετάθεση των HERV-K10 οδήγησε σε *trans*-διαφοροποίηση από έναν αστρογλοιακό προς έναν νευρο-ειδικό φαινότυπο. Η παρατήρηση αυτή μας ώθησε στο επόμενο βήμα της μελέτης μας που ήταν η εξέταση πιθανούς συσχέτισης αυτής της *trans*-διαφοροποίησης με την ενεργοποίηση/παραγωγή καρκινικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων.

Όσον αφορά την σύνδεση μεταξύ *trans*-διαφοροποίησης και καρκινικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων έχουμε στοιχειοθετήσει ότι τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα U87-HERV-K10 τα οποία δια-διαφοροποιήθηκαν προς νευρωνικά (Ενότητα 3, εικόνα 3.11): **(α)** ήταν ικανά να παράγουν νευρόσφαιρες υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης (Ενότητα 3, εικόνα 3.20) οι οποίες εμφάνισαν εξαιρετικά υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης (Ενότητα 3, εικόνα 3.21). **(β)** Οι θετικές ρετρομεταθεσης νευρόσφαιρες U87-HERV-K10 είχαν την ικανότητα να αυτό-ανανεώνονται (Ενότητα 3, εικόνα 3.22) και να εκφράζουν τόσο σε επίπεδο mRNA (Ενότητα 3, εικόνα 3.23), όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών (Ενότητα 3, εικόνα 3.24) τους παράγοντες βλαστικότητας Nestin, Sox2 και Oct-4. **(γ)** Οι νευρόσφαιρες των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U87-HERV-K10 είχαν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς αστρογλοιακά και νευρωνικά κύτταρα όταν καλλιεργούνταν υπό συνθήκες φυσιολογικής προσκόλλησης (Ενότητα 3, εικόνα 3.25). Κατά την διαφοροποίησή τους οι

συχνότητες ρετρομετάθεσης κατέγραψαν μία δραματική πτώση (συγκριτικά με εκείνες που είχαν μετρηθεί στις αντίστοιχες νευρόσφαιρες), προσεγγίζοντας εκείνες τις τιμές που είχαν εμφανίσει αρχικά οι μονήρεις κλώνοι από τους οποίους παρήχθησαν. **(δ)** Επιπλέον, οι νευρόσφαιρες U87-HERV-K10 εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του δείκτη καρκινικών βλαστικών κυττάρων CD133. Συγχρόνως, εμφάνισαν χαμηλότερη έκφραση του CD44 που χαρακτηρίζει τα προγονικά αστροκύτταρα, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες U-87 MG (Ενότητα 3, εικόνα 3.26).

Από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν κάποιοι πολύ ενδιαφέροντες συσχετισμοί και να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την συμβολή της ρετρομετάθεσης στην επαγωγή γλοιοματικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων και την επακόλουθη *trans*-διαφοροποίησή τους προς νευρωνικά σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος U-87 MG. Καταρχάς, η δυνατότητα σχηματισμού νευροσφαιρών σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό διαπιστώθηκε από το σύνολο σχεδόν των μονήρων κλώνων U87-HERV-K10. Ωστόσο, τα πειράματα ελέγχου της βλαστικότητας πραγματοποιήθηκαν σε τρεις αντιπροσωπευτικούς κλώνους. Η επιλογή των κλώνων 1, 2 και 8 έγινε με βάση τα αυξανόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης που μετρήθηκαν σε αυτούς ύστερα από την διαμόλυνσή τους με το μη αυτόνομο ρετροϊικό στοιχείο HERV-K10 τα οποία βρέθηκε ότι ήταν ~ 2.6, 4.7 και 16.9%, αντίστοιχα (Ενότητα 3, εικόνα 3.3). Επιπλέον, η επιλογή τους έγινε και με βάση την αυξανόμενη επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης του νεύρο-ειδικού δείκτη βIII-τουμπουλίνη στους κλώνους 1, 2 και 8 η οποία αυξήθηκε κατά ~ 9, 12 και 17 φορές, αντίστοιχα συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (Ενότητα 3, εικόνα 3.11), παρέχοντας μία πρώτη ένδειξη ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης στα γλοιοματικά κύτταρα U-87 MG σχετίζεται με μία εντονότερη *trans*-διαφοροποίηση τους προς έναν νεύρο-ειδικό φαινότυπο. Όταν οι προαναφερθέντες κλώνοι καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης παρήγαγαν ισχυρά θετικές σε ρετρομετάθεση, αυτό-ανανεούμενες νευρόσφαιρες οι οποίες εξέφραζαν τις πρωτεΐνες βλαστικότητας Nestin, Sox2, και Oct-4. Μάλιστα, όσον αφορά τους παράγοντες Nestin, Sox2 και CD133, διαπιστώθηκε ότι κατ' αντιστοιχία με τα αυξανόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης που μετρήθηκαν στις νευρόσφαιρες των κλώνων 1, 2 και 8, καταγράφηκε αντίστοιχα και αυξανόμενη έκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών σε αυτές. Επιπλέον, όταν οι άνωθεν νευρόσφαιρες υπέστησαν διαφοροποίηση (προς γλοιοκύτταρα και νευρικά κύτταρα), οι συχνότητες ρετρομετάθεσης μειώθηκαν σημαντικά προσεγγίζοντας σε επίπεδο τόσο ποσοστών όσο και αύξουσας τάσης αυτών, εκείνες που είχαν μετρηθεί αρχικά στους μονήρεις κλώνους 1, 2 και 8 (Ενότητα 3, εικόνα 3.24). Συγχρόνως όμως με τα αυξανόμενα ποσοστά ρετρομετάθεσης, τα διαφοροποιημένα κύτταρα νευροσφαιρών κλώνων 1, 2 και 8 εμφάνισαν κατ' αναλογία με τους αρχικούς κλώνους και αυξανόμενη επαγωγή του νεύρο-ειδικού δείκτη της βIII-τουμπουλίνης. Στους πίνακες 4.2 και 4.3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα άνωθεν δεδομένα.

Νευρόσφαιρες U87-HERV-K10	%Ποσοστά ρετρομετάθεσης	Επαγωγή πρωτεϊνών βλαστικότητας			
		Nestin	Sox2	Oct-4	CD133
1	22.24	3X	11.4X	4.3X	1.38X
2	64.64	3.2X	34.3X	9.7X	1.68X
8	81.81	5.2X	68.8X	7.5X	2.2X

Πίνακας 4.2: Συσχέτιση ρετρομετάθεσης με την επαγωγή γλοιοματικών βλαστικών κυττάρων

Διαφοροποίηση Νευροσφαιρών U87-HERV-K10	%Συχνότητα ρετρομετάθεσης	Επαγωγή βIII-τουμπουλίνης	Αναστολή GFAP
1	1.89	21.1X	0X
2	8.26	51X	1.2X
8	15.29	62.4X	2X

Πίνακας 4.3: Συσχέτιση ρετρομετάθεσης με την επαγωγή νευρο-ειδικής διαφοροποίησης νευροσφαιρών κλώνων (1, 2 και 8) U87-HERV-K10

Το γενικό συμπέρασμα που εξάγεται βάση όλων αυτών των παρατηρήσεων είναι ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης σε γλοιωματικά κύτταρα U87 σχετίζεται με ισχυρότερη επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων η οποία συνεπάγεται και ισχυρότερη *trans*-διαφοροποίηση προς έναν νευρο-ειδικό φαινότυπο. Τα πολύ υψηλά ποσοστά ρετρομετάθεσης που μετρήθηκαν στις νευροσφαίρες των κλώνων 1, 2 και 8 (22-, 65- και 82%, αντίστοιχα.), και η δραματική μείωση αυτών κατά την διαφοροποίησή τους (1.9-, 8,3- και 15.3%, αντίστοιχα) βρίσκονται σε συμφωνία με τη θεώρηση η ρετρομετάθεση συμβαίνει πολύ συχνότερα σε αδιαφοροποίητα και μετασχηματισμένα κύτταρα, αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα ή και καθόλου σε κύτταρα που βρίσκονται στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης (369). Προς αυτή την κατεύθυνση, σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η παροδική μεταγραφική υπερ-ενεργοποίηση των στοιχείων HERV-H είναι απαραίτητη για τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων προς ένα πολυδύναμο βλαστικό στάδιο, και την εγκαθίδρυση του δυναμικού διαφοροποίησής του (252).

Στην διεθνή βιβλιογραφία έχει επιτευχθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες ο κυτταρικός επανα-προγραμματισμός αστρογλοιακών κυττάρων μύος σε λειτουργικούς νευρώνες, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα. Η βασική μεθοδολογία επίτευξής του περιλαμβάνει την κατευθυνόμενη έκφραση (*forced expression*) συγκεκριμένων νευρογενετικών μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι οι *Pax6*, *Neurog2*, *Ascl1*, και *Sox11* σε αστρογλοιακά κύτταρα ή προγονικά ολιγοδενδροκύτταρα απομονωθέντα από τον εγκεφαλικό φλοιό ποντικών, οι οποίοι επιφέρουν την μετατροπή τους σε νευρώνες (370), (371), (372), (373). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι *in vivo* ο κυτταρικός επανα-προγραμματισμός αστροκυττάρων σε νευροβλάστες μπορεί να λάβει χώρα στον ενήλικα εγκέφαλο ποντικού μέσω κατευθυνόμενης υπερέκφρασης ενός μόνο μεταγραφικού παράγοντα, του Sox2 (374).

Έχει προταθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 διαδραματίζει έναν καθοριστικό ρόλο στην νευρογένεση αλλά και στην διατήρηση νευρικών βλαστικών κυττάρων και νευρώνων (375). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη έχει αποδειχθεί ότι τόσο ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2, όσο και ο Oct-4 μπορούσαν ξεχωριστά να μετατρέψουν ώριμα ανθρώπινα αστροκύτταρα σε αυτό-ανανεούμενα πολυδύναμα νευρικά βλαστικά κύτταρα με δυνατότητα διαφοροποίησης προς όλους τους κυτταρικούς τύπους του Κ.Ν.Σ (376). Στην παρούσα εργασία αποδείξαμε ότι η ρετρομετάθεση των HERV-K10 στοιχείων σχετίζεται με τον κυτταρικό επανα-προγραμματισμό των γλοιωματικών κυττάρων U-87 MG προς νευρωνικά μέσω επαγωγής ενός ενδιάμεσου βλαστικού-προγονικού σταδίου στο οποίο υπερεκφράζονται (τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεΐνης) οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox2 και Oct-4. Μάλιστα όσον αφορά τον παράγοντα Oct-4 αποδείξαμε ότι, σε επίπεδο mRNA πλειορρυθμίζεται σε όλους τους κλώνους και των δύο κυτταρικών

σειρών. Ωστόσο, η απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών Sox2 και Oct-4 στους κλώνους U373-HERV-K10 πιθανότατα εξαιτίας μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων, ενδεχομένως να δικαιολογεί το γεγονός ότι οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι αυτής της κυτταρικής σειράς δεν δια-διαφοροποιούνται προς νευρωνικά κύτταρα παρά μόνο προς ώριμα αστροκύτταρα.

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατα δεδομένα βιοπληροφορικής ανάλυσης που αποκάλυψαν ότι οι θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των LTRs της οικογένειας των HERV-K ενδογενών ρετροϊών, σε ποσοστό άνω του 80% (377). Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της έκφρασης του γονιδίου της GFAP (378). Συνεπώς ένας πιθανός μηχανισμός δράσης της ρετρομετάθεσης στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό των αστρογλοιακών κυττάρων U-87 MG, θα μπορούσε να περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) ενσωμάτωση ενός HERV-K10 αντίγραφου σε κάποια θέση πλησίον και ανοδικά του γονιδίου της GFAP, (β) πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 στην ειδική θέση (ή θέσεις) εντός ρυθμιστικών αλληλουχιών του υποκινητή του HERV-K10-LTR αντιγράφου, (γ) μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου αστροκυτταρικής διαφοροποίησης GFAP μέσω αρνητικής ρύθμισής του από τον παράγοντα Sox2. Η μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου της GFAP θα μπορούσε να προκαλέσει την από-διαφοροποίηση των αστρογλοιακών κυττάρων προς κάποιο πρώιμο προγονικό/βλαστικό στάδιο, το οποίο εν συνεχεία δια-διαφοροποιείται προς έναν νευρο-ειδικό κυτταρικό τύπο.

Όσον αφορά τους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 οι οποίοι ύστερα από την διαμόλυνση με το ρετροτρανσποζόνιο HERV-K10 διαφοροποιήθηκαν προς έναν πιο ώριμο αστροκυτταρικό φαινότυπο (Ενότητα 3, εικόνα 3.9) διαπιστώθηκε ότι: **(α)** υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης, αναπτύσσονται κανονικά σχηματίζοντας μονοστοιβάδα (Ενότητα 3, εικόνα 3.19) και διατηρώντας τον αστροκυτταρικό τους φαινότυπο χωρίς να είναι σε θέση να παράξουν νευρόσφαιρες. **(β)** Ενώ σε επίπεδο mRNA εκφράζουν τους παράγοντες βλαστικότητας Sox2 και Oct-4 (Ενότητα 3, εικόνα 3.22), με τον δεύτερο μάλιστα να επάγεται σημαντικά στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους, σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης δεν διαπιστώνεται ανάλογη έκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια (Ενότητα 3, εικόνα 3.23). Μία πιθανή ερμηνεία αυτού του φαινομένου μπορεί να αποτελεί η πραγματοποίηση μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στα μόρια mRNA των Sox2 και Oct-4, οι οποίες αποτρέπουν ή ελαττώνουν σημαντικά την παραγωγή των προαναφερθέντων πρωτεϊνών. Η απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών Sox2 και Oct-4 στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U373-HERV-K10 συμβαδίζει με την αδυναμία σχηματισμού νευροσφαιρών όταν τα εν λόγω κύτταρα καλλιεργούνται υπό συνθήκες μειωμένης κυτταρικής προσκόλλησης. **(γ)** Δεν εκφράζουν τον δείκτη (καρκινικών) βλαστικών κυττάρων CD133, αλλά εκφράζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες την πρωτεΐνη χαρακτηρισμού των προγονικών αστρογλοιακών κυττάρων, CD44 (Ενότητα 3, εικόνα 3.26).

Το αντιγόνο CD133 (AC133), επίσης γνωστό και ως prominin-1, χαρακτηρίζει τα γλοιοματικά βλαστικά κύτταρα τα οποία αποτελούν ένα εξαιρετικά σπάνιο κυτταρικό υπο-πληθυσμό ο οποίος σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειάς τους (παρουσία υποστρώματος προσκόλλησης και ορού) εντοπίζεται σε πολύ μικρή συχνότητα ή και καθόλου. Τα κύτταρα αυτά όταν καλλιεργούνται απουσία ορού και παρουσία αυξητικών παραγόντων (EGF, bFGF) ενισχύονται αριθμητικά εντός της καλλιέργειας και σχηματίζουν νευρόσφαιρες οι οποίες φέρουν ιδιότητες αυτό-ανανέωσης, διαφοροποίησης σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους και ογκογένεσης όταν μεταμοσχεύονται σε ανοσοκατασταμένους μύες (234). Αρχικά είχε ταυτοποιηθεί ως ένα επιφανειακό αντιγόνο

που χαρακτηρίζει τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και ταυτοποίηση ενός κυτταρικού υπο-πληθυσμού με ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων που εντοπίζεται σε εγκεφαλικούς όγκους και θεωρείται ισχυρά ογκογενετικός και ανθεκτικός στις τρέχουσες θεραπείες εξαιτίας των βλαστικών του ιδιοτήτων. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες έχουν αμφισβητήσει την αποκλειστικότητα αυτών των ιδιοτήτων από τα συγκεκριμένα μόνο κύτταρα, καθώς έχουν ταυτοποιήσει και CD133-αρνητικούς κυτταρικούς πληθυσμούς γλοιώματος που φέρουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η έκφραση του CD133 σε νευρόσφαιρες, προερχόμενες από θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10 όπου και βρέθηκε ότι αυξάνεται συγκριτικά με τα αμεταχείριστα κύτταρα U-87 MG (Ενότητα 3, εικόνα 3.26). Ωστόσο, η μετατόπιση της κατανομής έντασης φθορισμού που αντιπροσωπεύει τα CD133-θετικά κύτταρα στους κλώνους U87-HERV-K10, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες, είναι σχετικά μικρότερη από την αναμενόμενη. Με βάση και τα παραπάνω, μία πιθανή εξήγηση αυτού του αποτελέσματος είναι ότι ο εν λόγω αντιγονικός δείκτης δεν δεσμεύει τον σύνολο των κυτταρικών υπο-πληθυσμών εντός της καλλιέργειας που φέρουν ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Στον αντίποδα, ως αναμένετω αμφοτεροι, οι θετικοί ρετρομετάθεσης U373-HERV-K10 κλώνοι, και τα κύτταρα-μάρτυρες U-373 MG εμφανίζονται αρνητικοί στην έκφραση του CD133, δεδομένου ότι δεν σχηματίζουν νευρόσφαιρες και συνεπώς δεν εκφράζουν πρωτεΐνες βλαστικότητας.

Επιπλέον, μελετήθηκε και ένας άλλος αντιγονικός δείκτης καρκινικών βλαστικών κυττάρων, ο CD44, ο οποίος κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στις διακυτταρικές συνδέσεις καθώς και στις συνδέσεις κυττάρου-εξωκυττάρου στρώματος (379). Αν και σε κάποιες μορφές καρκίνου μεταξύ των οποίων του μαστού και του προστάτη ο συγκεκριμένος δείκτης εφαρμόζεται για τον χαρακτηρισμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, στην περίπτωση του γλοιώματος αντιπροσωπεύει κυρίως προγονικά κύτταρα της αστρογλοιακής γενεαλογίας καθώς και ώριμα αστροκύτταρα (376), (380). Συνεπώς, στον ενήλικα εγκέφαλο του ανθρώπου τα CD44-θετικά προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται αποκλειστικά προς αστροκύτταρα και όχι προς νευρώνες. Επιπλέον, το αντιγόνο CD44 εκφράζεται ισχυρά στα γλοιώματα υψηλής κακοήθειας όπου θεωρείται ότι δρα ως υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος το οποίο αποτελεί κύριο συστατικό του εξωκυττάρου στρώματος (381), (382). Με βάση αυτή την παρατήρηση το αντιγόνο CD44 διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων με το εξωκυττάρου στρώμα ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο το μεταστατικό τους δυναμικό και δυναμικά την ογκογενετική τους ικανότητα σε παρακείμενους ιστούς (383).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση του CD44 σε νευρόσφαιρες προερχόμενες από θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10 και βρέθηκε ότι μειώνεται σημαντικά, συγκριτικά με τα αντίστοιχα αμεταχείριστα κύτταρα U-87 MG (Ενότητα 3, εικόνα 3.26), εν αντιθέσει με τους κλώνους U373-HERV-K10 στους οποίους παρατηρείται μία αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασής του, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες U-373 MG. Μία πιθανή ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων είναι ότι οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι U373-HERV-K10 συνίστανται από κύτταρα της αστρογλοιακής γενεαλογίας, συνεπώς με βάση και τις βιβλιογραφικές αναφορές, εκφράζουν πιο ισχυρά τον δείκτη CD44. Αντιθέτως οι νευρόσφαιρες θετικών ρετρομετάθεσης κλώνων U87-HERV-K10 διαφοροποιούνται τόσο προς αστρογλοιακά όσο και προς νευρωνικά κύτταρα με αποτέλεσμα να εκφράζουν σε μικρότερο ποσοστό τον δείκτη CD44.

