



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΕΚΕΒΕ)
«ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ»**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ ΕΝΟΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ
ΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ**

ΚΑΡΝΑΒΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΕΚΕΒΕ)
«ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ»**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ ΕΝΟΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ
ΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ**

ΚΑΡΝΑΒΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«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 του κ. Καρναβά Θεοδώρου : 7-12-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 569^α/13-12-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ρεμπούτσικα Ευμορφία Ερευνήτρια Β' Ε.Κ.Ε.ΒΕ. «Αλ. Φλέμινγκ»

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 5-5-2006

«Επιγενετικός Έλεγχος της δημιουργίας και της διατήρησης της ταυτότητας ενός νευρικού βλαστικού κυττάρου»

ΛΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666^α/22-9-2009

| | |
|-----------------------------|--|
| Γεωργάτος Σπυρίδων | Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Καναβάρος Παναγιώτης | Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Φώτσης Θεόδωρος | Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Παπαμαρκάκη Θωμαή | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Κούκλης Παναγιώτης | Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Πολίτου Αναστασία | Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Ρεμπούτσικα Ευμορφία | Ερευνήτρια Γ' Ε.ΚΕ.ΒΕ «Αλ Φλέμινγκ» |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 7-5-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ - ΖΩΗ



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ - ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Η εκπόνηση διδακτορικής διατριβής και η ενασχόληση με τη βιοϊατρική έρευνα υπήρξε ένα από τα παιδικά μου όνειρα. Τώρα που η επίπονη, αλλά και γοητευτική, πορεία του διδακτορικού, φτάνει στο τέλος της, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όλους αυτούς που με τον τρόπο τους με βοήθησαν, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωσή της.

Πρώτη από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ευμορφία Ρεμπούτσικα, επικεφαλής της ερευνητικής μας ομάδας και επιστημονική υπεύθυνη της διατριβής μου. Την ευχαριστώ, επειδή μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διατριβή μου στο εργαστήριό της, στο ιδιαίτερα θελκτικό πεδίο των βλαστικών κυττάρων και της πρώιμης ανάπτυξης των θηλαστικών. Την ευχαριστώ επίσης για το γεγονός ότι μου εξασφάλισε τριετή προσωπική χρηματοδότηση και χρηματοδότηση για τα πειράματα του διδακτορικού μου. Ακόμα, την ευχαριστώ που υπήρξε ανοικτή σε νέες ιδέες, προτάσεις και προσεγγίσεις από μέρους μου. Πιο πολύ, όμως, την ευχαριστώ που με την στάση της με δίδαξε εξ αρχής να δουλεύω ανεξάρτητα, να αντιμετωπίζω τις δυσκολίες μόνος μου, αναπτύσσοντας τη σκέψη μου και τις όποιες ικανότητες μου και βελτιώνοντας τα λάθη μου. Θεωρώ ότι αυτή είναι η μεγαλύτερη προίκα που αποκομίζω από τη μεταξύ μας συναναστροφή και την παρουσία μου στο εργαστήριο συνολικά.

Θα ήθελα από τη θέση αυτή να ευχαριστήσω, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Σπύρο Γεωργάτο και τον καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση για την επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής. Τους ευχαριστώ, γιατί, παρά το γεγονός ότι η συναναστροφή μας υπήρξε μικρή, οι υποδείξεις τους ήταν καίριες και η συνεργασία μας άψογη.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη, παλιά και νέα, του εργαστηρίου μας για τη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ την πρώην τεχνικό του εργαστηρίου μας, Αναστασία Κοτσώνη, για το χρόνο που ξόδεψε μαθαίνοντάς μου βασικές τεχνικές, κυρίως κυτταροκαλλιιεργειών, για το ότι με βοήθησε στην αρχή των πειραμάτων μου και επειδή υπήρξε πάντοτε πρόθυμη να συνδράμει σε ό,τι χρειάστηκε. Επίσης, ευχαριστώ τη συνάδελφο και υποψήφια διδάκτορα Μαρία Πούλου για το ευχάριστο κλίμα κατά τη διάρκεια της δουλειάς και τη βοήθειά της, πάντοτε πολύτιμη, σε ό,τι της ζήτησα. Ακόμα, ευχαριστώ τους υποψήφιους

διδάκτορες Νίκο Μάνδαλο και Μαξιμιλιανό Ελκούρη για τη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα τον Μαξιμιλιανό Ελκούρη, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του πάνω στη δουλειά μου και την πρακτική του βοήθεια, όποτε και αν του τη ζήτησα. Τέλος ευχαριστώ τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου μας, Μελανία Καλαϊτζίδου, Μαράννια Σαριδάκη, Μάνο Μετζακοπιάν, Ελεάννα Σταματάκου και Νίκο Μπαλάσκα για τη βραχύχρονη ή μακρόχρονη συνεργασία μας και για ό,τι μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου.

Εκτός από τα μέλη του εργαστηρίου μας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη των εργαστηρίων αλλά και το διοικητικό και τεχνικό προσωπικό του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» για τη συνεργασία μας και τη βοήθειά τους. Ιδιαίτερα αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τα μέλη των εργαστηρίων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Κέντρου μας και κυρίως τη Δρ. Θεοδώρα Αγαλιώτη, τους/τις υποψήφιους-ες διδάκτορες Κώστα Νικολάου, Ντιάνα Κοτίνη, Αναστασία Κοτσώνη, τις διδάκτορες Χαρούλα Κοντάκη, Άννα Χαρωνίτη και Γιώτα Καραγιάννη για τη συνεργασία, τη βοήθειά τους, πρακτική και θεωρητική, και το ευχάριστο κλίμα. Επίσης, ευχαριστώ θερμά το διευθυντή του ινστιτούτου μας Δρ. Ιάνη Ταλιανίδη, ο οποίος πάντα είχε την πόρτα του γραφείου του ανοικτή σε ο,τιδήποτε χρειάστηκα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και ιδιαίτερα τους/τις υποψήφιους-ες διδάκτορες Παναγιώτη Χανδρή, Κατερίνα Καρκαλή, Χαρούλα Γκιάφη, Χριστίνα Γιαννούλη και Βάσια Γαρταγάνη για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια επιστημονικών και κοινωνικών συζητήσεων και τη συμβουλή τους σε πειραματικά πρωτόκολλα.

Ακόμα ευχαριστώ τους Δρ. Βασίλη Αϊδίνη και Βασίλη Χαροκόπο για την πολύτιμη βοήθειά τους σχετικά με τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης, καθώς και το Δρ. Tristan Rodriguez και τη Δρ. Aida di Gregorio από το MRC - CSC του Λονδίνου για τη συνεργασία μας σχετικά με τα πειράματα υβριδισμού, τη θέρμη με την οποία με υποδέχτηκαν στο εργαστήριο και τις πολύτιμες συζητήσεις και υποδείξεις σχετικά με τη δουλειά μου. Τέλος, θα ήταν παράλειψη εκ μέρους μου αν δεν ευχαριστούσα τον κ. Σταμάτη Παγκάκη, υπεύθυνο της συνεστιακής μικροσκοπίας στο ΠΒΕΑΑ για την πολύτιμη βοήθειά του και τις συμβουλές του.