4.5 Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ογκογενετικότητας και μεταστατικότητας

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα προτείνουν ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την ενισχυμένη διηθητικότητα που χαρακτηρίζει τις κακοήθειες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εν προκειμένω, κύτταρα που υπερεκφράζουν τον επιφανειακό δείκτη CD133 επιδεικνύουν ενισχυμένο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* πειράματα, συγκρινόμενα με CD133-αρνητικά κύτταρα, αμφότερα απομονωθέντα είτε από πρωτογενείς όγκους (384), είτε από κυτταρικές σειρές (385) ανθρώπινου πολύμορφου γλοιοβλαστώματος. Επιπλέον, και το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης CD44 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε μεταστατικούς όγκους του εγκεφάλου (386) ενώ έχει προταθεί και ως πιθανός διαμεσολαβητής της διήθησης των γλοιωματικών κυττάρων (383).

Έχοντας στοιχειοθετήσει την παραγωγή καρκινικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων από θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87 κυττάρων, το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας εστιάστηκε στην μελέτη των ογκογενετικών και μεταστατικών τους ιδιοτήτων. Σε αυτή την κατεύθυνση αποδείξαμε ότι οι θετικοί ρετρομετάθεσης κλώνοι τόσο των U87-HERV-K10, όσο και των U373-HERV-K10 κυττάρων ήταν ικανοί να σχηματίζουν μεγάλες σε μέγεθος και αριθμό κυτταρικές εστίες όταν καλλιεργούνταν σε ημιστερεά μέσα, σηματοδοτώντας ένα ενισχυμένο ογκογενετικό δυναμικό συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (Ενότητα 3, εικόνα 3.27 και 3.28). Επιπλέον, η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 ως ερέθισμα μπορεί να αυξήσει το μεταστατικό δυναμικό των γλοιωματικών κυττάρων U87 και U373, όπως αποδείχθηκε με την τεχνολογία RTCA DP-Xcelligence (Ενότητα 3, εικόνα 3.29). Τα πειραματικά μας αυτά ευρήματα βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων που αποδίδουν τις ιδιότητες της ογκογενετικότητας και μεταστατικότητας των υψηλού βαθμού κακοήθειας γλοιωμάτων στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (384), και στην υπερέκφραση μιας σειράς επιφανειακών δεικτών όπως είναι οι CD133 και CD44.

4.6 Η επιγενετική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος

Τις τελευταίες δεκαετίες τα φάρμακα επιγενετικής δράσης βρίσκουν μία ευρέως διαδεδομένη εφαρμογή στην θεραπευτική αντιμετώπιση πολλών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται ουσίες που απομεθυλιώνουν το DNA καθώς και αναστολείς των ενδοκυττάρων από-ακετυλασών, τελικός στόχος των οποίων είναι η ανατροπή επιγενετικών εκτροπών που απαντώνται στα καρκινικά κύτταρα. Οι επιγενετικές εκτροπές στον καρκίνο επηρεάζουν πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται σε ποικίλες θεμελιώδεις διεργασίες του κυττάρου όπως είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση, η κυτταρική διήθηση η μετάσταση και η διαφοροποίηση. Ένας πιθανός στόχος των επιγενετικών φαρμάκων είναι για παράδειγμα η επαγωγή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το p21, τα οποία μειορρυθμίζονται σε ένα καρκινικό κύτταρο. Αντίστοιχη όμως του μεγάλου εύρους κυτταρικών λειτουργιών που ελέγχονται από το επιγενετικό προφίλ ενός κυττάρου, είναι και η ενδεχόμενη πλειοτροπική δράση των επιγενετικών φαρμάκων στη φυσιολογία του. Η αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και η επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση που προκαλείται από την δράση αναστολέων των HDACs όπως είναι το βαλπροϊκό οξύ, είναι δυνατό να οδηγούν σε ενεργοποίηση ρετροτρασποζονίων. Παρόμοια δράση μέσω της από-μεθυλίωσης των CpGs που εντοπίζονται στις αλληλουχίες ρετρομεταθετών στοιχείων, πιθανώς να έχουν και οι αναστολείς των μεθυλοτρανσφερασών όπως είναι η 5'-αζακυτιδίνη

Στην παρούσα μελέτη, στα πλαίσια της υπόθεσης εργασίας για την διερεύνηση της δράσης επιγενετικών φαρμάκων στη ενεργοποίηση ρετροτρανσποζονίων, αποδείξαμε την επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 από δύο φάρμακα: το βαλπροϊκό οξύ και την 5'-αζακυτιδίνη.

Βασικά ευρήματα της μελέτης μας ήταν ότι τόσο ο ακετυλιωτικός παράγοντας VPA όσο και η απομεθυλιωτική ουσία 5'-AZA επάγουν την συχνότητα ρετρομετάθεσης των ενδογενών ρετροϊών HERV-K10 κατά τρόπο δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο.

Αναστολείς από-ακετυλασών (HDACs) – Βαλπροϊκό οξύ (VPA)

Το βαλπροϊκό οξύ αποτελεί ένα ευρέως συνταγογραφούμενο αντισπασμωδικό φάρμακο που χορηγείται σε αρκετές νευρολογικές παθήσεις, μεταξύ των οποίων η επιληψία, η σχιζοφρένεια και η διπολική διαταραχή. Πρόσφατα έχει εισαχθεί και σε θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση κακοηθειών του εγκεφάλου, στα οποία συνδυάζεται κυρίως με την τεμοζολομίδη.

Στην παρούσα εργασία αποδείξαμε ότι το βαλπροϊκό οξύ επάγει την συχνότητα ρετρομετάθεσης των ενδογενών ρετροϊκών στοιχείων HERV-K10 κατά δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο σε δύο ανθρώπινες γλοιοματικές κυτταρικές σειρές. Πιο ειδικά, το VPA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις από 1 έως 6 mM καθώς και σε αυξανόμενους χρόνους επίδρασης από 24 έως 96 ώρες (για τις ίδιες συγκεντρώσεις) επέφερε μία προοδευτική αύξηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης τόσο σε κύτταρα U373, όσο και σε κύτταρα U87 (Ενότητα 3, εικόνα 3.32). Στην περίπτωση μάλιστα των κυττάρων U373, η συχνότητα ρετρομετάθεσης άγγιξε το εντυπωσιακά υψηλό ποσοστό του 35.96% που αντιστοιχεί σε 359.600-φορές υψηλότερη της φυσικής συχνότητας. Το αντίστοιχα υψηλότερο ποσοστό που παρατηρήθηκε για τα κύτταρα U87 ήταν 10.8% που αντιστοιχεί σε 108.000-φορές υψηλότερη συχνότητα ρετρομετάθεσης της φυσικής. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι το βαλπροϊκό οξύ αποτελεί έναν ισχυρό επαγωγέα της ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10.

Τα πιο πάνω αποτελέσματα επαληθεύτηκαν και σε γενωμικό επίπεδο με ανάλυση PCR όπου ανιχνεύτηκε το προϊόν των 342bp σε κύτταρα αμφοτέρων των δύο κυτταρικών σειρών τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA. Μάλιστα η δέσμη των 342bp, που αντιστοιχεί στο ματισμένο γονίδιο της EGFP και σηματοδοτεί τις ρετρομεταθετικές ενσωματώσεις που έχουν συντελεστεί στο γένωμα, παρουσίασε μια προοδευτική αύξηση της πυκνότητάς της που ήταν ανάλογη της αυξανόμενης δόσης του φαρμάκου που χορηγήθηκε στα κύτταρα (Ενότητα 3, εικόνα 3.33). Συνολικά, τα δεδομένα που ελήφθησαν από τις αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής και PCR, πιστοποιούν ότι το VPA επάγει την ρετρομετάθεση των HERV-K10 κατά έναν ειδικό τρόπο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το VPA αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα των ενδοκυττάρων HDACs καθώς έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τις HDACs 1, 2, 3, 4 και 8 σε ένα ποσοστό της τάξης του 50% σε μικρές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μόλις από 0.5 έως 2 mM. Σε πλήθος μελετών, η επαγωγή της ιστονικής ακετυλίωσης έχει συσχετιστεί με ευχρωματινοποίηση και επαγωγή της μεταγραφής μέσω αναδιατάξεων της χρωματίνης που λαμβάνουν χώρα γύρω από υποκινητές γονιδίων. Συνεπώς η επαγωγή από βαλπροϊκό οξύ μεταγραφική ενεργοποίηση των ενδογενών ρετροϊών HERV-K10 θα μπορούσε να ερμηνεύσει τα υψηλά ποσοστά ρετρομετάθεσής των που λαμβάνονται, δεδομένου ότι για την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης απαιτείται η μεταγραφή του ρετροτρανσποζονίου. Η ορθότητα αυτού του ισχυρισμού επαληθεύεται και από ανάλογη μελέτη η οποία έχει αποδείξει ότι το VPA αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα και μάλιστα κατά τρόπο δόσο-εξαρτώμενο, πολλών στοιχείων HERVs,

συμπεριλαμβανομένων μελών που ανήκουν στις τάξεις των ERV9 και HERV-W, σε διάφορες κυτταρικές σειρές, προερχόμενες από ανθρώπινο εγκέφαλο (387).

Επίσης αξιοσημείωτο, στα πλαίσια και της κλινικής σημασίας των αποτελεσμάτων μας, είναι το γεγονός ότι ένας σημαντικά υψηλός αριθμός HERV μεταγράφων έχει ανιχνευθεί σε δείγματα εγκεφάλου, πλάσματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού ασθενών με σχιζοφρένεια και διπολική διαταραχή, χωρίς να είναι γνωστό αν αυτά τα ενδογενή ρετροϊκά στοιχεία αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες ή είναι το αποτέλεσμα των εν λόγω παθήσεων (388). Με δεδομένο όμως ότι οι ασθενείς συχνά λαμβάνουν βαλπροϊκό οξύ ως θεραπευτική αγωγή για αυτές τις νευρολογικές παθήσεις, πιθανόν να προκαλείται η ενεργοποίηση ρετρομεταθετών στοιχείων, ως συνέπεια επιγενετικών αλλαγών που επιφέρει το συγκεκριμένο φάρμακο.

Σε ένα επόμενο στάδιο της μελέτης μας διαπιστώσαμε ότι κύτταρα κλώνων και από τις δύο κυτταρικές σειρές στα οποία είχε προηγηθεί επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA, εμφάνισαν μία χαρακτηριστική μεταβολή του φαινοτύπου τους που ήταν ανάλογη της δόσης του φαρμάκου που τους χορηγήθηκε κάθε φορά (Ενότητα 3, εικόνα 3.34). Η μεταβολή αυτή συνίστατο σε κύτταρα που απώλεσαν την πεπλατυσμένη, πολυγωνική μορφολογία τους και απέκτησαν έναν διαφοροποιημένο φαινότυπο με ολοένα και πιο μακρές και λεπτές κυτταρικές αποφυάδες. Μάλιστα, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του φαρμάκου και συνεπώς η επαγόμενη από αυτό ρετρομετάθεση, ο διαφοροποιημένος φαινότυπος εγκαθιδρύνονταν πιο δυναμικά στην καλλιέργεια, καθώς αυξανόταν σημαντικά το ποσοστό των κυττάρων που τον εμφάνιζε. Οι πρώιμες αυτές ενδείξεις επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια με την πραγματοποίηση ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών δεικτών διαφοροποίησης (Ενότητα 3, εικόνες 3.35 και 3.36). Όπως είχε διαφανεί, στα κύτταρα U-373 παρατηρήθηκε μία δόσο-εξαρτώμενη από το VPA μείωση της έκφρασης της νεστίνης που αποτελεί δείκτη νευρικών προγονικών/βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, στις μικρές συγκεντρώσεις των 1 και 2 mM παρατηρείται μία αύξηση της έκφρασης του αστρογλοιακού δείκτη GFAP κατά 1.5- και 1.3-φορές αντίστοιχα, ο οποίος όμως στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 4 και 6 mM μειώνεται κάτω από τα επίπεδα έκφρασής του στα αμεταχείριστα κύτταρα του κλώνου. Συγχρόνως όμως με την μείωση της GFAP, τα κύτταρα εμφανίζουν αυξανόμενη ανοσοαντιδραστικότητα στον νευρο-ειδικό δείκτη βIII-τουμπουλίνη. Οι μικρότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου που επιφέρουν συχνότητες ρετρομετάθεσης που κυμαίνονται μεταξύ 10- και 14% επάγουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της GFAP συγκριτικά με τα αμεταχείριστα κύτταρα του κλώνου (Ενότητα 3, εικόνα 3.35). Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν και με τα αποτελέσματα τις προηγούμενης ενότητας όπου αποδείξαμε ότι κλώνοι U373 με συχνότητες ρετρομετάθεσης από 0.12- έως 7.96% παρουσίασαν αυξημένη έκφραση της GFAP που σηματοδοτεί την διαφοροποίησή τους προς έναν πιο ώριμο αστροκυτταρικό φαινότυπο (Ενότητα 4: πίνακας 4.1). Υψηλότερες όμως συχνότητες ρετρομετάθεσης (~16 – 36%) που επήγαγαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, αλλά που δεν παρατηρήθηκαν σε μονήρεις κλώνους, φαίνεται πως συσχετίζονται με την έκφραση της βIII-τουμπουλίνης. Θα μπορούσαμε συνεπώς να ισχυριστούμε πως στα κύτταρα U373 οι υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης σχετίζονται με φαινόμενα δια-διαφοροποίησης ενός αστρογλοιακού υποπληθυσμού προς έναν πιο νευρο-ειδικό φαινότυπο.

Η χρήση του VPA για την *in vitro* πρόκληση κυτταρικής διαφοροποίησης είναι γνωστή από την βιβλιογραφία καθώς έχει αποδειχτεί ότι σε κύτταρα γλοιώματος αρουραίου C6, όταν χορηγούνται χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου από 1.5- έως 2 mM, επάγεται η έκφραση της GFAP. Σε υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις του ακετυλιωτικού αυτού παράγοντα, τα επίπεδα έκφρασης της GFAP μειώνονται και

επάγεται η έκφραση της β III-τουμπολίνης (389). Συνδυάζοντας συνεπώς τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα με τις δικές μας παρατηρήσεις ως προς τα κύτταρα U373, θα μπορούσε να προταθεί η επαγωγή της ρετρομετάθεσης ως ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του βαλπροϊκού οξέος στη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου.

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για τα κύτταρα U87, καθώς η επαγόμενη από VPA ρετρομετάθεση σχετίζεται και σε αυτή την περίπτωση με φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. Μόλις από τη συγκέντρωση του 1mM VPA που επάγει συχνότητες ρετρομετάθεσης της τάξης του 7.33%, τα κύτταρα χάνουν ολοσχερώς την έκφραση του αστροκυτταρικού δείκτη της GFAP και ταυτόχρονα εμφανίζονται θετικά στην έκφραση του νευρο-ειδικού δείκτη β III-τουμπολίνης (Ενότητα 3, εικόνα 3.36). Τα επίπεδα έκφρασης της β III-τουμπολίνης αυξάνονται περεταίρω, καθώς αυξάνεται η επαγόμενη από VPA ρετρομετάθεση, και ταυτόχρονα μειώνεται η έκφραση της νεστίνης. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας όπου είχαμε αποδείξει ότι οι θετικοί σε ρετρομετάθεση U-87 κλώνοι, με συχνότητες που κυμαίνονταν από 2.33 – 24.9%, εμφανίζονταν θετικοί στην έκφραση της β III-τουμπολίνης και αρνητικοί στην έκφραση της GFAP (Ενότητα 4: Πίνακας 4.1). Συνολικά, αποδεικνύεται ότι και στα κύτταρα U-87 η επαγόμενη από VPA συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 σχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού από έναν αστρογλοϊακό προς ένα νευρο-ειδικό φαινότυπο.

Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι το VPA αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γλοιώματος. Η αναστολή αυτή είναι δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη ενώ φαίνεται να εξαρτάται και από την εκάστοτε κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται στα *in vitro* πειράματα. Ως εκ τούτου η μέση ανασταλτική συγκέντρωση του φαρμάκου (IC50) κυμαίνεται από 0.1 έως και 7 mM και φαίνεται να επάγει κατά τρόπο ειδικό την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G0/G1 ή εναλλακτικά, στις φάσεις G2/M, ανάλογα με το αν η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται φέρει το μεταλλαγμένο ή άγριου τύπου γονίδιο *p53* (390), (391). Στην παρούσα εργασία διαπιστώσαμε ότι η επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση σχετίζεται με αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G2/M και S και στις δύο κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση κυττάρων U373 και U87 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις VPA από 1-6 mM για 96 ώρες προκάλεσε μία δοσο-εξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που παραμένουν στο σημείο ελέγχου G2/M, από 27.84- σε 41.1% για τα κύτταρα U373 και από 40.61- σε 53.89% για τα κύτταρα U87 (Ενότητα 3, εικόνα 3.37). Επιπλέον, για τα κύτταρα U-373 παρατηρήθηκε και μία δοσο-εξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται καθηλωμένα στη φάση S από 12.62- σε 24.01%. Αντίστοιχα, για τα κύτταρα U-87 το ποσοστό αυτό αυξήθηκε από 4.01- σε 8.32% στη μικρότερη συγκέντρωση του 1 mM, αλλά σταδιακά μειώνονταν καθώς αυξανόταν περεταίρω η συγκέντρωση του φαρμάκου. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε καμία περίπτωση δεν διαπιστώθηκε αυξημένος κυτταρικός θάνατος όπως καταμαρτυρείται από την sub-G1 φάση η οποία συγκριτικά με τα αμεταχείριστα κύτταρα των κλώνων δεν εμφανίζει σημαντικές αποκλίσεις στα ποσοστά των κυττάρων που εντοπίζονται σε αυτήν ύστερα από επίδραση με VPA. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τον έλεγχο της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου έρχονται για να επιβεβαιώσουν την πρόκληση δοσο-εξαρτώμενης από το VPA, κυτταρικής διαφοροποίησης η οποία συνοδεύεται από μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs) – 5'-αζακυτιδίνη (5'-AZA)

Έχει προταθεί ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί όπως είναι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην εκκίνηση ογκογενετικών φαινομένων και να συμμετέχουν ενεργά στην διατήρηση της κακοήθους κατάστασης που χαρακτηρίζει ένα καρκινικό κύτταρο (392). Σε καρκινικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί αποκλίσεις στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA που αφορούν φαινόμενα τόσο υπερμεθυλίωσης υποκινητών μεμονωμένων γονιδίων, όσο και μίας γενικευμένης γενωμικής απομεθυλίωσης που επιφέρουν μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων και γενωμική αστάθεια, αντίστοιχα. Πιθανό στόχο των επιγενετικών φαρμάκων αποτελεί η αποκατάσταση του φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσης η οποία θα εμπόδιζε την περαιτέρω μεθυλίωση του DNA και συνεπώς θα απέτρεπε την αποσιώπηση γονιδίων τα οποία είναι σημαντικά για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Η θεραπεία καρκινικών κυττάρων με από-μεθυλιωτικούς παράγοντες θα μπορούσε να επανενεργοποιήσει ένα σύνολο γονιδίων όπως το *p16* και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*), τα οποία ελέγχουν μία σειρά κρίσιμων ομοιοστατικών μηχανισμών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση.

Η αναστολή των DNMTs μέσω ουσιών όπως η 5-αζακυτιδίνη αποτελεί τον πλέον αποτελεσματικό τρόπο για την επίτευξη της απομεθυλίωσης του. Ωστόσο η στόχευση των DNMTs είναι μία διαδικασία με περιορισμένη ειδικότητα στη δράση της και μπορεί να οδηγήσει σε μία καθολική απομεθυλίωση του DNA, συμπεριλαμβανομένων και μη-κωδικών αλληλουχιών όπως είναι τα ρετροτρανσποζονια. Τα ρετροτρανσποζόνια υπό φυσιολογικές συνθήκες παρουσιάζουν έντονη μεθυλίωση η οποία εμποδίζει την έκφραση ή/και την κινητοποίησή τους και προστατεύει καταυτό τον τρόπο το κύτταρο από γενοτοξικά φαινόμενα. Έχει αποδειχθεί ότι ο βαθμός μεθυλίωσης της περιοχής U3 των HERV-K LTR συσχετίζεται έντονα με την μεταγραφική ενεργότητα των εν λόγω ενδογενών ρετροϊών (393).

Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να μελετήσουμε την πιθανή επίδραση του απομεθυλιωτικού παράγοντα, 5-αζακυτιδίνη στην ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας κατέδειξαν μία δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενη επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης μετά από επώαση κυττάρων U-373 και U-87 με την 5-Aza (Ενότητα 3, εικόνες 3.38 και 3.39). Συγκεκριμένα, η επίδραση κυτταρικών κλώνων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6, και 8 μM 5-Aza, επέφεραν μία προοδευτική αύξηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης η οποία για τα κύτταρα U373 κυμάνθηκε από 1.65- έως 3.65% και για τα κύτταρα U87 από 1.54- έως 40.16%. Στην ίδια κατεύθυνση, αποδείξαμε ότι η συχνότητα ρετρομετάθεσης αυξάνεται σημαντικά και σε σχέση με τον χρόνο επίδρασης των κυττάρων με τον από-μεθυλιωτικό αυτό παράγοντα. Κύτταρα U-373 και U-87 που επωάστηκαν με 1 μM 5-Aza σε αυξανόμενους χρόνους επίδρασης από 24 έως 96 ώρες, εμφάνισαν μία προοδευτική αύξηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης που κυμάνθηκε από 3.45- έως 5.34% για τα κύτταρα U-373 και από 6.32- έως 50.09% για τα κύτταρα U-87. Η σημαντική διαφορά που παρατηρείται στα ποσοστά ρετρομετάθεσης μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών ενδεχομένως να οφείλεται στον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Έχει υπολογιστεί ότι ο χρόνος διπλασιασμού για τα κύτταρα U-373 είναι περίπου 57,14 ώρες ενώ για τα κύτταρα U-87 είναι 35 ώρες (Ενότητα 3: Πίνακας 3.1). Η 5-αζακυτιδίνη είναι πιο δραστική σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα γιατί δρα μέσω αναστολής των ενδοκυττάρων DNMTs και επιφέρει παθητική απομεθυλίωση στα θυγατρικά κύτταρα κάθε φορά που το DNA αντιγράφεται. Συνεπώς κάτω από τις ίδιες συνθήκες επίδρασης (συγκέντρωση και χρόνος) με 5-αζακυτιδίνη, στα U-87 κύτταρα που εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα U-373, η απομεθυλίωση και κατά συνέπεια και η επαγόμενη ρετρομετάθεση

πραγματοποιούνται με μεγαλύτερη συχνότητα. Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν και με άλλες μελέτες που εμπλέκουν την μεθυλίωση του DNA στον επιγενετικό έλεγχο της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων. Ακολουθώς περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο πιστεύεται ότι πραγματοποιείται αυτός ο έλεγχος.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης προϋποθέτει αρχικά την μεταγραφή του προ-ϊού HERV-K10. Η ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του ρετροϊικού αυτού στοιχείου σε γενικές γραμμές επιτυγχάνεται με δύο αλληλοσυμπληρούμενους τρόπους. Πρώτον, μέσω της έκφρασης ειδικών μεταγραφικών παραγόντων από το κύτταρο-ξενιστή που ενισχύουν την σύνδεση της RNA-πολυμεράσης στον υποκινητή του προϊού, και δεύτερον μέσω της ανοιχτής δομής του υποκινητή που επιτρέπει την προσβασιμότητα των ενεργών μεταγραφικών παραγόντων σε αυτόν. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι στα σωματικά κύτταρα τα LTR στοιχεία των ενδογενών ρετροϊών παραμένουν συνήθως μεταγραφικά ανενεργά εξαιτίας της έντονης μεθυλίωσης των CpGs τους (394). Συγκεκριμένα, σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μελανώματος έχει αναφερθεί ότι η ενεργότητα του υποκινητή των στοιχείων HERV-K σχετίζεται άμεσα με το βαθμό μεθυλίωσης των 5'-LTR τους (395), καθώς οι μεταγραφικοί παράγοντες που απαιτούνται για την έκφρασή τους δεν προσδένονται σε μεθυλιωμένο DNA (396). Συνεπώς η μεταγραφική ενεργοποίηση των HERV-K10 προϋποθέτει την διαθεσιμότητα των απαιτούμενων μεταγραφικών παραγόντων, συνεπικουρούμενη από την απομεθυλίωση των 5'-LTRs τους.

Συνολικά, τα πειραματικά ευρήματα αυτής της ενότητας αποδεικνύουν ότι η 5'-αζακυτιδίνη επάγει την συχνότητα ρετρομετάθεσης κατά τρόπο δόσο- και χρονο-εξαρτώμενο σε κύτταρα U373 και U87 καθιστώντας την μεθυλίωση των CpGs που εντοπίζονται στις 5'-LTR αλληλουχίες ως έναν πιθανό μηχανισμό επιγενετικής αποσιώπησης των HERV-K10 σε κύτταρα γλοιώματος.

Σε ορισμένες έρευνες έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση του απομεθυλιωτικού παράγοντα 5'-αζακυτιδίνη σε προγονικά νευρικά κύτταρα επάγει την διαφοροποίησή τους προς χολινεργικούς και αδρενεργικούς νευρώνες πιθανώς μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που εμπλέκονται στην νευρογένεση (397). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η μεταχείριση κυττάρων γλοιώματος με τον εν λόγω παράγοντα ενεργοποιεί την έκφραση των miR-124 και miR-137, που σε πληθώρα ανθρώπινων όγκων είναι κατασταλμένα, και εμπλέκονται στην διαφοροποίηση τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (304). Στην παρούσα εργασία, προτείνεται ένας εναλλακτικός μηχανισμός δράσης της 5'-αζακυτιδίνης στην πρόκληση κυτταρικής διαφοροποίησης των γλοιοματικών κυττάρων, ο οποίος σχετίζεται με την ενεργοποίηση των ενδογενών ρετροϊικών στοιχείων HERV-K10. Πιο ειδικά, αποδείξαμε ότι σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα, η 5'-AZA, μέσω της επαγωγής υψηλών συχνοτήτων ρετρομετάθεσης, (ιδίως σε κύτταρα U-87), συσχετίζεται με φαινόμενα αστροκυτταρικής διαφοροποίησης κυττάρων U-373, και νευρωνικής *trans*-διαφοροποίησης κυττάρων U-87 (Ενότητα 3, εικόνες 3.41 και 3.42).

Σε απόλυτη συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας επιβεβαιώσαμε ότι οι υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης που επιτυγχάνονται είτε αυθόρμητα μετά την διαμόλυνση κυττάρων U-87 MG με τον προϊό HERV-K10, είτε με την επίδραση επιγενετικών ερεθισμάτων όπως είναι οι ακετυλιωτικοί και από-μεθυλιωτικοί παράγοντες, οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή την πρόκληση κυτταρικού επαναπραγματισμού από έναν αστρογλοιακό προς έναν νευρο-ειδικό φαινότυπο. Στον αντίποδα, τα κύτταρα U-373 στα οποία οι συχνότητες ρετρομετάθεσης μετά την διαμόλυνσή τους ή την επίδραση με 5'-αζακυτιδίνη είναι σημαντικά χαμηλότερες (μέχρι 7%) σε σχέση με τα U-87, διαφοροποιούνται αποκλειστικά προς αστροκύτταρα όπως αποδεικνύεται από την

έκφραση της GFAP. Μόνο στην περίπτωση επίδρασης με VPA το οποίο επέφερε πολύ υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης, της τάξης του 25% παρατηρήθηκε έκφραση της βIII-τουμπουλίνης που σηματοδοτεί την νευρωνική διαφοροποίηση.

Αλκυλιωτικοί παράγοντες – Τεμοζολομίδη

Η τεμοζολομίδη αποτελεί έναν μεθυλιωτικό, μεταλλαξιγόνο παράγοντα που χορηγείται ευρέως σε χημειοθεραπευτικά σχήματα για την θεραπεία όγκων του εγκεφάλου. Στην παρούσα εργασία επιδράσαμε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τεμοζολομίδης κυμαινόμενες από 0.125- έως 1 μM για 72 ώρες σε δύο κλώνους κυττάρων U-373 και U-87 που εμφάνιζαν υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης. Παρατηρήθηκε μία δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης (Ενότητα 3, εικόνα 3.44). Στην μέγιστη συγκέντρωση του 1 μM η αναστολή της ρετρομετάθεσης άγγιξε το ποσοστό του 86% για τα κύτταρα U-373 και το 58.86% για τα κύτταρα U-87. Σε ένα επόμενο στάδιο επιδράσαμε στους ίδιους κλώνους με 1 μM τεμοζολομίδης σε χρονικά διαστήματα 24, 48 72 και 96 ωρών, και διαπιστώσαμε μία χρονο-εξαρτώμενη αναστολή της αρχικής συχνότητας ρετρομετάθεσής τους που άγγιξε το 100% για τα κύτταρα U-373 και το 69.48% για τα κύτταρα U-87 (Ενότητα 3, εικόνα 3.45). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα παραπάνω ποσοστά αναστολής της ρετρομετάθεσης παρατηρήθηκαν σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου που κυμαίνονταν από 0.125 έως 1 μM . Στην βιβλιογραφία οι συνήθεις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε *in vitro* πειράματα είναι της τάξης των 10-1000 μM με μία μέση τιμή που οδηγεί σε θάνατο το 50% των κυττάρων να κυμαίνεται στα 200 μM ($\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{M}$). Οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται βιβλιογραφικά χρησιμοποιήθηκαν και από εμάς σε κάποια αρχικά πειράματα επίδρασης που όμως δεν οδήγησαν σε αξιολογίσσιμα αποτελέσματα καθώς η συχνότητα ρετρομετάθεσης είτε δεν μεταβάλλονταν είτε αυξομειώνονταν ακανόνιστα σε σχέση με την συγκέντρωση που εφαρμόζονταν κάθε φορά. Όταν όμως χρησιμοποιήσαμε κατά πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (κάτω του 1 μM) παρατηρήσαμε δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης. Σε μία απόπειρα ερμηνείας της αυτού του αποτελέσματος, θα πρέπει να εστιάσουμε στον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η τεμοζολομίδη αποτελεί έναν αλκυλιωτικό παράγοντα, ο οποίος προσαρτά μία μεθυλο-ομάδα στις θέσεις O^6 και N^7 των καταλοίπων γουανίνης, καθώς και στην θέση N^3 του πουρινικού δακτυλίου καταλοίπων αδερίνης του DNA. Η κυτταροτοξικότητα του φαρμάκου αποδίδεται κυρίως στον σχηματισμό της O^6 -μεθυλογουανίνης ($\text{O}^6\text{-MeG}$) η οποία ζευγαρώνει λανθασμένα με τη θυμιδίνη αντί με την κυτοσίνη. Η βλάβη αυτή είναι δυνατό να διορθωθεί απευθείας από το ένζυμο αυτοκτονίας μεθυλοτρασφεράση της O^6 -μεθυλογουανίνης (MGMT), το οποίο μεταφέρει την μεθυλομάδα από την O^6 -μεθυλογουανίνη σε μία κυστεΐνη του ενεργού του κέντρου αποκαθιστώντας την γουανίνη στην αρχική της μορφή. Απουσία ενεργούς MGMT, τα κύτταρα δεν είναι σε θέση να επιδιορθώσουν την $\text{O}^6\text{-MeG}$ η οποία οδηγεί στον σχηματισμό ενός αταίριαστου ζεύγους $\text{O}^6\text{MeG/T}$ κατά την διάρκεια αντιγραφής του DNA. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν την MGMT είναι πιο ανθεκτικά στην κυτταροτοξική δράση της τεμοζολομίδης, συγκριτικά με εκείνα που παρουσιάζουν έλλειψη ή μειωμένη διαθεσιμότητα της εν λόγω πρωτεΐνης λόγω έντονης μεθυλίωσης του υποκινητή του αντίστοιχου γιενιδίου (398). Έτσι λοιπόν μόλις σχηματιστεί ένα αταίριαστο ζεύγος $\text{O}^6\text{MeG/T}$, ενεργοποιείται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης αταίριαστου ζεύγους (mismatch repair), ο οποίος αφαιρεί την λανθασμένη θυμίνη από την θυγατρική αλυσίδα DNA, αφήνοντας ωστόσο ανέπαφη την O^6MeG στην αλυσίδα-

εκμαγείο. Κατά συνέπεια η συνεχής αφαίρεση και επανα-προσάρτηση της θυμίνης έχει ως αποτέλεσμα τον διαρκή σχηματισμό θραύσεων στην αλυσίδα του DNA και επακόλουθη κατάρρευση της διχάλας αντιγραφής. Το τελικό αποτέλεσμα της δράσης της τεμοζολομίδης είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M (κατά την διάρκεια του δεύτερου κυτταρικού κύκλου από την στιγμή χορήγησης του φαρμάκου) (399) και τελικά η απόπτωση (400). Στην περίπτωση όμως που η λανθασμένα προσαρτημένη θυμίνη διαφύγει του μηχανισμού επιδιόρθωσης του κυττάρου, τότε το ζευγάρι $O^6\text{MeG/T}$ μετατρέπεται σε μία T/A μετάλλαξη στον επόμενο κύκλο αντιγραφής του DNA (401). Βάση αυτού, ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αναστολή της ρετρομετάθεσης από την τεμοζολομίδα πιθανώς να βασίζεται στην πρόκληση μεταλλάξεων (C/G \rightarrow T/A) στο DNA του ρετροτρανσποζονίου οι οποίες το καθιστούν ανίκανο να μετατεθεί εντός του γενώματος. Μάλιστα, αποκλείσαμε την πιθανότητα, οι μεταλλάξεις αυτές να πραγματοποιούνται στο γονίδιο της EGFP, αφού κύτταρα διαμολυσμένα μόνο με το πλασμίδιο της EGFP δεν παρουσίασαν μεταβολές στην έκφρασή της ύστερα από επίδρασή τους με τεμοζολομίδα (Ενότητα 3, εικόνα 3.46). Οι εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου που επιτυγχάνουν αυτή την αναστολή μαρτυρούν ίσως μια στοχευμένη δράση της τεμοζολομίδης έναντι συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που πιθανώς εντοπίζονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες των LTRs του προοίου και οι οποίες είναι απαραίτητες για την μετάθεσή του.

Η αναστολή της ρετρομετάθεσης των ενδογενών ρετροϊών μέσω πρόκλησης υπερμεταλλάξεων στις αλληλουχίες τους έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά. Εν προκειμένω, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη APOBEC3G που ανήκει στην οικογένεια των ανθρώπινων απαμινασών APOBEC, αναστέλλει την ρετρομετάθεση ενός LTR-ρετροϊκού στοιχείου (Ty1 στοιχεία) στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απαμίνωση καταλοίπων κυτοσίνης στο cDNA του προοίου, και την πρόκληση C/G \rightarrow T/A μεταλλαξιόνων μεταπτώσεων στην αλληλουχία του που το καθιστούν ανίκανο να μετατεθεί (402). Αναστολή της ρετρομετάθεσης ενός αυτόνομου HERV-K στοιχείου με παρόμοιο μηχανισμό έχει διαπιστωθεί και σε ανθρώπινα κύτταρα (ανθρώπινα νεφρικά εμβρυικά κύτταρα) (403). Σε αυτή την περίπτωση αποδείχθηκε ότι η αναστολή της ρετρομετάθεσης επιτυγχάνεται μέσω της απαμίνωσης καταλοίπων κυτοσίνης από την πρωτεΐνη APOBEC3G που οδηγεί σε σημειακές G \rightarrow A υπερμεταλλάξεις στην αλληλουχία του προοίου. Με βάση λοιπόν και τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα η υπόθεσή μας σχετικά με τον μηχανισμό δράσης της τεμοζολομίδης στην αναστολή της ρετρομετάθεσης αποκτά μία πιο ισχυρή υπόσταση.

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας αποδεικνύουν ότι τεμοζολομίδα μπορεί να αναστείλει την συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα, σε ποσοστό έως και 100%, όταν χορηγείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η τεμοζολομίδα αν και επέφερε σημαντική αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης σε κλώνους έντονα θετικούς σε αυτήν, δεν συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αναστολή του διαφοροποιημένου φαινοτύπου (Ενότητα 3, Εικόνα 3.47). Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επίδρασης με την τεμοζολομίδα είχε ήδη πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός ενσωματώσεων του προοίου (μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με αυτόν) στο γένωμα που επέφεραν και την έντονη μεταβολή του φαινοτύπου. Η τεμοζολομίδα κατάφερε να εμποδίσει νέες ρετροϊκές ενσωματώσεις να λάβουν χώρα στο γένωμα και σε συνδιασμό πιθανώς με κυτταρικούς μηχανισμούς επιγενετικής αποσιώπησης των ήδη ενσωματωμένων αντιγράφων HERV-K10 (πριν την προσθήκη της τεμοζολομίδης), επιτεύχθηκε αυτή η σημαντική αναστολή της

ρετρομετάθεσης. Ωστόσο ο φαινότυπος είχε ήδη μεταβληθεί μη αναστέψιμα και η περαιτέρω αναστολή της ρετομετάθεσης από την τεμοζολομίδη δεν κατέστη ικανή να τον ανατρέψει. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρούνται ούτε κυτταροτοξικά φαινόμενα καθώς όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, οι συγκεντρώσεις του μεθυλιωτικού παράγοντα στις οποίες σημειώθηκε η αναστολή της συχνότητας ρετρομετάθεσης ήταν εξαιρετικά χαμηλές.

4.7 Η δράση των αναστολέων των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών στην επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10

Η αντίστροφη μεταγραφή του ενδιάμεσου ρετροτρανσποζονιακού μεταγράφου αποτελεί ένα καθοριστικής σημασίας στάδιο για την πραγματοποίηση ενός γεγονότος ρετρομετάθεσης. Όπως είναι γνωστό, πολλοί HERV προϊοί φέρουν λειτουργικά γονίδια *pol* που κωδικοποιούν για αντίστροφη μεταγραφή και μάλιστα έχει αναφερθεί έκφρασή της σε διάφορους ιστούς (404). Ειδικά για τον εγκέφαλο, έχει ανιχνευθεί ένας αυξημένος αριθμός μεταγράφων του γονιδίου *pol* από διάφορες οικογένειες των HERV, συμπεριλαμβανομένων και των HERV-K, σε δείγματα εγκεφάλου ή εγκεφαλονωτιαίου υγρού ασθενών με σχιζοφρένεια και διπολική διαταραχή (405), (406). Το γεγονός αυτό μαρτυρά ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση συγκεκριμένων ρετροϊικών στοιχείων εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος, μπορεί να σχετίζεται με ανάπτυξη νευρολογικών παθήσεων όπως η σχιζοφρένεια και η διπολική διαταραχή.