Η δοκιμασία του διδακτορικού είχε ως αποτέλεσμα να ενισχυθεί μέσα μου η πεποίθηση ότι δεν υπάρχει πιο σημαντικό αγαθό από την αγάπη των δικών μας

ανθρώπων, φίλων και συγγενών. Και αυτό, γιατί δίπλα μου υπήρξαν άνθρωποι που μου στάθηκαν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους και συγγενεις ανεξαιρέτως για τη συμπαράστασή τους, την υπομονή τους και τον ευχάριστο και ουσιωδώς διασκεδαστικό χρόνο που περάσαμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια εκτός εργαστηρίου.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άννα για την αγάπη της, την υπομονή της, το χρόνο που περάσαμε μαζί και τις μεταξύ μας συζητήσεις.

Είμαι, ακόμα, ευγνώμων στο Σήφη, στο Νίκο, στο Νίκο, στο Δημήτρη, στην Πόπη και σε όλους τους υπόλοιπους για τα όνειρα που κάνουμε μαζί για ένα καλύτερο αύριο. Ξεχωριστά, ευχαριστώ το Σήφη για το γεγονός ότι από αυτόν έμαθα για ποιο λόγο είναι σημαντικό να μορφώνεται κανείς.

Όταν όμως αναφέρομαι στους δικούς μου ανθρώπους, αναφέρομαι κυρίως στην οικογένειά μου: τους γονείς μου Αριστείδη και Αντιγόνη, τα αδέρφια μου Κώστα, Γιώργο, Άρτεμη και Μαριλένα και τα ανήψια μου Ελευθερία, Αντιγόνη και Βασίλη. Χωρίς την οικογένειά μου δε θα τα είχα καταφέρει! Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τον αδερφό μου Γιώργο για τη συμπαράστασή του και τη βοήθεια που μου προσέφερε, για να βρω χρηματοδότηση τον τελευταίο χρόνο του διδακτορικού μου. Πάνω και πριν από όλους, όμως, ευχαριστώ τη μάνα μου Αντιγόνη! Για ό,τι, ανεκτίμητο και ανιδιοτελές, μου έχει προσφέρει μέχρι τώρα στη ζωή μου, μεταξύ άλλων και για την αγάπη για τα γράμματα που μου εμφύσησε, παρά τις όποιες στεναχώριες, με τις οποίες την έχω κατά καιρούς βαρύνει.

Τα Τείχη

«Χωρίς περίσκεπιν, χωρίς λύπην, χωρίς αιδώ
μεγάλα κ' υψηλά τριγύρω μου έκτισαν τείχη.

Και κάθομαι και απελπίζομαι τώρα εδώ.
Άλλο δεν σκέπτομαι: τον νουν μου τρώγει αυτή η τύχη·

διότι πράγματα πολλά έξω να κάμω είχαν.
Α όταν έκτιζαν τα τείχη πώς να μην προσέξω.

Αλλά δεν άκουσα ποτέ κρότον κτιστών ή ήχον.
Ανεπαισθήτως μ' έκλεισαν από τον κόσμον έξω.»

Κ.Π. Καβάφης, 1896

«Ανήκω σὲ μία χώρα μικρή. Ένα πέτρινο ἀκρωτήριο στὴ Μεσόγειο, πού δὲν ἔχει ἄλλο ἀγαθὸ παρὰ τὸν ἀγῶνα τοῦ λαοῦ τοῦ, τὴ θάλασσα, καὶ τὸ φῶς τοῦ ἥλιου. Εἶναι μικρὸς ὁ τόπος μας, ἀλλὰ ἡ παράδοσή του εἶναι τεράστια καὶ τὸ πράγμα πού τὴ χαρακτηρίζει εἶναι ὅτι μας παραδόθηκε χωρὶς διακοπή. Ἡ ἑλληνικὴ γλῶσσα δὲν ἔπαψε ποτέ τῆς νὰ μιλιέται. Δέχτηκε τὶς ἀλλοιώσεις πού δέχεται καθετὶ ζωντανό, ἀλλὰ δὲν παρουσιάζει κανένα χάσμα. Ἄλλο χαρακτηριστικὸ αὐτῆς τῆς παράδοσης εἶναι ἡ ἀγάπη τῆς γιὰ τὴν ἀνθρωπιά, κανόνας τῆς εἶναι ἡ δικαιοσύνη. Στὴν ἀρχαία τραγωδία, τὴν ὀργανωμένη μὲ τόση ἀκρίβεια, ὁ ἄνθρωπος πού ξεπερνᾷ τὸ μέτρο, πρέπει νὰ τιμωρηθεῖ ἀπὸ τὶς Ἐρινύες.»

Γιώργος Σεφέρης, 1961

« Ἦρθαν
ντυμένοι «φίλοι»
αμέτρητες φορές οἱ εχθροί μου
το παμπάλαιο χῶμα πατώντας.
Και το χῶμα δὲν ἔδεσε ποτέ με τὴ φτέρνα τους.»

Οδυσσεὺς Ελύτης, Ἄξιον Ἐστί, Ἄσμα Ζ', 1959

στη μαμά
και σε μένα

«Η επιστημονική εργασία δεν είναι τίποτα άλλο παρά η ορθή διαχείριση της αποτυχίας».