Δεδομένου ότι το ανασυνδιασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο που κατασκευάστηκε από το εργαστήριό μας και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν κωδικοποιεί για την δική του αντίστροφη μεταγραφή (δεν φέρει την αλληλουχία του γονιδίου *pol*), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ρετρομετάθεσή του βασίστηκε στην αξιοποίηση της ενδογενούς ενζυματικής μηχανής του κυττάρου, στην οποία περιλαμβάνεται και η αντίστροφη μεταγραφή. Έχοντας αυτό ως δεδομένο, διερευνήσαμε τις επιπτώσεις της αναστολής των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών του κυττάρου στην επαγόμενη από το VPA ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10. Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν την αρχική μας υπόθεση καθώς διαπιστώθηκε ότι η επίδραση κυττάρων U373-HERV-K10 ή U87-HERV-K10 με Efavirenz ανέστηλε την επαγόμενη από το VPA συχνότητα ρετρομετάθεσης σε ποσοστό 94.2- και 89.7%, αντίστοιχα (Ενότητα 3, εικόνες 3.48 και 3.49). Μάλιστα αυτή η αναστολή της VPA-επαγόμενης ρετομετάθεσης στα γλοιοματικά κύτταρα U-373 και U-87 συνοδεύτηκε και από αντίστοιχη άρση της επαγόμενης από το VPA κυτταρικής διαφοροποίησης σε αυτά. Η αναστολή της κυτταρικής διαφοροποίησης διαπιστώθηκε αρχικά σε επίπεδο κυτταρικής μορφολογίας (Ενότητα 3, εικόνα 3.50), καθώς τα μεταχειρισμένα με EFV και VPA κύτταρα U373/HERV-K10 διατηρούν την επίπεδη πολυγωνική μορφολογία που χαρακτηρίζει και τα αρχικά κύτταρα του κλώνου, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα επωασμένα μόνο με VPA κύτταρα που φέρουν χαρακτηριστικές μακρές κυτταρικές απολήξεις, ενδεικτικές της κυτταρικής διαφοροποίησης. Παρόμοια εικόνα εμφανίζουν και τα κύτταρα U-87. Οι παρατηρήσεις αυτές εν συνεχεία επιβεβαιώθηκαν και σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης χαρακτηριστικών νευρογλοιακών δεικτών διαφοροποίησης (Ενότητα 3, εικόνα 3.51). Η ανοσοαποτύπωση κατά Western αποκάλυψε μία δραματική αναστολή της επαγόμενης από το VPA έκφρασης των GFAP και β III-τουμπουλίνης σε κύτταρα U373-HERV-K10, της τάξης του 52.3- και 91.2%, αντίστοιχα. Τα ποσοστά αναστολής στην έκφραση των GFAP και β III-τουμπουλίνης μετά από επίδραση με Efavirenz για τα κύτταρα U87-HERV-K10 ήταν της τάξης του 32.8- και 88%, αντίστοιχα. Παρατηρούμε συνεπώς ότι η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης ως αποτέλεσμα της δράσης του βαλπροϊκού οξέος σε γλοιοματικά κύτταρα επάγει κυτταρική διαφοροποίηση, η οποία όμως αίρεται όταν ανασταλλεί η ρετρομετάθεση (με την δράση του Efavirenz). Τα αποτελέσματα αυτά

παρέχουν μία σαφή ένδειξη ότι η αναγνωρισμένη βιβλιογραφικά δράση του βαλπροϊκού οξέος στην επαγωγή κυτταρικής διαφοροποίησης σε γλοιοματικά κύτταρα είναι πιθανό να συσχετίζεται με την μεταγραφική ενεργοποίηση ενδογενών ρετροϊών.

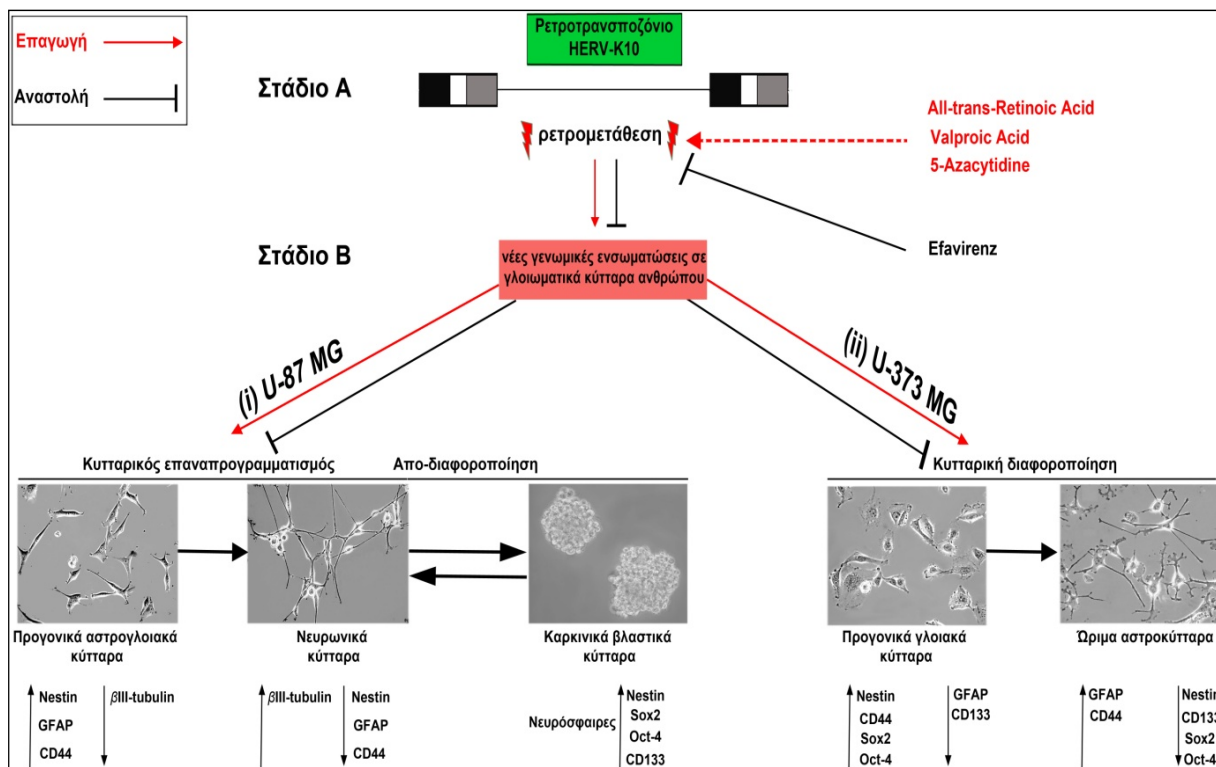
Η διαπίστωση φαινομένων κυτταρικής διαφοροποίησης σε ανθρώπινα γλοιοματικά κύτταρα ύστερα από την τέλεση γεγονότων ρετρομετάθεσης που έλαβαν χώρα είτε αυθόρμητα, μετά την διαμόλυνσή των κυττάρων με το μη-αυτόνομο ρετροϊκό στοιχείο HERV-K10, είτε μέσω επαγωγής τους ύστερα από επίδραση με παράγοντες επιγενετικής δράσης, αποδεικνύουν μία ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στα δύο φαινόμενα (ρετρομετάθεση και διαφοροποίηση). Η συσχέτιση αυτή αναδεικνύεται ακόμα πιο έντονα με την επαγόμενη από Efavirenz αναστολή της ρετρομετάθεσης που επιφέρει ανάλογη αναστολή και της κυτταρικής διαφοροποίησης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα ευρήματα της παρούσας διατριβής είναι τα ακόλουθα:

1. Η διαμόλυνση του μη-αυτόνομου ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 σε ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα U-373 και U-87 MG παρήγαγε γεγονότα ρετρομετάθεσης σε ασυνήθιστα υψηλές συχνότητες, οι οποίες βρέθηκαν να είναι εξαιρετικά πιο ενισχυμένες στα δεύτερα.
2. Η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 επέφερε εκτεταμένη μεταβολή του φαινοτύπου και στις δύο κυτταρικές σειρές η οποία αποτέλεσε μία πρόωμη ένδειξη συντέλεσης κυτταρικής διαφοροποίησης.
3. Ο διαφοροποιημένος φαινότυπος σε κύτταρα U373/HERV-K10 στοιχειοθετήθηκε ως ώριμος αστροκυτταρικός.
4. Ο διαφοροποιημένος φαινότυπος που παρατηρήθηκε στους θετικούς ρετρομετάθεσης κλώνους U87-HERV-K10 στοιχειοθετήθηκε ως νευρωνικός που έλαβε χώρα μέσω κυτταρικού επαναπρογραμματισμού.
5. Επιπρόσθετη απόδειξη της συντελούμενης κυτταρικής διαφοροποίησης αποτέλεσε η σημαντική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των θετικών ρετρομετάθεσης κυττάρων U373-HERV-K10 και U87-HERV-K10, που συνοδεύτηκε από εκτεταμένες διαταραχές του κυτταρικού τους κύκλου.
6. Η επαγωγή της ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 ως αποτέλεσμα της επίδρασης γλοιωματικών κυττάρων με ρετρίνοϊκό οξύ που αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο παράγοντα νευρογλοιακής διαφοροποίησης, συνεπικουρεί στην εμπλοκή του φαινομένου της ρετρομετάθεσης στην διαφοροποίηση των γλοιωματικών κυττάρων.
7. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός των προγονικών αστρο-γλοιωματικών κυττάρων U-87 MG προς έναν νευρο-ειδικό φαινότυπο, πραγματοποιήθηκε με την ενεργοποίηση ενδιάμεσων προγονικών/βλαστικών σταδίων (παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων).
8. Η ενεργοποίηση καρκινικών βλαστικών κυττάρων ως συνέπεια της ρετρομετάθεσης σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος U-87 οδήγησε σε *in vitro* ενίσχυση του ογκογενετικού και μεταστατικού τους δυναμικού. Οι παρατηρήσεις αυτές σημειώθηκαν και σε κύτταρα U373-HERV-K10, παρόλο που στα κύτταρα αυτά δεν διαπιστώθηκε επαγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, το γεγονός ότι βρέθηκαν ισχυρά θετικά στην έκφραση του CD44, πιθανώς να ερμηνεύει την ενισχυμένη ογκογενετικότητα και μεταστατικότητα που επέδειξαν.
9. Σε επίπεδο ρύθμισης της ρετρομετάθεσης του προϊόντος HERV-K10 σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος, αποδείξαμε ότι: η επαγωγή της ρετρομετάθεσης από βαλπροϊκό οξύ και 5'-αζακυτιδίνη συσχετίζονται με φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης και αναστολής του κυτταρικού κύκλου.
10. Η αναστολή της επαγόμενης από βαλπροϊκό οξύ ρετρομετάθεσης με την χρήση αναστολέων των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών (Efavirenz), αποτρέπει την συντελούμενη από το βαλπροϊκό οξύ κυτταρική διαφοροποίηση.

Συμπερασματικά: Τα παραπάνω αποτελέσματα που συνοψίζονται στο συγκεντρωτικό γράφημα 6.1 καθιστούν την επιγενετική ρύθμιση της ρετρομετάθεσης των ενδογενών ρετροϊκών στοιχείων HERV-K10 ως έναν πιθανό μηχανισμό εμπλοκής σε μείζονα κυτταρικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν τις κακοήθειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος στον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται η έντονη γενετική και φαινοτυπική ετερογένεια, οι εκτεταμένες διαταραχές του ρυθμού πολλαπλασιασμού, το μεταστατικό και ογκογενετικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων που απαντώνται στους ενδοκρανιακούς όγκους.



Εικόνα 6.1: Γραφική παρουσίαση επιπτώσεων της ρετρομετάθεσης HERV-K10 σε ανθρώπινα κύτταρα γλοϊώματος (i) U-87 MG και (ii) U-373 MG

Οι πρωτοπαθείς όγκοι του εγκεφάλου αποτελούν το 1,5% των κακοήθων νεοπλασματικών παθήσεων και ευθύνονται για το 2,5% των θανάτων από καρκίνο ετησίως. Το γλοϊώμα, είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου στο ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα), αποτελώντας περίπου το 80% όλων των περιπτώσεων πρωτογενών εγκεφαλικών όγκων στον άνθρωπο. Ανάλογα και με τον βαθμό κακοήθειας οι όγκοι του εγκεφάλου αποτελούν έναν από τους πλέον θανατηφόρους τύπους καρκίνου, καθώς οι σύγχρονες μορφές θεραπείας που εφαρμόζονται σπάνια επιμηκύνουν τον μέσο χρόνο επιβίωσης των ασθενών για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους. Οι προκλήσεις που αντιμετωπίζει η σύγχρονη ογκολογία στην θεραπευτική αντιμετώπιση των κακοηθειών του εγκεφάλου σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την ισχυρή πολυπλοκότητα της νόσου η οποία αντανακλάται στη τεράστια γενετική ετερογένεια και την συνεχή μεταλλαξιγόνο δραστηριότητα που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν όλο και πιο αναγκαία την εμβάθυνση της γνώσης μας γύρω από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου που θα επιτρέψει να εμπεδωθούν αποτελεσματικότερα η ταυτότητα και συμπεριφορά του καρκινικού κυττάρου που είναι και τα ζητούμενα στο ευρύτερο πεδίο της θεραπείας του καρκίνου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή παρέχει μία νέα πτυχή/διάσταση γύρω από τα κυριότερα κυτταρικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν/απαντώνται στα ανθρώπινα γλοϊώματα, τοποθετώντας τον μηχανισμό της ρετρομετάθεσης στο επίκεντρο του γενικότερου μηχανισμού ρύθμισής τους. Η ρετρομετάθεση αποτελεί ένα δυναμικό φαινόμενο με μεταλλαξιγόνο δράση που υπόκειται σε πολύπλοκους και συχνά αδιευκρίνιστους μηχανισμούς ρύθμισης όπως είναι η ενεργοποίησή της από διάφορους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες ή η καταστολή της από επιγενετικούς και άλλους αμυντικούς μηχανισμούς που έχει αναπτύξει το κύτταρο. Η ικανότητα των ρετροτρανσποζονίων να ενσωματώνονται σε διάφορες περιοχές του γενώματος

ενεργοποιώντας ενδεχομένως ογκογονίδια ή καταστέλλοντας ογκο-καταστακτικά γονίδια θα μπορούσε να αποτελέσει γενεσιουργό δύναμη ανάπτυξης κακοηθειών με εκτεταμένη γενετική και φαινοτυπική ετερογένεια. Ενδεχομένως, οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί αποτελούν έναν γενωμικά-εγγενή αιτιολογικό παράγοντα ανάπτυξης και εξέλιξης του ανθρώπινου γλοιώματος που θα μπορούσε να ερμηνεύσει την συνεχή μεταλλαξιμότητα και προσαρμοστικότητα που επιδεικνύουν τα καρκινικά κύτταρα του εγκεφάλου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν διάσπαρτες, μετρίως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γενώματος των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ στον άνθρωπο συγκεκριμένα συνιστούν το 50% του γενώματός του. Τις τελευταίες δεκαετίες προσελκύουν ολοένα και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον χάρις στην ιδιότητα της μετάθεσης που φέρουν, ενσωματώνοντας νέα αντίγραφα τους τυχαία σε νέες θέσεις εντός του γενώματος. Με τον τρόπο αυτό δύνανται να συμβάλουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης αλλά και σε αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Μεταξύ αυτών των στοιχείων συγκαταλέγονται και οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (HERVs), οι οποίοι συνιστούν ~8% του ανθρώπινου γενώματος και φέρουν δομική ομολογία με τους εξωγενείς ρετροϊούς. Τα στοιχεία αυτά πιθανώς προέκυψαν από ενσωματώσεις - διαμεσολαβούμενες από την αντίστροφη μεταγραφάση - σε κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς προγόνων του *Homo Sapiens*, που ακολούθησαν της αρχικής τους μόλυνσης από εξωγενείς ρετροϊούς. Πολλές από τις ακολουθίες HERV στο ανθρώπινο γένομα είναι ατελείς αν και έχουν ανιχνευθεί κάποιες πλήρεις μήκους προϊικές γενωμικές ακολουθίες. Κάποιοι από αυτούς του προϊούς διαθέτουν ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ικανά να κωδικοποιούν πλήρεις ιϊκές πρωτεΐνες ή και να παράγουν ιϊκά σωματίδια. Η ιστο-ειδική έκφραση ορισμένων HERVs έχει συσχετιστεί με αρκετές χρόνιες ασθένειες στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων της πολλαπλής σκλήρυνσης, του σακχαρώδους διαβήτη, της αυτοάνοσης αρθρίτιδας, αλλά και κάποιων τύπων καρκίνου.

Τα ανθρώπινα γλοιώματα συνιστούν την μεγαλύτερη κατηγορία ενδοκρανιακών όγκων. Αποτελούν όγκους που επιδεικνύουν έντονη ετερογένεια σε πολλαπλά επίπεδα που αφορούν στην διαμόρφωση του φαινοτύπου, στην γενετική και επιγενετική τους σύσταση, στο δυναμικό πολλαπλασιασμού τους, καθώς και στο δυναμικό μεταναστευτικότητας, ογκογενετικότητας και ανθεκτικότητάς τους. Πολλές από αυτές τις ιδιότητες αποδίδονται στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells: CSCs) τα οποία μπορούν να προκύψουν είτε μέσω αυξημένου αριθμού συμμετρικών κυτταρικών διαιρέσεων (self-renew) των CSCs είτε μέσω επαναπρογραμματισμού των μη-CSCs σε CSCs, συνεισφέροντας έτσι στην φαινοτυπική πλαστικότητα του κυτταρικού πληθυσμού που συνιστά έναν γλοιωματικό όγκο. Υπέρτατο στόχο των CSCs αποτελεί η επιβίωσή τους και προκειμένου να την επιτύχουν εκμεταλλεύονται στο έπακρον ή και ανατρέπουν ολοσχερώς τον κυτταρικό μηχανισμό, μέσω του πολλαπλασιασμού, της από-διαφοροποίησης ή ακόμα και της δια-διαφοροποίησης.

Σκοπό της διατριβής αυτής αποτέλεσε η διερεύνηση τριών κρίσιμων ερωτημάτων, εάν: **1.** γεγονότα ρετρομετάθεσης λαμβάνουν χώρα σε ανθρώπινα γλοιωματικά κύτταρα, **2.** οι επιπτώσεις της ρετρομετάθεσης συσχετίζονται με μείζονα κυτταρικά φαινόμενα που απαντώνται σε γλοιωματικούς όγκους όπως είναι η φαινοτυπική ετερογένεια, το δυναμικό πολλαπλασιασμού, η ογκογενετικότητα και μεταστατικότητα και **3.** η ρετρομετάθεση υπόκειται σε επιγενετικούς ή άλλους μηχανισμούς ρύθμισης σε γλοιωματικά κύτταρα. Στην παρούσα εργασία, το πρώτο ερώτημα προσεγγίστηκε μέσω διαμόλυνσης δύο ανθρώπινων γλοιωματικών κυτταρικών σειρών (U-373- και U-87 MG) με το μη-αυτόνομο, LTR-ρετροτρανσποζόνιο, HERV-K10, η οποία οδήγησε στην παραγωγή υψηλής συχνότητας ρετρομετάθεσης σε αμφοτέρες τις κυτταρικές σειρές. Μάλιστα στα κύτταρα U87 ανιχνεύθηκαν σταθερά σημαντικά υψηλότερες συχνότητες ρετρομετάθεσης, συγκριτικά με τα U-373, οι οποίες άγγιξαν το ποσοστό του 25%. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι τα ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος αποτελούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης.

Όσον αφορά το δεύτερο σκέλος του σκοπού της παρούσας διατριβής, αποδείξαμε ότι: **α.** η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 σε κύτταρα U-373 συσχετίζεται με

φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης προγονικών γλοιωματικών κυττάρων προς έναν πιο ώριμο αστροκυτταρικό φαινότυπο, **β**. η παραγωγή υψηλότερης συχνότητας ρετρομετάθεσης σε κύτταρα U-87 συσχετίζεται με φαινόμενα κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (cell reprogramming) ή δια-διαφοροποίησης (trans-differentiation) προγονικών αστρογλοιωματικών κυττάρων προς έναν νευρο-ειδικό φαινότυπο. Οι παρατηρήσεις αυτές στοιχειοθετήθηκαν τόσο μέσω αξιολόγησης του προκύπτοντος κάθε φορά φαινότυπου, όσο και μοριακά, μέσω ταυτοποίησης ειδικών πρωτεϊνικών δεικτών αστροκυτταρικής (GFAP-θετικά κύτταρα) και νευρωνικής (βIII-τουμπουλίνη-θετικά κύτταρα) διαφοροποίησης. Επιπλέον στοιχείο που συνεπικουρεί στην στοιχειοθέτηση της κυτταρικής διαφοροποίησης ήταν **γ**. και οι εξαιρετικά χαμηλοί ρυθμοί πολλαπλασιασμού που χαρακτήριζαν τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα αμφοτέρων των κυτταρικών σειρών. Ο μειωμένος ρυθμός πολλαπλασιασμού συνοδεύτηκε από εκτεταμένες διαταραχές του κυτταρικού κύκλου και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ επιπρόσθετα για τα κύτταρα U-87 ανιχνεύθηκαν χρωμοσωματικές υπερπλοειδίες (τετραπλοειδίες). Τέλος, η επαγωγή της συχνότητας ρετρομετάθεσης από τον παράγοντα κυτταρικής διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων, ρετινοϊκό οξύ, ενισχύει ακόμη περισσότερο την υπόθεση εργασίας που συσχετίζει την ρετρομετάθεση με την κυτταρική διαφοροποίηση των γλοιωματικών κυττάρων.

Παραμένοντας σε αυτό το σκέλος του σκοπού μας, αποδείξαμε επιπλέον ότι ο επαγόμενος από ρετρομετάθεση κυτταρικός επανα-προγραμματισμός κυττάρων U-87 επετεύχθη μέσω από-διαφοροποίησής τους προς ένα ενδιάμεσο προγονικό/βλαστικό στάδιο (ενεργοποίηση καρκινικών βλαστικών κυττάρων). Προς αυτή την κατεύθυνση, αποδείξαμε ότι τα θετικά ρετρομετάθεσης κύτταρα U-87, καλλιεργούμενα απουσία κατάλληλου υποστρώματος προσκόλλησης, ήταν ικανά να παράξουν μεγάλες σε αριθμό και μέγεθος νευρόσφαιρες, οι οποίες εξέφραζαν τους πρωτεϊνικούς δείκτες βλαστικότητας νεστίνη, Sox2, Oct-4 και CD133. Επιπλέον, οι νευρόσφαιρες αυτές, που βρέθηκαν ισχυρά θετικές σε ρετρομετάθεση (μέχρι και 80%), ήταν ικανές να αυτό-ανανεώνονται και καλλιεργούμενες υπό φυσιολογικές συνθήκες κυτταρικής προσκόλλησης, να διαφοροποιούνται στους δύο κύριους κυτταρικούς τύπους του νευρικού ιστού που είναι τα αστροκύτταρα και οι νευρώνες. Οι δύο αυτές ιδιότητες (αυτό-ανανέωση και πολλαπλό δυναμικό διαφοροποίησης) χαρακτηρίζουν και στοιχειοθετούν την ύπαρξη καρκινικών βλαστικών κυττάρων, μετά την ενσωμάτωση νέων HERV-K10 αντιγράφων στο γένωμα.

Η παραγωγή καρκινικών βλαστικών κυττάρων ως συνέπεια της ρετρομετάθεσης σε κύτταρα U-87, οδήγησε σε ενίσχυση του ογκογενετικού και μεταστατικού τους δυναμικού. Οι παρατηρήσεις αυτές σημειώθηκαν και σε κύτταρα U373-θετικά ρετρομετάθεσης, παρόλο που αυτά δεν σχημάτισαν νευρόσφαιρες. Πιθανός όμως το γεγονός ότι υπερέκφραζαν το αντιγονικό επίτοπο CD44, ο οποίος σε ανθρώπινα γλοιώματα ενοχοποιείται για την ενίσχυση της ογκογενετικότητας και μεταναστευτικότητας, να δικαιολογεί αυτό μας το αποτέλεσμα.

Όσον αφορά το τρίτο σκέλος του σκοπού της διδακτορικής αυτής διατριβής, αποδείξαμε ότι η ρετρομετάθεση του προιού HERV-K10 και η επαγόμενη από αυτήν κυτταρική διαφοροποίηση σε γλοιωματικά κύτταρα, υπόκεινται σε μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισής τους. Πιο ειδικά, η επίδραση κυττάρων U-373 και U-87 (χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι με χαμηλή ρετρομετάθεση ως κυτταρικά συστήματα μελέτης) με παράγοντες επιγενετικής δράσης, όπως ο αναστολέας των ιστονικών από-ακετυλασών, βαλπροϊκό οξύ ή ο απο-μεθυλιωτικός παράγοντας 5-αζακυτιδίνη, επήγαγαν την συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10. Η επαγόμενη από βαλπροϊκό οξύ ή 5-αζακυτιδίνη ρετρομετάθεση επέφερε κυτταρική διαφοροποίηση στα υπό-μελέτη κυτταρικά συστήματα που στοιχειοθετήθηκε σε επίπεδο φαινότυπου αλλά και μοριακά με την

ταυτοποίηση των δεικτών διαφοροποίησης GFAP και β III-τουμπουλίνης. Επιπλέον, τα κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με βαλπροϊκό οξύ ή 5-αζακυτιδίνη διαπιστώθηκε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού τους κύκλου, σε διαφορετικά για κάθε περίπτωση ουσίας σημεία ελέγχου.

Τέλος, γνωρίζοντας ότι η αντίστροφη μεταγραφή αποτελεί ένα θεμελιώδους σημασίας στάδιο της διαδικασίας ρετρομετάθεσης, θελήσαμε να διερευνήσουμε της επιπτώσεις της αναστολής της στην ρετρομετάθεση και την επαγόμενη από ρετρομετάθεση κυτταρική διαφοροποίηση. Προς αυτή την κατεύθυνση, κύτταρα U-373 και U-87 τα οποία προεπώαστηκαν με τον αναστολέα των ενδογενών αντίστροφων μεταγραφασών Efavirenz, εκτέθηκαν εκ νέου στον ακετυλιωτικό παράγοντα βαλπροϊκό οξύ. Διαπιστώσαμε ότι η ανασταλτική δράση του Efavirenz στην επαγόμενη από βαλπροϊκό οξύ ρετρομετάθεση, απέτρεψε και την συντελούμενη από ρετρομετάθεση κυτταρική διαφοροποίηση στα υπό μελέτη κυτταρικά συστήματα.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη παρέχει για πρώτη φορά αξιόπιστη πειραματική μαρτυρία που συσχετίζει μερικά από τα κυριότερα κυτταρικά φαινόμενα που απαντώνται στους ανθρώπινους γλοιωματικούς όγκους όπως είναι η έντονη φαινοτυπική ετερογένεια, οι διαταραχές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ογκογενετικότητα και μεταστατικότητα, με το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης. Επιπλέον, αναδεικνύεται ότι η ρύθμιση της ρετρομετάθεσης είτε μέσω επιγενετικών μηχανισμών είτε μέσω αναστολής της αντίστροφης μεταγραφής, μπορεί να επηρεάσει την πορεία διαφοροποίησης των γλοιωματικών κυττάρων, ένα στάδιο που από πολλές μελέτες θεωρείται καθοριστικής σημασίας για την έναρξη και εξέλιξη των ενδοκρανιακών όγκων.

STUDY ON THE REGULATORY MECHANISM OF RETROTRANSPOSITION IN HUMAN NEUROGLIAL CELLS

Foteini Gkartziou

ABSTRACT

Retrotransposons are interspersed, moderately repetitive DNA sequences of prokaryotic and eukaryotic genomes, while in humans account for almost half of the genome. The last decades, they attract more and more intensely the scientific interest thanks to their ability to transpose, integrating randomly new copies of themselves into new genomic loci. In that way, they are able to reshuffle the genome and alter gene expression. Among these elements are Human Endogenous Retroviruses (HERVs) which comprise almost 8% of the human genome and have structural homology to exogenous retroviruses. These elements probably arose from reverse transcriptase-mediated integration into the germ line of progenitors of *Homo sapiens* after exogenous retroviral infection. Many of the HERV sequences in the human genome are incomplete, although some full-length proviral genomic sequences have been identified. Some of these proviruses contain long open reading frames capable of encoding complete viral proteins and producing viral particles. The tissue-specific expression of HERVs has been associated with a number of chronic human diseases, including multiple sclerosis, diabetes, autoimmune arthritis and some types of cancer.

Human gliomas represent the largest group of intracranial tumors. Gliomas display high degree of phenotypic, genetic, epigenetic, proliferative, metastatic, tumorigenic and resistance heterogeneity. Some of these characteristics are attributed to Cancer Stem Cells (CSCs). CSCs enrichment may derive either from an increased symmetric self-renewal division rate of CSCs or a reprogramming of non-CSCs to CSCs and conferring phenotypic plasticity to the tumor population. CSCs are the ultimate survivors and will exploit and subvert the cellular machinery to achieve that goal, by proliferation, dedifferentiation, and even transdifferentiation.

Aim of the present dissertation was to investigate three crucial questions, whether: **1.** retrotransposition events occur in human glioma cells, **2.** the outcome of retrotransposition is associated with major cellular events, commonly characterizing the human gliomas, such as phenotypic heterogeneity, cell proliferation disturbances, tumorigenicity and metastasis, and **3.** retrotransposition in human gliomas is under epigenetic or other regulation mechanisms.

The first part of that question was approached through transfection of the non-autonomous, LTR-retrotransposon HERV-K10 in human U-373 and U-87 glioma cell lines, which produced high retrotransposition frequencies in both cell lines. Indeed, in U-87 cells higher retrotransposition frequencies were detected, up to 25%, indicating that human glioma cells represent a favorable environment for retrotransposition occurrence.

With regard to the second part of this study's aim, we showed that: a. HERV-K10 retrotransposition in U-373 glioma cells is correlated with astrocytic differentiation; b. the production of higher retrotransposition frequencies in U-87 cells is correlated with glioma cells transdifferentiation/reprogramming into a neuronal phenotype. These findings were confirmed on the basis of phenotypic changes through morphological examination of the resultant phenotype and molecular identification of specific astrocytic (GFAP-positive

cells) and neuronal (β III-tubulin) differentiation markers in both cell lines. On that direction, we also found that retrotransposition-positive cells exhibited lower proliferative rates compared to parental cells, a finding which further confirms the end-point of cell differentiation process. These low proliferative rates were accompanied by extended cell cycle disturbances in both cell lines in addition to hyperploidy (tetraploidy) development in U-87 cells. Finally, the induction of retrotransposition frequency by the differentiation factor retinoic acid, provides another strong support to our hypothesis that retrotransposition is correlated to glioma cells differentiation.

In keeping with this part of our study's aim, we showed that in the case of U-87 cells, retrotransposition-induced trans-differentiation from astroglial to a neuronal phenotype took place through de-differentiation into an intermediate progenitor/stem cell stage. In particular, retrotransposition-positive U-87 cells were able to form a large number of robust neurospheres under low-binding growth condition, which expressed the stem cell markers nestin, Sox2, Oct-4 and CD133. These neurospheres were found to be strongly positive for retrotransposition (up to 80%) and also were able to renew and differentiate into the two main lineages (astrocytes and neurons) of the nervous tissue when cultured under normal binding growth conditions. The properties of renewal and differentiation unambiguously support cancer stem cells formation.

The formation of retrotransposition-induced cancer stem cells was characterized by an *in vitro* increased tumorigenic and metastatic potential. These results were also observed in the case of U-373 retrotransposition-positive cells, although these particular cells did not produce cancer stem cells. Probably, overexpression of CD44, a marker implicated in increased tumorigenicity and metastasis of gliomas, justifies that outcome of retrotransposition-positive U-373 cells.

With regard to the third part of this study's aim, we have shown that retrotransposition-induced differentiation of glioma cells is under epigenetic regulation mechanisms. Specifically, treatment of U-373 and U-87 cells with drugs exerting epigenetic activity such as the histone deacetylase inhibitor, valproic acid or DNA methyltransferase inhibitor, *5'-aza-2-deoxycytidine*, induced retrotransposition. VPA- or 5-aza-induced retrotransposition was correlated with glioma cells differentiation that was confirmed at the basis of phenotypical examination and verified with astrocytic (GFAP) and neuronal (β II-tubulin) differentiation markers expression. Moreover, VPA- or 5-aza-treated cells exhibited a dose-dependent cell cycle arrest in different, for each drug, checkpoints.

Finally, knowing that reverse transcription is a fundamental stage of retrotransposition, we investigated the outcome of reverse transcription inhibition in retrotransposition and retrotransposition-induced glioma cells differentiation. In that direction, U-373 and U-87 cells pre-treated with the reverse transcriptase inhibitor, efavirentz, were re-exposed to valproic acid. We discovered that both VPA-induced retrotransposition and retrotransposition-induced differentiation in treated cells were inhibited by efavirentz.

Conclusively, the present study provides, for the first time, experimental evidence correlating major cellular events characterizing human gliomas, such as phenotypical heterogeneity, cell proliferation disturbances, tumorigenicity and metastasis with the phenomenon of HERV-K10 provirus retrotransposition. Additionally, it highlights that the regulation of retrotransposition through epigenetic mechanisms or reverse transcription inhibition, may influence the direction of glioma cells differentiation, which is considered to be a very important stage of brain tumors initiation and progression.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ravindran S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Dec 11;109(50):20198-9. PubMed PMID: 23236127. Pubmed Central PMCID: 3528533.
2. Doolittle WF, Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 1980 Apr 17;284(5757):601-3. PubMed PMID: 6245369.
3. Biemont C, Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 2006 Oct 5;443(7111):521-4. PubMed PMID: 17024082.
4. Smit AF. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Current opinion in genetics & development*. 1999 Dec;9(6):657-63. PubMed PMID: 10607616.
5. Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annual review of cell biology*. 1992;8:275-306. PubMed PMID: 1282352.
6. Goodier JL, Kazazian HH, Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):23-35. PubMed PMID: 18854152.
7. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. PubMed PMID: 11237011.
8. Griffiths DJ. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome biology*. 2001;2(6):REVIEWS1017. PubMed PMID: 11423012. Pubmed Central PMCID: 138943.
9. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*. 2001;35:501-38. PubMed PMID: 11700292.
10. Babushok DV, Kazazian HH, Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Human mutation*. 2007 Jun;28(6):527-39. PubMed PMID: 17309057.
11. Nigumann P, Redik K, Matlik K, Speek M. Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics*. 2002 May;79(5):628-34. PubMed PMID: 11991712.
12. Martin SL. The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(1):45621. PubMed PMID: 16877816. Pubmed Central PMCID: 1510943.
13. Alisch RS, Garcia-Perez JL, Muotri AR, Gage FH, Moran JV. Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes & development*. 2006 Jan 15;20(2):210-24. PubMed PMID: 16418485. Pubmed Central PMCID: 1356112.
14. Ostertag EM, Madison BB, Kano H. Mutagenesis in rodents using the L1 retrotransposon. *Genome biology*. 2007;8 Suppl 1:S16. PubMed PMID: 18047693. Pubmed Central PMCID: 2106842.
15. Hagan CR, Rudin CM. Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy: potential clinical implications. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice*. 2002;2(1):25-35. PubMed PMID: 12083952.
16. Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, Ichiyanagi K, Adachi N, Koyama H, et al. Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS genetics*. 2009 Apr;5(4):e1000461. PubMed PMID: 19390601. Pubmed Central PMCID: 2666801.

17. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Jr., Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):905-16. PubMed PMID: 8945517.
18. Kazazian HH, Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1626-32. PubMed PMID: 15016989.
19. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HH, Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current opinion in genetics & development*. 2003 Dec;13(6):651-8. PubMed PMID: 14638329.
20. Versteeg R, van Schaik BD, van Batenburg MF, Roos M, Monajemi R, Caron H, et al. The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome research*. 2003 Sep;13(9):1998-2004. PubMed PMID: 12915492. Pubmed Central PMCID: 403669.
21. Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *American journal of human genetics*. 2003 Dec;73(6):1444-51. PubMed PMID: 14628287. Pubmed Central PMCID: 1180407.
22. Bock M, Stoye JP. Endogenous retroviruses and the human germline. *Current opinion in genetics & development*. 2000 Dec;10(6):651-5. PubMed PMID: 11088016.
23. Pelisson A, Mejlumian L, Robert V, Terzian C, Bucheton A. Drosophila germline invasion by the endogenous retrovirus gypsy: involvement of the viral env gene. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2002 Oct;32(10):1249-56. PubMed PMID: 12225916.
24. Havecker ER, Gao X, Voytas DF. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome biology*. 2004;5(6):225. PubMed PMID: 15186483. Pubmed Central PMCID: 463057.
25. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol*. 1986 Nov;60(2):589-98. PubMed PMID: 3021993. Pubmed Central PMCID: 288930. Epub 1986/11/01. eng.
26. Kim HS. Genomic impact, chromosomal distribution and transcriptional regulation of HERV elements. *Molecules and cells*. 2012 Jun;33(6):539-44. PubMed PMID: 22562360. Pubmed Central PMCID: 3887755.
27. Heidmann T, Heidmann O, Nicolas JF. An indicator gene to demonstrate intracellular transposition of defective retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Apr;85(7):2219-23. PubMed PMID: 2832848. Pubmed Central PMCID: 279961.
28. Curcio MJ, Lutz S, Lesage P. The Ty1 LTR-Retrotransposon of Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology spectrum*. 2015 Apr;3(2):MDNA3-0053-2014. PubMed PMID: 26104690.
29. Volff JN. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2006 Sep;28(9):913-22. PubMed PMID: 16937363.
30. Schauer G, Leuba S, Sluis-Cremer N. Biophysical Insights into the Inhibitory Mechanism of Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *Biomolecules*. 2013;3(4):889-904. PubMed PMID: 24970195. Pubmed Central PMCID: 4030976.
31. Kazazian HH, Jr., Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*. 1988 Mar 10;332(6160):164-6. PubMed PMID: 2831458.

32. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Molecular genetics and metabolism*. 1999 Jul;67(3):183-93. PubMed PMID: 10381326.
33. Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Ferec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Human genetics*. 2005 Sep;117(5):411-27. PubMed PMID: 15983781.
34. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome research*. 2008 Mar;18(3):343-58. PubMed PMID: 18256243.
35. Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, et al. Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer research*. 1992 Feb 1;52(3):643-5. PubMed PMID: 1310068.
36. Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, et al. Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of clinical investigation*. 1993 May;91(5):1862-7. PubMed PMID: 8387534. Pubmed Central PMCID: 288178.
37. Kazazian HH, Jr., Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nature genetics*. 1998 May;19(1):19-24. PubMed PMID: 9590283.
38. Otowa T, Tochigi M, Rogers M, Umekage T, Kato N, Sasaki T. Insertional polymorphism of endogenous retrovirus HERV-K115 in schizophrenia. *Neuroscience letters*. 2006 Nov 20;408(3):226-9. PubMed PMID: 17000049.
39. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*. 1998 Jul 23;394(6691):388-92. PubMed PMID: 9690476.
40. Hassoun H, Coetzer TL, Vassiliadis JN, Sahr KE, Maalouf GJ, Saad ST, et al. A novel mobile element inserted in the alpha spectrin gene: spectrin dayton. A truncated alpha spectrin associated with hereditary elliptocytosis. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Aug;94(2):643-8. PubMed PMID: 8040317. Pubmed Central PMCID: 296141.
41. Wallace MR, Andersen LB, Saulino AM, Gregory PE, Glover TW, Collins FS. A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature*. 1991 Oct 31;353(6347):864-6. PubMed PMID: 1719426.
42. Muratani K, Hada T, Yamamoto Y, Kaneko T, Shigeto Y, Ohue T, et al. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991 Dec 15;88(24):11315-9. PubMed PMID: 1662391. Pubmed Central PMCID: 53125.
43. Vidaud D, Vidaud M, Bahnak BR, Siguret V, Gispert Sanchez S, Laurian Y, et al. Haemophilia B due to a de novo insertion of a human-specific Alu subfamily member within the coding region of the factor IX gene. *European journal of human genetics : EJHG*. 1993;1(1):30-6. PubMed PMID: 8069649.
44. Janicic N, Pausova Z, Cole DE, Hendy GN. Insertion of an Alu sequence in the Ca(2+)-sensing receptor gene in familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *American journal of human genetics*. 1995 Apr;56(4):880-6. PubMed PMID: 7717399. Pubmed Central PMCID: 1801194.
45. Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T, Nakamura Y. Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nature genetics*. 1996 Jun;13(2):245-7. PubMed PMID: 8640237.

46. Halling KC, Lazzaro CR, Honchel R, Bufill JA, Powell SM, Arndt CA, et al. Hereditary desmoid disease in a family with a germline Alu I repeat mutation of the APC gene. *Human heredity*. 1999 Mar;49(2):97-102. PubMed PMID: 10077730.
47. Jo EK, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Song CH, Park JK, et al. Identification of mutations in the Bruton's tyrosine kinase gene, including a novel genomic rearrangements resulting in large deletion, in Korean X-linked agammaglobulinemia patients. *Journal of human genetics*. 2003;48(6):322-6. PubMed PMID: 12768435.
48. Lebet T, Chiles R, Hsu AP, Mansfield ES, Warrington JA, Puck JM. Mutations causing severe combined immunodeficiency: detection with a custom resequencing microarray. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2008 Aug;10(8):575-85. PubMed PMID: 18641513.
49. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, et al. Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1. *Human molecular genetics*. 1997 Dec;6(13):2247-55. PubMed PMID: 9361030.
50. Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SR, et al. De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *American journal of human genetics*. 1999 Feb;64(2):446-61. PubMed PMID: 9973282. Pubmed Central PMCID: 1377754.
51. Goldberg YP, Rommens JM, Andrew SE, Hutchinson GB, Lin B, Theilmann J, et al. Identification of an Alu retrotransposition event in close proximity to a strong candidate gene for Huntington's disease. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):370-3. PubMed PMID: 8384324.
52. Zhang Y, Dipple KM, Vilain E, Huang BL, Finlayson G, Therrell BL, et al. AluY insertion (IVS4-52ins316alu) in the glycerol kinase gene from an individual with benign glycerol kinase deficiency. *Human mutation*. 2000;15(4):316-23. PubMed PMID: 10737976.
53. Callinan PA, Batzer MA. Retrotransposable elements and human disease. *Genome dynamics*. 2006;1:104-15. PubMed PMID: 18724056.
54. Goodier JL, Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition. *Human molecular genetics*. 2000 Mar 1;9(4):653-7. PubMed PMID: 10699189.
55. Kazazian HH, Jr. An estimated frequency of endogenous insertional mutations in humans. *Nature genetics*. 1999 Jun;22(2):130. PubMed PMID: 10369250.
56. Xing J, Zhang Y, Han K, Salem AH, Sen SK, Huff CD, et al. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome research*. 2009 Sep;19(9):1516-26. PubMed PMID: 19439515. Pubmed Central PMCID: 2752133.
57. Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A, Eichler EE. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Jun 6;97(12):6634-9. PubMed PMID: 10841562. Pubmed Central PMCID: 18684.
58. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *Journal of molecular biology*. 2006 Apr 14;357(5):1383-93. PubMed PMID: 16490214. Pubmed Central PMCID: 4136747.
59. Morrish TA, Garcia-Perez JL, Stamato TD, Taccioli GE, Sekiguchi J, Moran JV. Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature*. 2007 Mar 8;446(7132):208-12. PubMed PMID: 17344853.

60. Gladyshev EA, Arkhipova IR. Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 May 29;104(22):9352-7. PubMed PMID: 17483479. Pubmed Central PMCID: 1890498.
61. Sen SK, Huang CT, Han K, Batzer MA. Endonuclease-independent insertion provides an alternative pathway for L1 retrotransposition in the human genome. *Nucleic acids research*. 2007;35(11):3741-51. PubMed PMID: 17517773. Pubmed Central PMCID: 1920257.
62. Srikanta D, Sen SK, Huang CT, Conlin EM, Rhodes RM, Batzer MA. An alternative pathway for Alu retrotransposition suggests a role in DNA double-strand break repair. *Genomics*. 2009 Mar;93(3):205-12. PubMed PMID: 18951971. Pubmed Central PMCID: 2672417.
63. Jurka J, Pethiyagoda C. Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *Journal of molecular evolution*. 1995 Feb;40(2):120-6. PubMed PMID: 7699718.
64. Kelkar YD, Tyekucheva S, Chiaromonte F, Makova KD. The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. *Genome research*. 2008 Jan;18(1):30-8. PubMed PMID: 18032720. Pubmed Central PMCID: 2134767.
65. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002 Aug 9;110(3):315-25. PubMed PMID: 12176319.
66. Mine M, Chen JM, Brivet M, Desguerre I, Marchant D, de Lonlay P, et al. A large genomic deletion in the PDHX gene caused by the retrotranspositional insertion of a full-length LINE-1 element. *Human mutation*. 2007 Feb;28(2):137-42. PubMed PMID: 17152059.
67. Gebow D, Miselis N, Liber HL. Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Molecular and cellular biology*. 2000 Jun;20(11):4028-35. PubMed PMID: 10805745. Pubmed Central PMCID: 85773.
68. Hancks DC, Ewing AD, Chen JE, Tokunaga K, Kazazian HH, Jr. Exon-trapping mediated by the human retrotransposon SVA. *Genome research*. 2009 Nov;19(11):1983-91. PubMed PMID: 19635844. Pubmed Central PMCID: 2775590.
69. Damert A, Raiz J, Horn AV, Lower J, Wang H, Xing J, et al. 5'-Transducing SVA retrotransposon groups spread efficiently throughout the human genome. *Genome research*. 2009 Nov;19(11):1992-2008. PubMed PMID: 19652014. Pubmed Central PMCID: 2775593.
70. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. *Nucleic acids research*. 2006;34(5):1512-21. PubMed PMID: 16554555. Pubmed Central PMCID: 1415225.
71. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger P. The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene*. 2008 Mar 31;411(1-2):38-45. PubMed PMID: 18261861. Pubmed Central PMCID: 2278003.
72. Perepelitsa-Belancio V, Deininger P. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nature genetics*. 2003 Dec;35(4):363-6. PubMed PMID: 14625551.
73. Chen C, Ara T, Gautheret D. Using Alu elements as polyadenylation sites: A case of retroposon exaptation. *Molecular biology and evolution*. 2009 Feb;26(2):327-34. PubMed PMID: 18984903.

74. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes & development*. 1992 Aug;6(8):1457-65. PubMed PMID: 1379564.
75. Ling J, Pi W, Bollag R, Zeng S, Keskinetepe M, Saliman H, et al. The solitary long terminal repeats of ERV-9 endogenous retrovirus are conserved during primate evolution and possess enhancer activities in embryonic and hematopoietic cells. *Journal of virology*. 2002 Mar;76(5):2410-23. PubMed PMID: 11836419. Pubmed Central PMCID: 153808.
76. Shankar R, Grover D, Brahmachari SK, Mukerji M. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements. *BMC evolutionary biology*. 2004 Oct 4;4:37. PubMed PMID: 15461819. Pubmed Central PMCID: 524483.
77. Polak P, Domany E. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. *BMC genomics*. 2006;7:133. PubMed PMID: 16740159. Pubmed Central PMCID: 1513395.
78. van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends in genetics : TIG*. 2003 Oct;19(10):530-6. PubMed PMID: 14550626.
79. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jan 19;276(3):1896-903. PubMed PMID: 11054415.
80. Landry JR, Rouhi A, Medstrand P, Mager DL. The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Molecular biology and evolution*. 2002 Nov;19(11):1934-42. PubMed PMID: 12411602.
81. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Molecular and cellular biology*. 2001 Mar;21(6):1973-85. PubMed PMID: 11238933. Pubmed Central PMCID: 86790.
82. Kim DD, Kim TT, Walsh T, Kobayashi Y, Matisse TC, Buyske S, et al. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome research*. 2004 Sep;14(9):1719-25. PubMed PMID: 15342557. Pubmed Central PMCID: 515317.
83. Athanasiadis A, Rich A, Maas S. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS biology*. 2004 Dec;2(12):e391. PubMed PMID: 15534692. Pubmed Central PMCID: 526178.
84. Chen LL, DeCerbo JN, Carmichael GG. Alu element-mediated gene silencing. *The EMBO journal*. 2008 Jun 18;27(12):1694-705. PubMed PMID: 18497743. Pubmed Central PMCID: 2435129.
85. Ichihyanagi K. Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs. *Genes & genetic systems*. 2013;88(1):19-29. PubMed PMID: 23676707.
86. Estecio MR, Gallegos J, Dekmezian M, Lu Y, Liang S, Issa JP. SINE retrotransposons cause epigenetic reprogramming of adjacent gene promoters. *Molecular cancer research : MCR*. 2012 Oct;10(10):1332-42. PubMed PMID: 22952045. Pubmed Central PMCID: 3475755.
87. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews Genetics*. 2009 Oct;10(10):691-703. PubMed PMID: 19763152. Pubmed Central PMCID: 2884099.
88. Harris JM, McIntosh EM, Muscat GE. Structure/function analysis of a dUTPase: catalytic mechanism of a potential chemotherapeutic target. *Journal of molecular biology*. 1999 Apr 30;288(2):275-87. PubMed PMID: 10329142.

89. Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A, Kramer K, Best B, Buck M, et al. Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS research and human retroviruses*. 1993 Apr;9(4):343-50. PubMed PMID: 8512750.
90. Kitamura Y, Ayukawa T, Ishikawa T, Kanda T, Yoshiike K. Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *Journal of virology*. 1996 May;70(5):3302-6. PubMed PMID: 8627815. Pubmed Central PMCID: 190198.
91. Berkhout B, Jebbink M, Zsiros J. Identification of an active reverse transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *Journal of virology*. 1999 Mar;73(3):2365-75. PubMed PMID: 9971820. Pubmed Central PMCID: 104482.
92. Ruebner M, Strissel PL, Langbein M, Fahlbusch F, Wachter DL, Faschingbauer F, et al. Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes. *Journal of molecular medicine*. 2010 Nov;88(11):1143-56. PubMed PMID: 20664994.
93. Schulte AM, Lai S, Kurtz A, Czubyko F, Riegel AT, Wellstein A. Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Dec 10;93(25):14759-64. PubMed PMID: 8962128. Pubmed Central PMCID: 26209.
94. Ponferrada VG, Mauck BS, Wooley DP. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Archives of virology*. 2003 Apr;148(4):659-75. PubMed PMID: 12664292.
95. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews Genetics*. 2008 Jun;9(6):465-76. PubMed PMID: 18463664.
96. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *The Journal of biological chemistry*. 2011 May 27;286(21):18347-53. PubMed PMID: 21454628. Pubmed Central PMCID: 3099650.
97. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics : TIG*. 1997 Aug;13(8):335-40. PubMed PMID: 9260521.
98. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature reviews Genetics*. 2007 Apr;8(4):272-85. PubMed PMID: 17363976.
99. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;310:211-50. PubMed PMID: 16909913.
100. Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human molecular genetics*. 2007 Oct 1;16(19):2272-80. PubMed PMID: 17616512.
101. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004 Sep 2;431(7004):96-9. PubMed PMID: 15318244.
102. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature genetics*. 1998 Oct;20(2):116-7. PubMed PMID: 9771701.
103. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):247-57. PubMed PMID: 10555141.

104. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology*. 2004 Nov;11(11):1068-75. PubMed PMID: 15467727.
105. Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, Khazaeli MB, LoBuglio AF, Shaw DR, et al. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001 Jun;7(6):1553-60. PubMed PMID: 11410490.
106. Menendez L, Benigno BB, McDonald JF. L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas. *Molecular cancer*. 2004 Apr 26;3:12. PubMed PMID: 15109395. Pubmed Central PMCID: 411053.
107. Patzke S, Lindeskog M, Munthe E, Aasheim HC. Characterization of a novel human endogenous retrovirus, HERV-H/F, expressed in human leukemia cell lines. *Virology*. 2002 Nov 10;303(1):164-73. PubMed PMID: 12482668.
108. Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *British journal of cancer*. 1999 Jul;80(9):1312-21. PubMed PMID: 10424731. Pubmed Central PMCID: 2363067.
109. Lower R, Lower J, Frank H, Harzmann R, Kurth R. Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *The Journal of general virology*. 1984 May;65 (Pt 5):887-98. PubMed PMID: 6202829.
110. Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, et al. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer research*. 2003 Dec 15;63(24):8735-41. PubMed PMID: 14695188.
111. Alves PM, Levy N, Stevenson BJ, Bouzourene H, Theiler G, Bricard G, et al. Identification of tumor-associated antigens by large-scale analysis of genes expressed in human colorectal cancer. *Cancer immunity*. 2008;8:11. PubMed PMID: 18581998. Pubmed Central PMCID: 2935784.
112. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, Ronchetti D, Mosca L, Delilieri GL, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis*. 2009 Aug;30(8):1330-5. PubMed PMID: 19531770.
113. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate L, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 2005 Nov 3;24(48):7213-23. PubMed PMID: 16170379.
114. Fabris S, Bollati V, Agnelli L, Morabito F, Motta V, Cutrona G, et al. Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*. 2011 Feb;6(2):188-94. PubMed PMID: 20930513. Pubmed Central PMCID: 3775884.
115. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet*. 2010 Apr;11(4):285-96. PubMed PMID: 20300089. Pubmed Central PMCID: 3760772.
116. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705. PubMed PMID: 17320507.
117. Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 16;107(7):2926-31. PubMed PMID: 20133639. Pubmed Central PMCID: 2814872.
118. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011 Mar;21(3):381-95. PubMed PMID: 21321607. Pubmed Central PMCID: 3193420.

119. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 2002 Sep 26;419(6905):407-11. PubMed PMID: 12353038.
120. Gendrel AV, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen RA. Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1871-3. PubMed PMID: 12077425.
121. Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, et al. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *The EMBO journal*. 2005 Feb 23;24(4):800-12. PubMed PMID: 15678104. Pubmed Central PMCID: 549616.
122. Kondo Y, Issa JP. Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at Alu repeats in human cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Jul 25;278(30):27658-62. PubMed PMID: 12724318.
123. Montoya-Durango DE, Liu Y, Teneng I, Kalbfleisch T, Lacy ME, Steffen MC, et al. Epigenetic control of mammalian LINE-1 retrotransposon by retinoblastoma proteins. *Mutation research*. 2009 Jun 1;665(1-2):20-8. PubMed PMID: 19427507. Pubmed Central PMCID: 3418809.
124. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011 Apr;12(4):246-58. PubMed PMID: 21427766.
125. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & development*. 2008 Apr 1;22(7):908-17. PubMed PMID: 18381894. Pubmed Central PMCID: 2279202.
126. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Molecular cell*. 2008 Sep 26;31(6):785-99. PubMed PMID: 18922463. Pubmed Central PMCID: 2730041.
127. Klattenhoff C, Bratu DP, McGinnis-Schultz N, Koppetsch BS, Cook HA, Theurkauf WE. *Drosophila* rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response. *Developmental cell*. 2007 Jan;12(1):45-55. PubMed PMID: 17199040.
128. Ross RJ, Weiner MM, Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):353-9. PubMed PMID: 24429634. Pubmed Central PMCID: 4265809.
129. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009 Dec 11;139(6):1069-83. PubMed PMID: 19962179. Pubmed Central PMCID: 2812435.
130. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006 Jul 13;442(7099):199-202. PubMed PMID: 16751776.
131. Moyano M, Stefani G. piRNA involvement in genome stability and human cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2015;8:38. PubMed PMID: 25895683. Pubmed Central PMCID: 4412036.
132. Guo H, Chitiprolu M, Gagnon D, Meng L, Perez-Iratxeta C, Lagace D, et al. Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nature communications*. 2014;5:5276. PubMed PMID: 25366815.

133. Arias JF, Koyama T, Kinomoto M, Tokunaga K. Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:275. PubMed PMID: 22912627. Pubmed Central PMCID: 3418512.
134. Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature reviews Genetics*. 2011 Sep;12(9):615-27. PubMed PMID: 21850042. Pubmed Central PMCID: 3192332.
135. Larsson E, Kato N, Cohen M. Human endogenous proviruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 1989;148:115-32. PubMed PMID: 2684548.
136. Andersson ML, Lindeskog M, Medstrand P, Westley B, May F, Blomberg J. Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *The Journal of general virology*. 1999 Jan;80 (Pt 1):255-60. PubMed PMID: 9934709.
137. Medstrand P, Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *Journal of virology*. 1993 Nov;67(11):6778-87. PubMed PMID: 7692084. Pubmed Central PMCID: 238119.
138. Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2011;8:90. PubMed PMID: 22067224. Pubmed Central PMCID: 3228705.
139. Callahan R, Chiu IM, Wong JF, Tronick SR, Roe BA, Aaronson SA, et al. A new class of endogenous human retroviral genomes. *Science*. 1985 Jun 7;228(4704):1208-11. PubMed PMID: 2408338.
140. Franklin GC, Chretien S, Hanson IM, Rochefort H, May FE, Westley BR. Expression of human sequences related to those of mouse mammary tumor virus. *Journal of virology*. 1988 Apr;62(4):1203-10. PubMed PMID: 2831381. Pubmed Central PMCID: 253128.
141. Mayer J, Sauter M, Racz A, Scherer D, Mueller-Lantzsch N, Meese E. An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nature genetics*. 1999 Mar;21(3):257-8. PubMed PMID: 10080172.
142. Medstrand P, Mager DL. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *Journal of virology*. 1998 Dec;72(12):9782-7. PubMed PMID: 9811713. Pubmed Central PMCID: 110489.
143. Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Current biology : CB*. 2001 Oct 2;11(19):1531-5. PubMed PMID: 11591322.
144. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14572-9. PubMed PMID: 15310846. Pubmed Central PMCID: 521986.
145. Lower R, Lower J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 May 28;93(11):5177-84. PubMed PMID: 8643549. Pubmed Central PMCID: 39218.
146. Tonjes RR, Lower R, Boller K, Denner J, Hasenmaier B, Kirsch H, et al. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1996;13 Suppl 1:S261-7. PubMed PMID: 8797733.