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στη σύγχρονη αναπτυξιακή βιολογία τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα θεωρούνται ένα πρώτης τάξεως και αποτελεσματικό *in vitro* σύστημα μελέτης των διαδικασιών της ανάπτυξης των θηλαστικών, οι οποίες είναι πρακτικά δύσκολο να μελετηθούν μέσα στον ίδιο τον οργανισμό (*in vivo*). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες που ελέγχουν την έκφραση άλλων γονιδίων, θεωρούνται υπεύθυνα για τη μετάβαση από το ένα αναπτυξιακό στάδιο στο επόμενο.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια ενός ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος που στόχο έχει να διαλευκανθούν οι παράγοντες εκείνοι που καθορίζουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Στη συγκεκριμένη εργασία το ενδιαφέρον εστιάστηκε στη μελέτη της μετάβασης από το στάδιο της βλαστοκύστης στο στάδιο του πρωτόγονου εξωδέρματος, όπου πιστεύεται ότι εντοπίζονται τα πρώτα νευρικά βλαστικά κύτταρα, οι οντολογικοί πρόγονοι του νευρικού συστήματος, κατά τη ζωή του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το *in vitro* σύστημα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 για την ανάπτυξη ενός νέου μοντέλου – συστήματος μελέτης σχηματισμού του πρωτόγονου εξωδέρματος, που θα μας απαλλάσσει από τις δυσκολίες της *in vivo* μελέτης του και ταυτόχρονα θα αποκαλύπτει το ρόλο μεταγραφικών παραγόντων κατά το σχηματισμό του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|---|
| - | ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....σελ.1 |
| - | ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....σελ.2 |
| - | ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....σελ.6 |
| - | Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....σελ.9 |
| - | A.1 Η μελέτη της Ανάπτυξης.....σελ.9 |
| - | A.2 Τα πειραματικά μοντέλα μελέτης της ανάπτυξης των ζώων.....σελ.11 |
| - | A.3 Ο ποντικός <i>Mus musculus</i> ως πρότυπο μελέτης των θηλαστικών...σελ.13 |
| - | A.4 Η πρώιμη ανάπτυξη του ποντικού.....σελ.14 |
| - | A.4.1 Από τη γονιμοποίηση μέχρι τη βλαστοκύστη.....σελ.14 |
| - | A.4.2 Ο σχηματισμός της επιβλάστης και το στάδιο του κυλίνδρου.....σελ.17 |
| - | A.4.3 Η γαστριδίωση και ο σχηματισμός των τριών εμβρυϊκών βλαστικών δερμάτων.....σελ.20 |
| - | A.4.4 Από την ασυμμετρία των πρώτων αυλακώσεων στην τοπική εξειδίκευση και την αρχιτεκτονική του πρώιμου εμβρύου.....σελ.24 |
| - | A.4.4.1 Η αφετηρία της εμβρυϊκής πολικότητας: η πρώτη αυλάκωση...σελ.24 |
| - | A.4.4.2 Η πολικότητα της βλαστοκύστης ως αποτέλεσμα της ασυμμετρίας των πρώτων αυλακώσεων και η μοριακή της ταυτότητα.....σελ.26 |
| - | A.4.4.3 Η πολικότητα της βλαστοκύστης λειτουργεί ως προάγγελος της εμπρόσθιο-οπίσθιας πολικότητας του μετεμφυτευτικού εμβρύου.....σελ.31 |
| - | A.5 Μοντέλα και εργαλεία μελέτης της πρώιμης ανάπτυξης του ποντικού.....σελ.34 |
| - | A.5.1 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα – EBK.....σελ.34 |
| - | A.5.1.1 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (EBK) και οι μοναδικές τους ιδιότητες.....σελ.34 |
| - | A.5.1.2 Η χρησιμότητα των EBK.....σελ.37 |
| - | A.5.1.3 Οι μοριακές προϋποθέσεις της διατήρησης της πλειοδυναμίας των EBK και η μοριακή τους ταυτότητα.....σελ.39 |
| - | A.5.1.3.1 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι απαραίτητα για την ταυτότητα των EBK.....σελ.39 |
| - | A.5.1.3.2 Το μεταγραφικό κύκλωμα της πλειοδυναμίας.....σελ.43 |

- A.5.1.3.3 Το γονίδιο Sox2 και ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 ως μέλος του μεταγραφικού κυκλώματος πλειοδυναμίας.....σελ.47
- A.5.1.3.4 Το Nanog ως η πύλη του θεμελιώδους επιπέδου πλειοδυναμίας.....σελ.50
- A.5.2.Η ετερογένεια των EBK.....σελ.54
- A.5.3.Τα πρότυπα μελέτης της επιβλάστης.....σελ.55
- A.5.4. Τα εμβρυοειδή συσσωματώματα ως μοντέλο μελέτης της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης και τα διάφορα πρωτοκολλα διαφοροποίησης in vitro.....σελ.58
- B.ΣΤΟΧΟΙ-ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ.....σελ.59
- Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....σελ.61
- Γ.1. Οι κυτταρικές σειρές.....σελ.61
- Γ.1.1. Η πατρική κυτταρική σειρά των EBK CCE και η ετερόζυγη κυτταρική σειρά CCE^{Sox2βgeo/+}σελ.61
- Γ.1.2. Η κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών SNL.....σελ.63
- Γ.2. Κυτταροκαλλιέργειες.....σελ.63
- Γ.2.1. Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες SNL.....σελ.63
- Γ.2.2. Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου CCE και η ετερόζυγη κυτταρική σειρά CCE^{Sox2βgeo/+}σελ.66
- Γ.2.3. Εμβρυοειδή Συσσωματώματα-ΕΣ.....σελ.67
- Γ2.4. Κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2.....σελ.68
- Γ2.5. Κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM.....σελ.68
- Γ.2.6.Διαφοροποίηση προς νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα.....σελ.70
- Γ.2.7. Διαφοροποίηση προς διαφοροποιημένα κύτταρα ενδοδέρματος...σελ.72
- Γ.2.8. Διαφοροποίηση προς διαφοροποιημένα κύτταρα μεσοδέρματος..σελ.75
- Γ.2.9 Αποδιαφοροποίηση των ΕΣ 1,2 και 3 εβδομάδων και των κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος EBM.....σελ.77
- Γ.3. Απομόνωση ολικού RNA.....σελ.78
- Γ.4. Κατεργασία με DNA ριβονουκλεάση, αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση cDNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR reaction).....σελ.79

| | |
|---|---|
| - | Γ.5. In situ RNA υβριδισμός.....σελ.83 |
| - | Γ.5.1. Μονιμοποίηση των κυττάρων.....σελ.83 |
| - | Γ.5.2. Πρωτόκολλο In situ RNA υβριδισμού.....σελ.83 |
| - | Γ.6. Ανοσοφθορισμός.....σελ.87 |
| - | Γ.7. Ενζυμική αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης.....σελ.88 |
| - | Γ.8. Αντίδραση ανίχνευσης β-γαλακτοσιδάσης.....σελ.89 |
| - | Γ.9. Μεταμοσχεύσεις στη νεφρική κάψα ανοοκατεσταλμένων ζώων.....σελ.90 |
| - | Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ.91 |
| - | Δ.1. Χαρακτηρισμός κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα CCE ^{Sox2βgeo/+}σελ.91 |
| - | Δ.1.1. Τα CCE ^{Sox2βgeo/+} αντιπροσωπεύουν έναν υποπληθυσμό εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν ομοιογενώς Nanog.....σελ.91 |
| - | Δ.1.2. Παραγωγή συσσωματωμάτων με επιλογή για την συνεχή έκφραση του πλειοδύναμου παράγοντα Sox2.....σελ.94 |
| - | Δ.1.3. Τα ΕΣ με επιλογή για την έκφραση του Sox2 παρουσιάζουν μεταγραφικό προφίλ και μεταφραστικό προφίλ που προσιδιάζει στα κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος.....σελ.96 |
| - | Δ.1.4. Ανάλυση του χαρακτήρα της πλειοδυναμίας των ΚΠΕ.....σελ.97 |
| - | Δ.2. Διαφοροποίηση των ΚΠΕ.....σελ.104 |
| - | Δ.2.1. Διαφοροποίηση των ΚΠΕ σε διαφοροποιημένα νευρικά Κύτταρα.....σελ.104 |
| - | Δ.2.2. Δυναμικό κατευθυνόμενης διαφοροποίησης των ΚΠΕ σε κύτταρα του ενδοδέρματος.....σελ.110 |
| - | Δ.2.3. Δυναμικό των ΚΠΕ να διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένα μεσοδερμικά διαφοροποιημένα παράγωγα.....σελ.114 |
| - | Δ.3. Σε αντίθεση με τα ΕΒΚ τα ΚΠΕ δε δημιουργούν τερατώματα κατά τη μεταμόσχευσή τους στη νεφρική κάψα.....σελ.118 |
| - | Δ.4. Ανάλυση του ευρύτερου μεταγραφώματος και ανίχνευση νέων καθοριστών του αναπτυξιακού σταδίου του πρωτογενούς εξωδέρματος με τη χρήση μικροσυστοιχιών cDNA (cDNA microarrays) για τα ΚΠΕ.....σελ.120 |
| - | Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.125 |

- **E.1. Η ετερογένεια των EBK και η ομοιογένεια των Sox2 επιλεγμένων**
- **EBK.....σελ.125**
- **E.2. Η επιλογή για το Sox2 δημιουργεί κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος, με κοινά αλλά και ιδιαίτερα σημεία με άλλα κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος.....σελ.127**
- **ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....σελ.130**
- **ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ.....σελ.132**
- **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.134**

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- **ΑΕΒΚ:** Ανθρώπινο Εμβρυονικό Βλαστικό Κύτταρο
- **ΑΜ-ΑΑΠ:** Αντίστροφη Μεταγραφή – Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
- **ΑΦ:** Αλκαλική Φωσφατάση
- **ΑΓΚ:** Αρχέγονο Γαμετικό Κύτταρο
- **ΑΠΑ:** Ανοικτό Πλαίσιο Ανάγνωσης
- **ΑΣΕ:** Άπω Σπλαγχνικό Ενδόδερμα
- **ΔΠΣ:** Δεύτερο Πολικό Σωματίο
- **Ε:** Εμβρυϊκή ημέρα μετά τη γονιμοποίηση
- **ΕΒΚ :** Εμβρυονικό Βλαστικό Κύτταρο
- **ΕΓΚ:** Εμβρυϊκό Γαμετικό Κύτταρο
- **ΕΕ :** Εξωεμβρυϊκό Εξώδερμα
- **ΕΚ:** Εξωπλακουντικός Κώνος
- **ΕΚΚ:** Εμβρυϊκό Καρκινικό Κύτταρο
- **ΕΚΜ:** Εσωτερική Κυτταρική Μάζα
- **ΕΜΣΕ:** Εμπρόσθιο Σπλαγχνικό Ενδόδερμα
- **ΕΜ:** Εμπρόσθιο Μεσενδόδερμα
- **ΕΝ:** Εμπρόσθιο Νευροεξώδερμα
- **ΕΠΒΚ:** Επαγόμενο Πλειοδύναμο Βλαστικό Κύτταρο
- **ΕΣ:** Εμβρυοειδές Σωματίο
- **ΕΣΕ:** Εξωεμβρυϊκό Σπλαγχνικό Ενδόδερμα
- **ΘΔ:** Θερμοκρασία Δωματίου
- **ΚΠΕ:** Κύτταρο Πρωτογενούς Εξωδέρματος
- **ΜΚΒ:** Μέσο Καλλιέργειας Βλαστοκυττάρων
- **ΜΚΕ:** Μέσο Καλλιέργειας Ενδοδέρματος
- **ΜΚΙ :** Μέσο Καλλιέργειας Ινοβλαστών
- **ΜΚΜ:** Μέσο Καλλιέργειας Μεσοδέρματος
- **ΜΚΝΔ:** Μέσο Καλλιέργειας Νευρικής Διαφοροποίησης
- **ΜΚΤΕ:** Μέσο Καλλιέργειας

- ΜΠ: Μεταγραφικός Παράγοντας
- ΜΚΤΜΔ: Μέσο Καλλιέργειας Τελικής Μεσοδερμικής Διαφοροποίησης
- ΝΒΚ: Νευρικό Βλαστικό Κύτταρο
- ΟΕ: Οριστικό Ενδόδερμα
- Ο/Ν: Όλη τη Νύχτα
- ΠΔΔ: Πολύ-D-Λυσίνη
- ΠΕ: Πρωτογενές Ενδόδερμα
- ΠΛ: Πρωτογενής Λωρίδα
- ΠΣ: Πολικό Σωματίο
- ΡΟ: Ρετινοϊκό Οξύ
- ΠΤ: Πολικό Τροφοεξώδερμα
- ΣΕ: Σπλαγγνικό Ενδόδερμα
- ΤΕ: Τοιχωματικό Ενδόδερμα
- ΤΤ: Τοιχωματικό Τροφοεξώδερμα

“It is not birth, marriage or death, but gastrulation, which is the most important time in your life.”

Lewis Wolpert (1986)

«Δεν είναι η γέννηση, ο γάμος ή ο θάνατος, αλλά η γαστριδίωση, η πιο σημαντική στιγμή στη ζωή σου.»

Lewis Wolpert (1986)

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Η μελέτη της Ανάπτυξης

Στη Βιολογία το μυστηριώδες και γοητευτικό φαινόμενο της ανάπτυξης των πολυκύτταρων φυτικών και ζωϊκών οργανισμών βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Η μελέτη της ανάπτυξης, **της διαδικασίας προοδευτικών αλλαγών μέσω της οποίας ένας οργανισμός από ένα - το πρώτο - κύτταρο καταλήγει στην τελική του μορφή**, συμβάλλει στην κατανόηση της φυσιολογίας και της λειτουργίας των οργανισμών. Ακόμα, και ειδικότερα σε ό,τι αφορά τους ζωϊκούς οργανισμούς, η γνώση των μηχανισμών της ανάπτυξης επιτρέπει την κατανόηση εκείνων των μηχανισμών που ευθύνονται για την εκδήλωση ασθενειών και ανωμαλιών κατά τη διάρκειά της αλλά και μετά την ολοκλήρωσή της, κατά την ενήλικη ζωή. Και επιπλέον, και ίσως σημαντικότερο, η παράλληλη γνώση της ανάπτυξης οργανισμών διαφορετικών τάξων μας πληροφορεί για τις μεταξύ τους σχέσεις, μας οδηγεί πιο κοντά στο φαινόμενο της Εξέλιξης. Με άλλα λόγια, αποτελεί χρήσιμη γνώση στα χέρια μας για να ικανοποιήσουμε την έμφυτη πνευματική μας ανάγκη: να απαντήσουμε στο μέγα ερώτημα πώς φτάσαμε ως εδώ.