147. Depil S, Roche C, Dussart P, Prin L. Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. *Leukemia*. 2002 Feb;16(2):254-9. PubMed PMID: 11840292.
148. Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL. Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene*. 2003 Mar 13;22(10):1528-35. PubMed PMID: 12629516.
149. Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer research*. 2005 May 15;65(10):4172-80. PubMed PMID: 15899808.
150. Wang-Johanning F, Liu J, Rycaj K, Huang M, Tsai K, Rosen DG, et al. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *International journal of cancer*. 2007 Jan 1;120(1):81-90. PubMed PMID: 17013901.
151. Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 2008 Sep 25;59(6):932-46. PubMed PMID: 18817732. Pubmed Central PMCID: 3623689.
152. Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicologic pathology*. 2011 Jan;39(1):115-23. PubMed PMID: 21075920.
153. Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicologic pathology*. 2011 Jan;39(1):22-35. PubMed PMID: 21119051.
154. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010 Jan;119(1):7-35. PubMed PMID: 20012068. Pubmed Central PMCID: 2799634.
155. Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisen J. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*. 1999 Dec 15;253(2):733-6. PubMed PMID: 10585297.
156. Suh H, Deng W, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:253-75. PubMed PMID: 19575663.
157. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):703-16. PubMed PMID: 10380923.
158. Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 2006 Jan 20;494(3):415-34. PubMed PMID: 16320258.
159. Takizawa T, Meshorer E. Chromatin and nuclear architecture in the nervous system. *Trends Neurosci*. 2008 Jul;31(7):343-52. PubMed PMID: 18538423.
160. Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):903-10. PubMed PMID: 15959507.
161. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH, Jr., Boeke JD, Gabriel A. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*. 1991 Dec 20;254(5039):1808-10. PubMed PMID: 1722352.
162. Mehler MF. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2008 Dec 11;86(4):305-41. PubMed PMID: 18940229. Pubmed Central PMCID: 2636693.
163. Ma DK, Bonaguidi MA, Ming GL, Song H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res*. 2009 Jun;19(6):672-82. PubMed PMID: 19436263. Pubmed Central PMCID: 2738865.

164. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997 Jul 1;17(13):5046-61. PubMed PMID: 9185542.
165. Kokovay E, Shen Q, Temple S. The incredible elastic brain: how neural stem cells expand our minds. *Neuron.* 2008 Nov 6;60(3):420-9. PubMed PMID: 18995816.
166. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):289-300. PubMed PMID: 18786416. Pubmed Central PMCID: 2747473.
167. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):265-78. PubMed PMID: 18786414. Pubmed Central PMCID: 2613692.
168. Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell.* 2012 Jun 14;10(6):698-708. PubMed PMID: 22704510. Pubmed Central PMCID: 3726005.
169. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science.* 2006 Feb 3;311(5761):629-32. PubMed PMID: 16410488.
170. Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron.* 2011 Mar 10;69(5):893-905. PubMed PMID: 21382550. Pubmed Central PMCID: 3085909.
171. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965 Jun;124(3):319-35. PubMed PMID: 5861717.
172. Kaplan MS, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci.* 1984 Jun;4(6):1429-41. PubMed PMID: 6726341.
173. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 1993 Sep;56(2):337-44. PubMed PMID: 8247264.
174. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 2001 Sep 15;21(18):7153-60. PubMed PMID: 11549726.
175. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:149-84. PubMed PMID: 19555289. Pubmed Central PMCID: 3086722.
176. Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 2004 Oct 25;478(4):359-78. PubMed PMID: 15384070.
177. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):645-60. PubMed PMID: 18295581. Epub 2008/02/26. eng.
178. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci.* 2002 May;5(5):438-45. PubMed PMID: 11953752.
179. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 2002 May 2;417(6884):39-44. PubMed PMID: 11986659.

180. Lim DA, Alvarez-Buylla A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7526-31. PubMed PMID: 10377448. Pubmed Central PMCID: 22119.
181. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1370-5. PubMed PMID: 16251967.
182. Yuan HM, Li KL, Ni RJ, Guo WD, Shen Z, Yang CP, et al. A systemic proteomic analysis of *Populus* chloroplast by using shotgun method. *Mol Biol Rep*. 2011 Jun;38(5):3045-54. PubMed PMID: 20135232.
183. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):279-88. PubMed PMID: 18786415.
184. Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet*. 2004 Aug;36(8):827-35. PubMed PMID: 15258583.
185. Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, et al. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*. 2006 Mar;9(3):331-9. PubMed PMID: 16491078.
186. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000 Dec;28(3):713-26. PubMed PMID: 11163261.
187. Hamby ME, Coskun V, Sun YE. Transcriptional regulation of neuronal differentiation: the epigenetic layer of complexity. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Aug;1779(8):432-7. PubMed PMID: 18674649. Pubmed Central PMCID: 4211633.
188. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):396-8. PubMed PMID: 17522671.
189. Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):799-823. PubMed PMID: 17615389.
190. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007 May;8(5):355-67. PubMed PMID: 17453016.
191. Feng J, Fouse S, Fan G. Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res*. 2007 May;61(5 Pt 2):58R-63R. PubMed PMID: 17413844. Epub 2007/04/07. eng.
192. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006 Feb;31(2):89-97. PubMed PMID: 16403636. Epub 2006/01/13. eng.
193. Kondo T. Epigenetic alchemy for cell fate conversion. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Oct;16(5):502-7. PubMed PMID: 16844365.
194. Taniura H, Iijima S, Kambe Y, Georgiev D, Yoneda Y. Tex261 modulates the excitotoxic cell death induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 3;362(4):1096-100. PubMed PMID: 17803966.
195. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):553-60. PubMed PMID: 17603471. Pubmed Central PMCID: 2921165. Epub 2007/07/03. eng.
196. Kageyama R, Nakanishi S. Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 Oct;7(5):659-65. PubMed PMID: 9388783. Epub 1997/12/06. eng.

197. Azuara V. Profiling of DNA replication timing in unsynchronized cell populations. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2171-7. PubMed PMID: 17487209. Epub 2007/05/10. eng.
198. Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):263-71. PubMed PMID: 17363975. Epub 2007/03/17. eng.
199. Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso F, Sridharan R, Mason MJ, Heidersbach A, et al. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2009 Aug 13;460(7257):863-8. PubMed PMID: 19587682. Pubmed Central PMCID: 3891576. Epub 2009/07/10. eng.
200. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):315-26. PubMed PMID: 16630819. Epub 2006/04/25. eng.
201. Jorgensen HF, Azuara V, Amoils S, Spivakov M, Terry A, Nesterova T, et al. The impact of chromatin modifiers on the timing of locus replication in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol.* 2007;8(8):R169. PubMed PMID: 17705870. Pubmed Central PMCID: 2374999. Epub 2007/08/21. eng.
202. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002 Apr 30;12(9):735-9. PubMed PMID: 12007417.
203. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005 Feb 17;433(7027):769-73. PubMed PMID: 15685193.
204. Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, et al. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron.* 2007 Jul 19;55(2):201-15. PubMed PMID: 17640523. Pubmed Central PMCID: 2674110.
205. Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res.* 2005 Jun 10;306(2):343-8. PubMed PMID: 15925590.
206. Gilbert DM. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Jun;14(3):377-83. PubMed PMID: 12067662.
207. Schubeler D, Scalzo D, Kooperberg C, van Steensel B, Delrow J, Groudine M. Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet.* 2002 Nov;32(3):438-42. PubMed PMID: 12355067.
208. Jessberger S, Toni N, Clemenson GD, Jr., Ray J, Gage FH. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci.* 2008 Aug;11(8):888-93. PubMed PMID: 18587391. Pubmed Central PMCID: 2795354.
209. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jul;7(7):540-6. PubMed PMID: 16723974.
210. Lunyak VV, Rosenfeld MG. Epigenetic regulation of stem cell fate. *Hum Mol Genet.* 2008 Apr 15;17(R1):R28-36. PubMed PMID: 18632693.
211. Massirer KB, Carromeu C, Griesi-Oliveira K, Muotri AR. Maintenance and differentiation of neural stem cells. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine.* 2011 Jan-Feb;3(1):107-14. PubMed PMID: 21061307.
212. Mouse Genome Sequencing C, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002 Dec 5;420(6915):520-62. PubMed PMID: 12466850.

213. Branciforte D, Martin SL. Developmental and cell type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: implications for transposition. *Mol Cell Biol.* 1994 Apr;14(4):2584-92. PubMed PMID: 8139560. Pubmed Central PMCID: 358626.
214. Muotri AR, Gage FH. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature.* 2006 Jun 29;441(7097):1087-93. PubMed PMID: 16810244.
215. Rehen SK, Yung YC, McCreight MP, Kaushal D, Yang AH, Almeida BS, et al. Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2005 Mar 2;25(9):2176-80. PubMed PMID: 15745943.
216. Rehen SK, McConnell MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH, Chun J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001 Nov 6;98(23):13361-6. PubMed PMID: 11698687. Pubmed Central PMCID: 60876.
217. Bruder CE, Piotrowski A, Gijbsers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Stahl T, et al. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *American journal of human genetics.* 2008 Mar;82(3):763-71. PubMed PMID: 18304490. Pubmed Central PMCID: 2427204.
218. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Yeo GW, Mu Y, Lovci MT, et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature.* 2009 Aug 27;460(7259):1127-31. PubMed PMID: 19657334. Pubmed Central PMCID: 2909034.
219. Matlik K, Redik K, Speek M. L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2006;2006(1):71753. PubMed PMID: 16877819. Pubmed Central PMCID: 1559930.
220. Muotri AR, Zhao C, Marchetto MC, Gage FH. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus.* 2009 Oct;19(10):1002-7. PubMed PMID: 19771587. Pubmed Central PMCID: 2758700.
221. Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, et al. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nature neuroscience.* 2009 Sep;12(9):1097-105. PubMed PMID: 19701198. Pubmed Central PMCID: 2764260.
222. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 2002 Mar;61(3):215-25; discussion 26-9. PubMed PMID: 11895036.
223. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. PubMed PMID: 15758009.
224. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer.* 1985 Sep 1;56(5):1106-11. PubMed PMID: 2990664.
225. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell.* 2012 Jun 14;10(6):717-28. PubMed PMID: 22704512.
226. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):4793-807. PubMed PMID: 19064739.
227. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):314-22. PubMed PMID: 21248838.
228. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, et al. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice.

- Science. 2012 Nov 23;338(6110):1080-4. PubMed PMID: 23087000. Pubmed Central PMCID: 3595315.
229. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*. 2002 Apr;1(3):269-77. PubMed PMID: 12086863.
230. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108(11):4274-80. PubMed PMID: 21262804. Pubmed Central PMCID: 3060261.
231. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO reports*. 2014 Mar;15(3):244-53. PubMed PMID: 24531722. Pubmed Central PMCID: 3989690.
232. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 11;94(23):12425-30. PubMed PMID: 9356465. Pubmed Central PMCID: 24979.
233. Kania G, Corbeil D, Fuchs J, Tarasov KV, Blyszczuk P, Huttner WB, et al. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*. 2005 Jun-Jul;23(6):791-804. PubMed PMID: 15917475.
234. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):396-401. PubMed PMID: 15549107.
235. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):7011-21. PubMed PMID: 15466194.
236. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):275-84. PubMed PMID: 15803154.
237. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006;5:67. PubMed PMID: 17140455. Pubmed Central PMCID: 1697823.
238. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008 Oct 2;455(7213):627-32. PubMed PMID: 18754011.
239. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012 May 31;485(7400):593-8. PubMed PMID: 22522929. Pubmed Central PMCID: 3369107.
240. Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, et al. Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 23;110(17):7038-43. PubMed PMID: 23530235. Pubmed Central PMCID: 3637783.
241. Lu J, Bradley RA, Zhang SC. Turning reactive glia into functional neurons in the brain. *Cell Stem Cell*. 2014 Feb 6;14(2):133-4. PubMed PMID: 24506877. Pubmed Central PMCID: 4018986.
242. Gidekel Friedlander SY, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, et al. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*. 2009 Nov 6;16(5):379-89. PubMed PMID: 19878870. Pubmed Central PMCID: 3048064.

243. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010 Dec 9;468(7325):824-8. PubMed PMID: 21102434.
244. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):139-52. PubMed PMID: 23540695. Pubmed Central PMCID: 3638263.
245. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Aug;8(8):610-22. PubMed PMID: 17643088.
246. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1253-9. PubMed PMID: 17317837.
247. Maddodi N, Setaluri V. Prognostic significance of melanoma differentiation and trans-differentiation. *Cancers (Basel)*. 2010 Jun;2(2):989-99. PubMed PMID: 22545195. Pubmed Central PMCID: 3336875.
248. Reed JA, Finnerty B, Albino AP. Divergent cellular differentiation pathways during the invasive stage of cutaneous malignant melanoma progression. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):549-55. PubMed PMID: 10433947. Pubmed Central PMCID: 1866874.
249. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer*. 2007 Mar;43(5):935-46. PubMed PMID: 17320377.
250. Asciutti S, Akiri G, Grumolato L, Vijayakumar S, Aaronson SA. Diverse mechanisms of Wnt activation and effects of pathway inhibition on proliferation of human gastric carcinoma cells. *Oncogene*. 2011 Feb 24;30(8):956-66. PubMed PMID: 21042278. Pubmed Central PMCID: 3965355.
251. Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, Okita K, Noma H, Sawamura Y, et al. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 17;110(51):20569-74. PubMed PMID: 24259714. Pubmed Central PMCID: 3870695.
252. Ohnuki M, Tanabe K, Sutou K, Teramoto I, Sawamura Y, Narita M, et al. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 26;111(34):12426-31. PubMed PMID: 25097266. Pubmed Central PMCID: 4151758.
253. Wissing S, Munoz-Lopez M, Macia A, Yang Z, Montano M, Collins W, et al. Reprogramming somatic cells into iPS cells activates LINE-1 retroelement mobility. *Hum Mol Genet*. 2012 Jan 1;21(1):208-18. PubMed PMID: 21989055. Pubmed Central PMCID: 3235014.
254. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, et al. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol*. 2001 Apr;11(2):159-68. PubMed PMID: 11303791.
255. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001 Oct;22(10):1715-9. PubMed PMID: 11577014.
256. Waha A, Guntner S, Huang TH, Yan PS, Arslan B, Pietsch T, et al. Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas. *Neoplasia*. 2005 Mar;7(3):193-9. PubMed PMID: 15799819. Pubmed Central PMCID: 1501138.

257. Lindemann C, Hackmann O, Delic S, Schmidt N, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. SOCS3 promoter methylation is mutually exclusive to EGFR amplification in gliomas and promotes glioma cell invasion through STAT3 and FAK activation. *Acta Neuropathol.* 2011 Aug;122(2):241-51. PubMed PMID: 21590492.
258. Stone AR, Bobo W, Brat DJ, Devi NS, Van Meir EG, Vertino PM. Aberrant methylation and down-regulation of TMS1/ASC in human glioblastoma. *Am J Pathol.* 2004 Oct;165(4):1151-61. PubMed PMID: 15466382. Pubmed Central PMCID: 1618625.
259. Kosla K, Pluciennik E, Kurzyk A, Jesionek-Kupnicka D, Kordek R, Potemski P, et al. Molecular analysis of WWOX expression correlation with proliferation and apoptosis in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011 Jan;101(2):207-13. PubMed PMID: 20535528. Pubmed Central PMCID: 2996532.
260. Agnihotri S, Wolf A, Munoz DM, Smith CJ, Gajadhar A, Restrepo A, et al. A GATA4-regulated tumor suppressor network represses formation of malignant human astrocytomas. *J Exp Med.* 2011 Apr 11;208(4):689-702. PubMed PMID: 21464220. Pubmed Central PMCID: 3135351.
261. Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifenberger G, et al. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer.* 2008 Nov 1;123(9):2080-6. PubMed PMID: 18709645.
262. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marczynek K, et al. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int J Cancer.* 2003 Aug 10;106(1):52-9. PubMed PMID: 12794756.
263. Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res.* 2000 Oct 15;60(20):5815-24. PubMed PMID: 11059778.
264. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007 Aug 1;6(8):1079-99. PubMed PMID: 17485253.
265. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 10;27(35):5874-80. PubMed PMID: 19901110.
266. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. PubMed PMID: 18772396. Pubmed Central PMCID: 2820389.
267. Campos B, Bermejo JL, Han L, Felsberg J, Ahmadi R, Grabe N, et al. Expression of nuclear receptor corepressors and class I histone deacetylases in astrocytic gliomas. *Cancer Sci.* 2011 Feb;102(2):387-92. PubMed PMID: 21143702.
268. Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, Motta FJ, Queiroz RG, Machado HR, et al. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer.* 2008;8:243. PubMed PMID: 18713462. Pubmed Central PMCID: 2536671.
269. Schmidt N, Windmann S, Reifenberger G, Riemenschneider MJ. DNA hypermethylation and histone modifications downregulate the candidate tumor suppressor gene RRP22 on 22q12 in human gliomas. *Brain Pathol.* 2012 Jan;22(1):17-25. PubMed PMID: 21631628.
270. Mottet D, Pirotte S, Lamour V, Hagedorn M, Javerzat S, Bikfalvi A, et al. HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent,

- p53-independent mechanism. *Oncogene*. 2009 Jan 15;28(2):243-56. PubMed PMID: 18850004.
271. Costa BM, Smith JS, Chen Y, Chen J, Phillips HS, Aldape KD, et al. Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):453-62. PubMed PMID: 20068170. Pubmed Central PMCID: 2849935.
272. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS one*. 2011;6(11):e26740. PubMed PMID: 22069467. Pubmed Central PMCID: 3206066.
273. Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer research*. 2009 Oct 1;69(19):7569-76. PubMed PMID: 19773441. Pubmed Central PMCID: 2756313.
274. Mei J, Bachoo R, Zhang CL. MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Molecular and cellular biology*. 2011 Sep;31(17):3584-92. PubMed PMID: 21730286. Pubmed Central PMCID: 3165557.
275. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer research*. 2008 May 15;68(10):3566-72. PubMed PMID: 18483236.
276. Papagiannakopoulos T, Friedmann-Morvinski D, Neveu P, Dugas JC, Gill RM, Huillard E, et al. Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. *Oncogene*. 2012 Apr 12;31(15):1884-95. PubMed PMID: 21874051. Pubmed Central PMCID: 4160048.
277. Zhang QQ, Xu H, Huang MB, Ma LM, Huang QJ, Yao Q, et al. MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion. *Neuro-oncology*. 2012 Mar;14(3):278-87. PubMed PMID: 22217655. Pubmed Central PMCID: 3280801.
278. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5369-80. PubMed PMID: 18591254. Pubmed Central PMCID: 2519720.
279. Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD. Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2;107(5):2183-8. PubMed PMID: 20080666. Pubmed Central PMCID: 2836668.
280. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev*. 2009 Jun 1;23(11):1327-37. PubMed PMID: 19487573. Pubmed Central PMCID: 2701585.
281. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res*. 2008 Nov 15;68(22):9125-30. PubMed PMID: 19010882.
282. Jiang L, Lin C, Song L, Wu J, Chen B, Ying Z, et al. MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF-kappaB/IkappaBalpha negative feedback loop. *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):33-47. PubMed PMID: 22156201. Pubmed Central PMCID: 3248293.