Στις αρχές του εικοστού αιώνα η ανάπτυξη της **Πειραματικής Εμβρυολογίας** με πρωτεργάτη τον Χανς Σπέμαν απάντησε σε ερωτήματα σχετικά με τη διαφορετική αναπτυξιακή κατεύθυνση που ακολουθούν ξεχωριστές ομάδες κυττάρων. Έτσι, με τα μικροχειρουργικά πειράματα μεταμόσχευσης σε έμβρυα αμφιβίων και αχινών διαπιστώθηκε η **εμβρυϊκή επαγωγή** (embryonic induction): η διαδικασία κατά την οποία το αναπτυξιακό μονοπάτι που θα ακολουθήσει μια ομάδα κυττάρων εξαρτάται από την παρουσία μορίων –χημικών σημάτων- που παράγονται και εκκρίνονται από άλλη κυτταρική ομάδα. Οι μέχρι τότε γνώσεις και μέθοδοι, όμως, κατέστησαν αδύνατη την ταυτοποίηση των σημάτων και το μοριακό μηχανισμό δράσης τους .

Οι μοριακοί μηχανισμοί της ανάπτυξης των ζωϊκών οργανισμών άρχισαν να μελετώνται συστηματικά μετά τη δεκαετία του 1960, οπότε ξεκίνησε η αλματώδης πρόοδος της Γενετικής Ανάπτυξης και της Μοριακής Βιολογίας. Η πρώτη με τα μαζικά πειράματα γενετικής σάρωσης (σαρώσεις μεταλλαξιγένεσης - mutagenesis screens), οδήγησε στο χαρακτηρισμό ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη.

Και η δεύτερη με την κλωνοποίηση γονιδίων (molecular cloning), τον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων (nucleic acid hybridization) και τις μεθόδους αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing) επέτρεψε τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής των γονιδίων και των πρωτεϊνικών προϊόντων τους και την ταυτοποίηση των, άγνωστων μέχρι πρότινος, επαγωγικών παραγόντων και των γονιδίων που ρυθμίζουν. Και επιπλέον, προσέφερε την τεράστια σημασίας δυνατότητα παρέμβαση στην πορεία της ανάπτυξης με την εισαγωγή νέων γονιδίων, την επιλεκτική αφαίρεση τους ή την τροποποίηση των ρυθμιστικών σχέσεων μεταξύ τους.

Τα νέα αυτά πειραματικά δεδομένα επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση: **παρόμοιοι μηχανισμοί ελέγχουν την ανάπτυξη όλων των ζώων.** Το γεγονός αυτό είναι πραγματικά συναρπαστικό, γιατί σημαίνει ότι **μπορούμε να αποκτήσουμε γνώσεις για την ανάπτυξη του ανθρώπου μελετώντας τον τρόπο με τον οποίο διαδραματίζεται η ανάπτυξη στους οργανισμούς μοντέλα.**

A.2. Τα πειραματικά μοντέλα μελέτης της ανάπτυξης των ζώων

Η μελέτη της ανάπτυξης των ζώων έχει βασιστεί κυρίως σε εξι οργανισμούς, αντιπρόσωπους ενός ευρέους φάσματος του ζωϊκού βασιλείου: αυτοί είναι ο νηματώδης σκώληκας (*Caenorhabditis elegans*), η μύγα του ξυδιού (*Drosophila melanogaster*) ως αντιπρόσωπος των αρθρόποδων, και από τα χορδωτά το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*), ο βάτραχος (*Xenopus laevis*) ως αμφίβιο, η όρνιθα (*Gallus domestica*) από τα πτηνά και ο ποντικός (*Mus musculus*) από τα θηλαστικά. Στον πίνακα A.1 περιγράφονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα καθενός από τους οργανισμούς μοντέλα. Καθένας από τους οργανισμούς αυτούς έχει χρησιμοποιηθεί για διαφορετικού τύπου μελέτες. Η *Drosophila* αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί ένα ιδιαίτερα δυναμικό εργαλείο γενετικής σάρωσης και δημιουργίας μεταλλαγμένων στελεχών για τη μελέτη του ρόλου ενός πολύ μεγάλου αριθμού γονιδίων λόγω της δυνατότητας πρόσβασης στο έμβρυο, της απλής της γενετικής και της δυνατότητάς της να δίνει πολλούς απογόνους. Ο *C.elegans* και το ψάρι ζέβρα χρησιμεύουν για τη μελέτη της πορείας σχηματισμού οργάνων και συστημάτων λόγω της δυνατότητας να παρατηρούμε μέσα στο ζωντανό οργανισμό (*in vivo*) την πορεία ακόμα και μεμονωμένων κυττάρων κατά την ανάπτυξη του οργανισμού. Ο βάτραχος και η όρνιθα λόγω της επαρκούς προσβασιμότητας του πρώιμου εμβρύου λειτουργούν σαν πολύ καλά μοντέλα πρώιμης ανάπτυξης. Και ο ποντικός ως εκπρόσωπος των θηλαστικών χρησιμοποιήθηκε για να μας δίνει απαντήσεις που έχουν πιο άμεση σχέση με την ανθρώπινη ανάπτυξη.

| | Νηματώδης (<i>C.elegans</i>) | Μύγα ξυδιού (<i>D.melanogaster</i>) | Ψάρι ζέβρα (<i>D.erio</i>) | Βάτραχος (<i>X.laevis</i>) | Όρνιθα (<i>G.domestica</i>) | Ποντικός (<i>M.musculus</i>) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Αριθμός εμβρύων- απογόνων | Μεγάλος | μεγάλος | μεγάλος | μεγάλος | μικρός | μικρός |
| Κόστος συντήρησης | Χαμηλό | μέτριο | μέτριο | μέτριο | χαμηλό | υψηλό |
| Προσβασιμότητα εμβρύου | Επαρκής | επαρκής | επαρκής | επαρκής | επαρκής | περιορισμένη |
| Μικροχειρουργική εμβρύου | Περιορισμένη | περιορισμένη | αρκετά καλή | καλή | καλή | περιορισμένη |
| Δυνατότητα γενετικών χειρισμών | Αναπτυγμένη | αναπτυγμένη | αναπτυγμένη | καμία | καμία | αναπτυγμένη |
| Αποκωδικοποίηση γονιδιώματος | Ολοκληρωμένη | ολοκληρωμένη | ολοκληρωμένη | ολοκληρω μένη | ολοκληρωμένη | ολοκληρωμένη |

Πίνακας Α.1: Συγκριτική παρουσίαση των πειραματικών μοντέλων για τη μελέτη της ανάπτυξης των ζωϊκών οργανισμών.

A.3. Ο ποντικός *Mus musculus* ως πρότυπο μελέτης των θηλαστικών

Η μελέτη της ανάπτυξης των θηλαστικών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι, εκτός των άλλων, αφορά άμεσα τον άνθρωπο ως θηλαστικό. Η ανάπτυξη και η φυσιολογία των θηλαστικών έχει μελετηθεί κυρίως στον ποντικό *Mus musculus*, ένα τρωκτικό, του οποίου ο τελευταίος κοινός πρόγονος με τον άνθρωπο έζησε πριν από 90 εκατομμύρια χρόνια. Εντούτοις, παρουσιάζει πολύ όμοια φυσιολογία με εκείνη του ανθρώπου. Το γεγονός αυτό, και επιπλέον το σχετικά μικρό του μέγεθος, η γρήγορη ανάπτυξη και η δυνατότητά του να δίνει αρκετούς απογόνους σε σύντομο χρόνο καθιστούν τον ποντικό άριστο πρότυπο μελέτης της ανάπτυξης και της φυσιολογίας του ανθρώπου. Με γενετικές μελέτες στον ποντικό έχει ταυτοποιηθεί μεγάλος αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και στην εκδήλωση πλήθους ανωμαλιών και ασθενειών, όπως διάφορες μορφές καρκίνου, ο διαβήτης, καρδιαγγειακά, νευροεκφυλιστικά και αυτοάνοσα νοσήματα.

Ο ποντικός, ως θηλαστικό, ανήκει στα ζωοτόκα. Αυτό περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα πρόσβασης στο έμβρυο, ιδιαίτερα στα μετεμφυτευτικά στάδια της ανάπτυξης. Έτσι, περιορίζονται πολύ οι μικροχειρουργικοί χειρισμοί του εμβρύου σε σύγκριση με το *Xenopus*, το ψάρι ζέβρα και την όρνιθα. Για αυτό το λόγο η μελέτη της Βιολογίας Ανάπτυξης του ποντικού έχει βασιστεί κυρίως σε μεθόδους που περιλαμβάνουν γενετικούς χειρισμούς: τέτοιοι είναι η δημιουργία διαγονιδιακών ζώων και η στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων. Στην προσπάθεια αυτή καθοριστική έχει αποδειχθεί η ανακάλυψη των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων το 1981 (Evans and Kaufman, 1981).

A.4. Η πρώιμη ανάπτυξη του ποντικού

A.4.1. Από τη γονιμοποίηση μέχρι τη βλαστοκύστη

Η γονιμοποίηση στα θηλαστικά, η σύντηξη του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου, δημιουργεί το ζυγωτό, το πρώτο κύτταρο, από το οποίο θα προέλθει ολόκληρος ο οργανισμός (εικόνα A.1). Το ζυγωτό χαρακτηρίζεται ως **ολοδύναμο** (totipotent) κύτταρο, ήτοι κύτταρο που μπορεί να δώσει γένεση σε όλους τους εξωεμβρυϊκούς και εμβρυϊκούς ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου, που θα σχηματίσουν τελικά ολόκληρο τον οργανισμό. Το ζυγωτό είναι ένα κύτταρο με πυρήνα πατρικής και μητρικής προέλευσης και κυτταρόπλασμα μητρικής προέλευσης. Το γονιδίωμά του παραμένει ανενεργό και η πρωτεϊνοσύνθεσή του κατευθύνεται από μηνύματα RNA (mRNA) που έχουν μεταγραφεί κατά την ωογένεση. Πρόκειται δηλαδή για κύτταρο **μητρικής επίδρασης**, αφού τα χαρακτηριστικά του εξαρτώνται αποκλειστικά από το γονότυπο της μητέρας και όχι από τον εμβρυϊκό γονότυπο. Το εμβρυϊκό γονιδίωμα αρχίζει να εκφράζεται στο στάδιο των δύο κυττάρων, πολύ νωρίτερα από ό,τι στα πτηνά και τα ερπετά (Wasserman, 2001)).

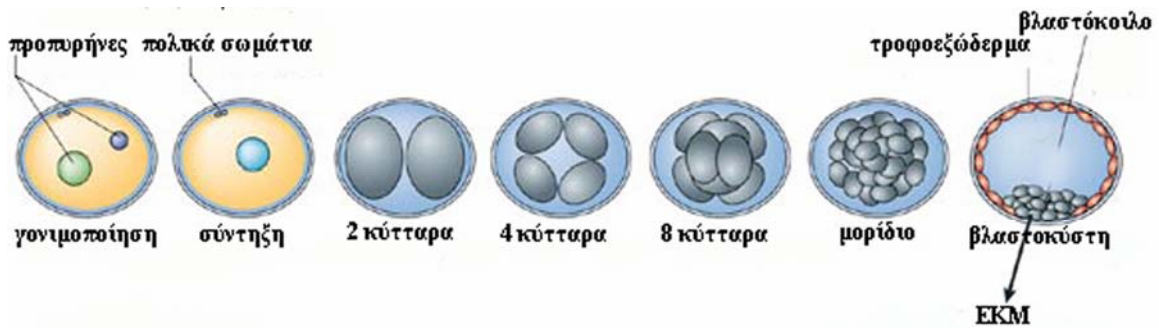
Μετά τη γονιμοποίηση λαμβάνουν χώρα αλληπαλλήλες κυτταρικές **αυλακώσεις** (cleavage), ένας ιδιαίτερος τύπος κυτταρικής διαίρεσης που δε συνοδεύεται από κυτταρική αύξηση, οπότε τα θυγατρικά κύτταρα είναι μικρότερα από τα μητρικά. Η αυλάκωση διαρκεί βέβαια λιγότερο στον ποντικό, και γενικότερα στα έμβρυα των θηλαστικών, καθώς πρόκειται για έμβρυα, όπως και αυτά των ερπετών και των πτηνών, που διαθέτουν κάποια πηγή θρέψης, σε αντίθεση με έμβρυα άλλων ειδών που είναι ελεύθερα, χωρίς εξωκυττάρια λέκιθο, και στα οποία η αυλάκωση διαρκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ο ρυθμός της πρώιμης ανάπτυξης των θηλαστικών χαρακτηρίζεται ως αργός σε σύγκριση με άλλους ζωϊκούς οργανισμούς, όπως είναι ο Χεορpus και το ψάρι ζέβρα. Η πρώτη αυλάκωση, 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, ακολουθείται ανά 12 ώρες από τις δύο επόμενες ασύγχρονες αυλακώσεις σε διαφορετικά επίπεδα του χώρου - ισημερινό και μεσημβρινό - δημιουργώντας πρότυπο περιστροφικής αυλάκωσης. Μέχρι το στάδιο των οκτώ κυττάρων τα μεγάλα θυγατρικά κύτταρα των αυλακώσεων, **τα βλαστομερίδια**, παρουσιάζουν ευδιάκριτο σχήμα. Στη συνέχεια όμως παρατηρείται συμπίεσή τους με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των διακυτταρικών τους επαφών, στις οποίες καθοριστικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη συνάφειας καδερίνη E (E-cadherin). Το φαινόμενο αυτό καλείται

σύμπτυξη (compaction). Σημαντικός για τη σύμπτυξη είναι και ο σχηματισμός χασμοσυνδέσμων στο στάδιο αυτό, οι οποίοι επιτρέπουν τη διάχυση ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους σε ολόκληρο το έμβρυο.