283. Quintavalle C, Garofalo M, Zanca C, Romano G, Iaboni M, del Basso De Caro M, et al. miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphatase PTPmu. *Oncogene*. 2012 Feb 16;31(7):858-68. PubMed PMID: 21743492. Pubmed Central PMCID: 4299860.
284. Zhang CZ, Zhang JX, Zhang AL, Shi ZD, Han L, Jia ZF, et al. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2010;9:229. PubMed PMID: 20813046. Pubmed Central PMCID: 2939570.
285. Gillies JK, Lorimer IA. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle*. 2007 Aug 15;6(16):2005-9. PubMed PMID: 17721077.
286. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858-62. PubMed PMID: 11679671.
287. Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle*. 2005 Sep;4(9):1179-84. PubMed PMID: 16096373.
288. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13944-9. PubMed PMID: 16166262. Pubmed Central PMCID: 1236577.
289. Trompeter HI, Abbad H, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, et al. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS One*. 2011;6(1):e16138. PubMed PMID: 21283765. Pubmed Central PMCID: 3024412.
290. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs: small but potent oncogenes or tumor suppressors. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006 Jun;7(6):560-4. PubMed PMID: 16784027.
291. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007 Feb 1;302(1):1-12. PubMed PMID: 16989803.
292. Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther*. 2007 Dec;15(12):2070-9. PubMed PMID: 17878899.
293. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009 Oct;10(10):704-14. PubMed PMID: 19763153. Pubmed Central PMCID: 3467096.
294. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1559-63. PubMed PMID: 16141072.
295. Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6202-10. PubMed PMID: 17028600.
296. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2007 May;39(5):673-7. PubMed PMID: 17401365.
297. Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle*. 2007 Jun 15;6(12):1455-9. PubMed PMID: 17581274.
298. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2007 Mar 15;67(6):2456-68. PubMed PMID: 17363563.
299. Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, et al. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res*. 2011 May 15;71(10):3563-72. PubMed PMID: 21471404. Pubmed Central PMCID: 3096675.
300. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jan;5(1):37-50. PubMed PMID: 16485345.

301. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980 May;20(1):85-93. PubMed PMID: 6156004.
302. Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 1979 Aug;17(4):771-9. PubMed PMID: 90553.
303. Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Patti M, Bartucci M, et al. Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11469-77. PubMed PMID: 16357155.
304. Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008;6:14. PubMed PMID: 18577219. Pubmed Central PMCID: 2443372.
305. Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, Reineke LM. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res*. 1970 Nov;30(11):2760-9. PubMed PMID: 5487063.
306. Momparler RL, Bouchard J, Onetto N, Rivard GE. 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with acute leukemia inhibits DNA methylation. *Leuk Res*. 1984;8(2):181-5. PubMed PMID: 6201685.
307. Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, et al. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*. 2005 Jun;25(11):4727-41. PubMed PMID: 15899874. Pubmed Central PMCID: 1140649.
308. Kuo HK, Griffith JD, Kreuzer KN. 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication in vivo. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):8248-54. PubMed PMID: 17804739.
309. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):8-13. PubMed PMID: 18425818.
310. Jasielec J, Saloura V, Godley LA. The mechanistic role of DNA methylation in myeloid leukemogenesis. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1765-73. PubMed PMID: 24913729.
311. Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa JP. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood*. 2009 Jan 15;113(3):659-67. PubMed PMID: 18931345. Pubmed Central PMCID: 2628372.
312. Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, et al. A comparison of azacytidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*. 2010;5(2):e9001. PubMed PMID: 20126405. Pubmed Central PMCID: 2814859.
313. Eot-Houllier G, Fulcrand G, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Lett*. 2009 Feb 18;274(2):169-76. PubMed PMID: 18635312.
314. Bacon CL, Gallagher HC, Haughey JC, Regan CM. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J Neurochem*. 2002 Oct;83(1):12-9. PubMed PMID: 12358724. Epub 2002/10/03. eng.
315. Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J, Jr. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem*. 2002 Aug;9(15):1417-33. PubMed PMID: 12173980. Epub 2002/08/14. eng.

316. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2006 Jan 1;106(1):112-9. PubMed PMID: 16323176. Epub 2005/12/03. eng.
317. Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther*. 2005 Dec;4(12):1912-22. PubMed PMID: 16373706. Epub 2005/12/24. eng.
318. Rocchi P, Tonelli R, Camerin C, Purgato S, Fronza R, Bianucci F, et al. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep*. 2005 Jun;13(6):1139-44. PubMed PMID: 15870934.
319. Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):31674-83. PubMed PMID: 11418608. Epub 2001/06/22. eng.
320. Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, et al. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med*. 2005 Jan;11(1):77-84. PubMed PMID: 15619633.
321. Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3697-702. PubMed PMID: 15738394. Pubmed Central PMCID: 552783.
322. Shetty S, Graham BA, Brown JG, Hu X, Vegh-Yarema N, Harding G, et al. Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5404-16. PubMed PMID: 15964798. Pubmed Central PMCID: 1156987.
323. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5429-44. PubMed PMID: 15964800. Pubmed Central PMCID: 1156999.
324. Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar;25(5):1608-19. PubMed PMID: 15713621. Pubmed Central PMCID: 549348.
325. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol*. 2004 Mar;65(3):520-7. PubMed PMID: 14978230.
326. Joseph J, Mudduluru G, Antony S, Vashistha S, Ajitkumar P, Somasundaram K. Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB. *Oncogene*. 2004 Aug 19;23(37):6304-15. PubMed PMID: 15318170.
327. Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG. Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell*. 2000 Jun;11(6):2069-83. PubMed PMID: 10848630. Pubmed Central PMCID: 14904.
328. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):595-606. PubMed PMID: 9288740.

329. Chen LF, Greene WC. Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med (Berl)*. 2003 Sep;81(9):549-57. PubMed PMID: 12920522.
330. Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Therapie*. 1963 Mar-Apr;18:435-8. PubMed PMID: 13935231.
331. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36734-41. PubMed PMID: 11473107.
332. Johannessen SI, Battino D, Berry DJ, Bialer M, Kramer G, Tomson T, et al. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit*. 2003 Jun;25(3):347-63. PubMed PMID: 12766564.
333. Zeise ML, Kasparow S, Zieglgansberger W. Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. *Brain Res*. 1991 Mar 29;544(2):345-8. PubMed PMID: 2039949.
334. Gean PW, Huang CC, Hung CR, Tsai JJ. Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices. *Brain Res Bull*. 1994;33(3):333-6. PubMed PMID: 7904890.
335. Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol*. 2009 Jan;2(1):95-109. PubMed PMID: 20021450.
336. Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrubl FA, Raschke H, Blumcke I, et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2003 Oct 1;12(19):2481-9. PubMed PMID: 12915451.
337. Brichta L, Holker I, Haug K, Klockgether T, Wirth B. In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann Neurol*. 2006 Jun;59(6):970-5. PubMed PMID: 16607616.
338. Chiu CT, Liu G, Leeds P, Chuang DM. Combined treatment with the mood stabilizers lithium and valproate produces multiple beneficial effects in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Nov;36(12):2406-21. PubMed PMID: 21796107. Pubmed Central PMCID: 3194069.
339. Cinatl J, Jr., Kotchetkov R, Blaheta R, Driever PH, Vogel JU, Cinatl J. Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol*. 2002 Jan;20(1):97-106. PubMed PMID: 11743648.
340. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3815-22. PubMed PMID: 15867379.
341. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001 Dec 17;20(24):6969-78. PubMed PMID: 11742974. Pubmed Central PMCID: 125788.
342. Bradner JE, Mak R, Tanguturi SK, Mazitschek R, Haggarty SJ, Ross K, et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 13;107(28):12617-22. PubMed PMID: 20616024. Pubmed Central PMCID: 2906581.

343. Kito M, Maehara M, Watanabe K. Antiepileptic drugs--calcium current interaction in cultured human neuroblastoma cells. *Seizure*. 1994 Jun;3(2):141-9. PubMed PMID: 8081641.
344. Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2008 May;34(3):206-22. PubMed PMID: 18226465.
345. Johannessen CU. Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int*. 2000 Aug-Sep;37(2-3):103-10. PubMed PMID: 10812195.
346. Jung GA, Yoon JY, Moon BS, Yang DH, Kim HY, Lee SH, et al. Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway. *BMC Cell Biol*. 2008;9:66. PubMed PMID: 19068119. Pubmed Central PMCID: 2639384.
347. Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem*. 1999 Mar;72(3):1327-30. PubMed PMID: 10037507.
348. Ostertag EM, Prak ET, DeBerardinis RJ, Moran JV, Kazazian HH, Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic acids research*. 2000 Mar 15;28(6):1418-23. PubMed PMID: 10684937. Pubmed Central PMCID: 111040.
349. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47):16659-64. PubMed PMID: 15537713. Pubmed Central PMCID: 527137. Epub 2004/11/13. eng.
350. Stockhausen MT, Sjolund J, Manetopoulos C, Axelson H. Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells. *Br J Cancer*. 2005 Feb 28;92(4):751-9. PubMed PMID: 15685243. Pubmed Central PMCID: 2361888. Epub 2005/02/03. eng.
351. Peng GS, Li G, Tzeng NS, Chen PS, Chuang DM, Hsu YD, et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Mar 24;134(1):162-9. PubMed PMID: 15790540. Epub 2005/03/26. eng.
352. Bower M, Newlands ES, Bleehen NM, Brada M, Begent RJ, Calvert H, et al. Multicentre CRC phase II trial of temozolomide in recurrent or progressive high-grade glioma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1997;40(6):484-8. PubMed PMID: 9332462. Epub 1997/01/01. eng.
353. Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2762-71. PubMed PMID: 10561351. Epub 1999/11/24. eng.
354. Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *Lancet Oncol*. 2001 Sep;2(9):552-60. PubMed PMID: 11905710. Epub 2002/03/22. eng.
355. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*. 1994 Aug 9;33(31):9045-51. PubMed PMID: 8049205. Epub 1994/08/09. eng.
356. D'Atri S, Piccioni D, Castellano A, Tuorto V, Franchi A, Lu K, et al. Chemosensitivity to triazene compounds and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase

- levels: studies with blasts of leukaemic patients. *Ann Oncol.* 1995 Apr;6(4):389-93. PubMed PMID: 7619755. Epub 1995/04/01. eng.
357. Shi X, Seluanov A, Gorbunova V. Cell divisions are required for L1 retrotransposition. *Molecular and cellular biology.* 2007 Feb;27(4):1264-70. PubMed PMID: 17145770. Pubmed Central PMCID: 1800731.
358. Pietsch T, Scharmann T, Fonatsch C, Schmidt D, Ockler R, Freihoff D, et al. Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer research.* 1994 Jun 15;54(12):3278-87. PubMed PMID: 8205550.
359. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE, et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2010 May 15;16(10):2715-28. PubMed PMID: 20442299.
360. Karmakar S, Banik NL, Ray SK. Combination of all-trans retinoic acid and paclitaxel-induced differentiation and apoptosis in human glioblastoma U87MG xenografts in nude mice. *Cancer.* 2008 Feb 1;112(3):596-607. PubMed PMID: 18098270.
361. Bianchi MG, Gazzola GC, Tognazzi L, Bussolati O. C6 glioma cells differentiated by retinoic acid overexpress the glutamate transporter excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Neuroscience.* 2008 Feb 19;151(4):1042-52. PubMed PMID: 18207650.
362. Das A, Banik NL, Ray SK. Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Journal of neuro-oncology.* 2008 Mar;87(1):9-22. PubMed PMID: 17987264.
363. Shi Z, Lou M, Zhao Y, Zhang Q, Cui D, Wang K. Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation of U87 glioma stem/progenitor cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2013 Oct;33(7):943-51. PubMed PMID: 23852377. Epub 2013/07/16. eng.
364. Islam TC, Bugge TH, Bohm S. The long terminal repeat of VL30 retrotransposons contains sequences that determine retinoic acid-induced transcription in cultured keratinocytes. *The Journal of biological chemistry.* 1993 Feb 15;268(5):3251-9. PubMed PMID: 7679109.
365. Caricasole A, Ward-van Oostwaard D, Mummery C, van den Eijnden-van Raaij A. Bone morphogenetic proteins and retinoic acid induce human endogenous retrovirus HERV-K expression in NT2D1 human embryonal carcinoma cells. *Development, growth & differentiation.* 2000 Aug;42(4):407-11. PubMed PMID: 10969740.
366. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):71-8. PubMed PMID: 10647932.
367. Noutsopoulos D, Markopoulos G, Vartholomatos G, Kolettas E, Kolaitis N, Tzavaras T. VL30 retrotransposition signals activation of a caspase-independent and p53-dependent death pathway associated with mitochondrial and lysosomal damage. *Cell research.* 2010 May;20(5):553-62. PubMed PMID: 20386572.
368. Anker L, Ohgaki H, Ludeke BI, Herrmann HD, Kleihues P, Westphal M. p53 protein accumulation and gene mutations in human glioma cell lines. *International journal of cancer.* 1993 Dec 2;55(6):982-7. PubMed PMID: 8253536.
369. Spadafora C. A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes. *Systems biology in reproductive medicine.* 2008 Jan-Feb;54(1):11-21. PubMed PMID: 18543862.
370. Berninger B, Costa MR, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, et al. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci.* 2007 Aug 8;27(32):8654-64. PubMed PMID: 17687043. Epub 2007/08/10. eng.

371. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*. 2014 Feb 6;14(2):188-202. PubMed PMID: 24360883. Pubmed Central PMCID: 3967760. Epub 2013/12/24. eng.
372. Heinrich C, Blum R, Gascon S, Masserdotti G, Tripathi P, Sanchez R, et al. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol*. 2010 May;8(5):e1000373. PubMed PMID: 20502524. Pubmed Central PMCID: 2872647. Epub 2010/05/27. eng.
373. Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, et al. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci*. 2002 Apr;5(4):308-15. PubMed PMID: 11896398. Epub 2002/03/16. eng.
374. Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, et al. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol*. 2013 Oct;15(10):1164-75. PubMed PMID: 24056302. Pubmed Central PMCID: 3867822. Epub 2013/09/24. eng.
375. Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci*. 2005 May;28(5):219-21. PubMed PMID: 15866195. Epub 2005/05/04. eng.
376. Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, et al. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res*. 2012 Aug 1;318(13):1528-41. PubMed PMID: 22426197. Pubmed Central PMCID: 3405531. Epub 2012/03/20. eng.
377. Suntsova M, Gogvadze EV, Salozhin S, Gaifullin N, Eroshkin F, Dmitriev SE, et al. Human-specific endogenous retroviral insert serves as an enhancer for the schizophrenia-linked gene *PRODH*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Nov 26;110(48):19472-7. PubMed PMID: 24218577. Pubmed Central PMCID: 3845128.
378. Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, et al. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*. 2008 Feb;135(3):541-57. PubMed PMID: 18171687.
379. Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Lee HC, Hsu DM, Lin HL, et al. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant*. 2013;22(4):731-9. PubMed PMID: 23594862. Epub 2013/04/19. eng.
380. Campanelli JT, Sandrock RW, Wheatley W, Xue H, Zheng J, Liang F, et al. Expression profiling of human glial precursors. *BMC Dev Biol*. 2008;8:102. PubMed PMID: 18947415. Pubmed Central PMCID: 2579429. Epub 2008/10/25. eng.
381. Asher R, Bignami A. Hyaluronate binding and CD44 expression in human glioblastoma cells and astrocytes. *Experimental cell research*. 1992 Nov;203(1):80-90. PubMed PMID: 1426053.
382. Girgrah N, Ackerley CA, Moscarello MA. Localization of CD44 (P80) on the external surface of a human astrocytoma cell. *Neuroreport*. 1991 Aug;2(8):441-4. PubMed PMID: 1912477.
383. Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer research*. 1994 Aug 1;54(15):3988-92. PubMed PMID: 7518347.
384. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60. PubMed PMID: 17051156.
385. Yu SP, Yang XJ, Zhang B, Ming HL, Chen C, Ren BC, et al. Enhanced invasion in vitro and the distribution patterns in vivo of CD133+ glioma stem cells. *Chinese medical journal*. 2011 Sep;124(17):2599-604. PubMed PMID: 22040410.

386. Li H, Hamou MF, de Tribolet N, Jaufeerally R, Hofmann M, Diserens AC, et al. Variant CD44 adhesion molecules are expressed in human brain metastases but not in glioblastomas. *Cancer research*. 1993 Nov 15;53(22):5345-9. PubMed PMID: 7693337.
387. Diem O, Schaffner M, Seifarth W, Leib-Mosch C. Influence of antipsychotic drugs on human endogenous retrovirus (HERV) transcription in brain cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30054. PubMed PMID: 22253875. Pubmed Central PMCID: 3256206. Epub 2012/01/19. eng.
388. Christensen T. HERVs in neuropathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010 Sep;5(3):326-35. PubMed PMID: 20422298. Epub 2010/04/28. eng.
389. Benitez JA, Arregui L, Cabrera G, Segovia J. Valproic acid induces polarization, neuronal-like differentiation of a subpopulation of C6 glioma cells and selectively regulates transgene expression. *Neuroscience*. 2008 Oct 28;156(4):911-20. PubMed PMID: 18771712. Epub 2008/09/06. eng.
390. Das CM, Aguilera D, Vasquez H, Prasad P, Zhang M, Wolff JE, et al. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol*. 2007 Nov;85(2):159-70. PubMed PMID: 17534580. Epub 2007/05/31. eng.
391. Berendsen S, Broekman M, Seute T, Snijders T, van Es C, de Vos F, et al. Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: review of the preclinical rationale and published clinical results. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Sep;21(9):1391-415. PubMed PMID: 22668241. Epub 2012/06/07. eng.
392. Chen W, Cooper TK, Zahnow CA, Overholtzer M, Zhao Z, Ladanyi M, et al. Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2004 Oct;6(4):387-98. PubMed PMID: 15488761. Epub 2004/10/19. eng.
393. Lavie L, Kitova M, Maldener E, Meese E, Mayer J. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *Journal of virology*. 2005 Jan;79(2):876-83. PubMed PMID: 15613316. Pubmed Central PMCID: 538560.
394. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000 Oct;9(16):2395-402. PubMed PMID: 11005794. Epub 2000/09/27. eng.
395. Stengel S, Fiebig U, Kurth R, Denner J. Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 May;49(5):401-11. PubMed PMID: 20095041. Epub 2010/01/23. eng.
396. Kim J, Kollhoff A, Bergmann A, Stubbs L. Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum Mol Genet*. 2003 Feb 1;12(3):233-45. PubMed PMID: 12554678. Epub 2003/01/30. eng.
397. Okuse K, Mizuno N, Matsuoka I, Kurihara K. Induction of cholinergic and adrenergic differentiation in N-18 cells by differentiation agents and DNA demethylating agents. *Brain research*. 1993 Oct 29;626(1-2):225-33. PubMed PMID: 7506629.
398. Day RS, 3rd, Ziolkowski CH, Scudiero DA, Meyer SA, Lubiniecki AS, Girardi AJ, et al. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature*. 1980 Dec 25;288(5792):724-7. PubMed PMID: 6256643.
399. Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, Cannavo E, et al. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *The EMBO journal*. 2003 May 1;22(9):2245-54. PubMed PMID: 12727890. Pubmed Central PMCID: 156088.

400. D'Atri S, Tentori L, Lacial PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, et al. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Molecular pharmacology*. 1998 Aug;54(2):334-41. PubMed PMID: 9687575.
401. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of nucleic acids*. 2010;2010:543531. PubMed PMID: 21113301. Pubmed Central PMCID: 2989456.
402. Schumacher AJ, Nissley DV, Harris RS. APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Jul 12;102(28):9854-9. PubMed PMID: 16000409. Pubmed Central PMCID: 1172225.
403. Lee YN, Malim MH, Bieniasz PD. Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. *J Virol*. 2008 Sep;82(17):8762-70. PubMed PMID: 18562521. Pubmed Central PMCID: 2519637. Epub 2008/06/20. eng.
404. Johnston JB, Silva C, Holden J, Warren KG, Clark AW, Power C. Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Annals of neurology*. 2001 Oct;50(4):434-42. PubMed PMID: 11601494.
405. Karlsson H, Bachmann S, Schroder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH. Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Apr 10;98(8):4634-9. PubMed PMID: 11296294. Pubmed Central PMCID: 31886.
406. Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib-Mosch C, Seifarth W. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. *Journal of virology*. 2005 Sep;79(17):10890-901. PubMed PMID: 16103141. Pubmed Central PMCID: 1193590.