Από τη σύμπτυξη μέχρι το στάδιο των 32 κυττάρων το έμβρυο καλείται **μορίδιο** (morula). Κατά την περίοδο αυτή σχηματίζονται δεσμοσώματα και στενοσύνδεσμοι που δημιουργούν έναν αδιαπέραστο φραγμό ανάμεσα στο εσωτερικό και το εξωτερικό του εμβρύου. Διαδοχικά κύματα ασύμμετρων διαιρέσεων που ξεκινούν από το στάδιο των 8 κυττάρων επιφέρουν την πρώτη διαφοροποίηση στην επιλογή πεπρωμένου από τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονται εσωτερικά του εμβρύου θα δώσουν την Εσωτερική Κυτταρική Μάζα της βλαστοκύστης, ενώ τα εξωτερικά θα δώσουν τον πρώτο εξωεμβρυϊκό ιστό, το **τροφοεξώδερμα**, από το οποίο θα προκύψει στη συνέχεια ο πλακούντας (Barlow P, 1972; Dyce et al., 1987; Fleming, 1987; Johnson MH, 1981; Pedersen et al., 1986). Στο εσωτερικό του εμβρύου αρχίζει σταδιακά να σχηματίζεται το **βλαστόκοιλο** (blastocoel), μια κοιλότητα γεμάτη με υγρό, και ολοκληρώνεται περίπου στις 3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (E3), και ενώ το έμβρυο κατέρχεται από τον ωαγωγό προς τη μήτρα. Ο σχηματισμός του βλαστόκοιλου σηματοδοτεί την έναρξη του σταδίου της βλαστοκύστης στις 3,5 ημέρες (E3,5) μετά τη γονιμοποίηση. Η **βλαστοκύστη** (blastocyst) αποτελείται από μια στιβάδα μεγάλων **τροφοεξωδερμικών κυττάρων** (TK) με επιθηλιακή μορφολογία που βρίσκονται εξωτερικά και περιβάλλουν ένα συσσωμάτωμα ταχέως διαιρούμενων κυττάρων. Το τελευταίο ονομάζεται **Εσωτερική Κυτταρική Μάζα - EKM** (Inner Cell Mass - ICM). Στο στάδιο της βλαστοκύστης το έμβρυο περιλαμβάνει 60 κύτταρα, εκ των οποίων το ένα τέταρτο μόνο εντοπίζεται στην EKM και τα υπόλοιπα στο τροφοεξώδερμα (Kaufman, 1992).

Το τροφοεξώδερμα συνιστά ιστό εξωεμβρυϊκό. Τα κύτταρα της EKM είναι κύτταρα **πλειοδύναμα**. Αυτό σημαίνει ότι διαθέτουν το αναπτυξιακό δυναμικό να δώσουν γένεση σε όλους τους εμβρυϊκούς ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Δεν μπορούν όμως να δώσουν τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς.



Εικόνα Α.1: Η πορεία της πρώιμης ανάπτυξης από τη γονιμοποίηση μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Οι δύο προκυρήνες, αρσενικός και θηλυκός, μετά τη σύντηξη των δύο γαμετών κατά τη γονιμοποίηση, συνεισφέρουν εξίσου στο γενετικό υλικό του ζυγωτού. Τα πολικά σωμάτια, προϊόντα των δύο μειωτικών διαιρέσεων του ωαρίου, εκφυλίζονται και αποβάλλονται. Κατά το στάδιο των 8 κυττάρων ξεκινάει η σύμπτυξη με την ανάπτυξη των χασμοσυνδέσμων. ΕΚΜ: Εσωτερική Κυτταρική Μάζα. Τροποποιημένη από (Meshorer and Misteli, 2006)

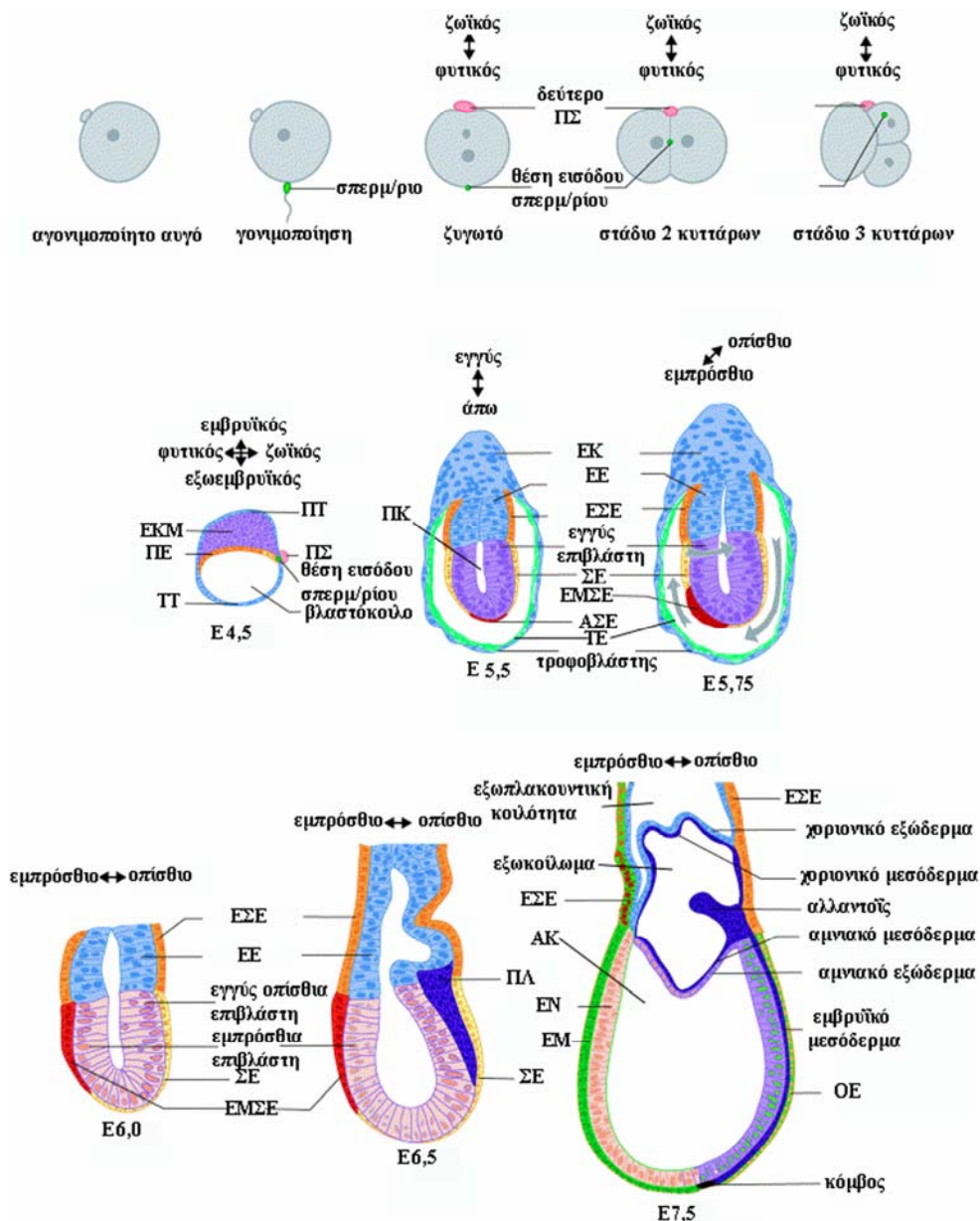
A.4.2. Ο σχηματισμός της επιβλάστης και το στάδιο του κυλίνδρου

Τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος και της ΕΚΜ εκτελούν ένα πρόγραμμα **διαφοροποίησης** με χρονική αφετηρία τις Ε3,5(εικόνα Α.2). Η διαφοροποίηση είναι η προοδευτική διαδικασία απόκτησης των εξειδικευμένων δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του κυττάρου. Έτσι, τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος που εφάπτονται με την ΕΚΜ σχηματίζουν το **πολικό τροφοεξώδερμα-ΠΤ** (polar trophoctoderm), ενώ από τα υπόλοιπα τροφοεξωδερμικά κύτταρα αναπτύσσεται το **τοιχωματικό τροφοεξώδερμα-ΤΤ** (mural trophoctoderm). Τα κύτταρα του πολικού τροφοεξωδέρματος αναπτύσσονται κανονικά, ενώ αυτά του τοιχωματικού διπλασιάζουν το DNA τους χωρίς να διαιρούνται, με αποτέλεσμα να μετασχηματίζονται σε γιγάντια πολυπλοειδή κύτταρα. Ταυτόχρονα, τα εξωτερικά κύτταρα της ΕΚΜ που βρίσκονται προς την πλευρά του βλαστοκόιλου διαφοροποιούνται, σχηματίζοντας μια στιβάδα πρωτογενούς ενδοδέρματος(Ralston and Rossant, 2005). Το **πρωτογενές ενδόδερμα (ΠΕ)**, αντίστοιχο της υποβλάστης της όρνιθας, είναι εξωεμβρυϊκός ιστός και δε συμβάλλει στη μετέπειτα συγκρότηση του εμβρυϊκού οριστικού ενδοδέρματος. Την ίδια στιγμή τα υπόλοιπα κύτταρα της ΕΚΜ πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και διαφοροποιούνται σε έναν, **επίσης πλειοδύναμο, κυτταρικό πληθυσμό, το πρωτογενές εξώδερμα (primitive ectoderm) ή αλλιώς επιβλάστη (epiblast)**. Η επιβλάστη, σχηματισμένη και τοποθετημένη άνωθεν του πρωτογενούς ενδοδέρματος μια ημέρα μετά το σχηματισμό της, ύστερης πια, βλαστοκύστης, γύρω στις Ε4,5, αποτελεί χρονικά τον τελευταίο πλειοδύναμο κυτταρικό πληθυσμό του αναπτυσσόμενου εμβρύου, διακριτό όμως αναπτυξιακά, λειτουργικά και μοριακά από τα βλαστομερίδια και τα κύτταρα της ΕΚΜ. Από την επιβλάστη θα προέλθει ολόκληρο το έμβρυο. Στις Ε4,5 τοποθετείται και η εμφύτευση του εμβρύου.

Στο μετεμφυτευτικό στάδιο τα εσώτερα κύτταρα της επιβλάστης καθίστανται ταχέως αποπτωτικά και πεθαίνουν, ελευθερώνοντας χώρο για να δημιουργηθεί η προαμνιακή κοιλότητα- ΠΚ. Ταυτόχρονα, τα εξωτερικά κύτταρα της επιβλάστης που περιβάλλουν τη σχηματιζόμενη κοιλότητα σχηματίζουν ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο το οποίο στις 5,5 ημέρες πλέον είναι καλά σχηματισμένο. Η δημιουργία του μετεμφυτευτικού επιθηλίου της επιβλάστης σηματοδοτεί το αναπτυξιακό στάδιο του **κυλίνδρου** (egg cylinder), που διαρκεί μέχρι τις 6,5 ημέρες. Η επιβλάστη, προεμφυτευτική και μετεμφυτευτική, θεωρείται ο τελευταίος πλειοδύναμος κυτταρικός

πληθυσμός του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Οντογενετικά αποτελεί τον αμεσότερο κυτταρικό πρόγονο της γαστριδιοποίησης και των παραγώγων της, που είναι τα τρία εμβρυϊκά βλαστικά δέρματα: το εμβρυϊκό εξώδερμα, το εμβρυϊκό μεσόδερμα και το εμβρυϊκό ενδόδερμα, από τα οποία θα σχηματισθεί ολοκληρωτός ο οργανισμός.

Ενώ η επιβλάστη διατηρεί τον αδιαφοροποίητο χαρακτήρα της πλειοδυναμίας, το εξωεμβρυϊκό περιβάλλον της διατηρείται σε πορεία διαφοροποίησης μετεμφυτευτικά. Συγκεκριμένα, κύτταρα προερχόμενα από το πρωτογενές ενδόδερμα εξέρχονται, καλύπτουν ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του τοιχωματικού τροφοεξωδέρματος και αρχίζουν να εκκρίνουν μια εξωκυττάρια βασική μεμβράνη, γνωστή ως μεμβράνη του Reichert, η οποία αποτελείται από λαμνίνη, εντακτίνη και κολλαγόνο τύπου IV. Τα κύτταρα αυτά συγκροτούν έτσι το **τοιχωματικό ενδόδερμα-TE** (parietal endoderm). Τα υπόλοιπα κύτταρα του πρωτογενούς ενδοδέρματος παραμένουν επιθηλιακής μορφολογίας και σχηματίζουν γύρω από την επιβλάστη μια στιβάδα **σπλαγγχικού ενδοδέρματος-ΣΕ** (visceral endoderm-VE). Ταυτόχρονα το πολικό τροφοεξώδερμα δημιουργεί **εξωεμβρυϊκό εξώδερμα (EE)**. Η εξωεμβρυϊκή περιοχή του πολικού τροφοεξωδέρματος έχει πλέον μετατραπεί στον εξωπλακουντικό κώνο και, καθώς πολλαπλασιάζεται, σχηματίζονται στην παρακείμενη περιοχή γιγαντιαία κύτταρα οργανωμένα σε στιβάδες. Τα κύτταρα αυτά μετακινούνται και ενισχύουν τον **τροφοβλάστη**, όπως λέγεται πλέον το τροφοεξώδερμα (εικόνα Α.2) (Kaufman, 1992).



Εικόνα Α.2: Η πορεία της πρώιμης ανάπτυξης του ποντικού από τη στιγμή της γονιμοποίησης μέχρι την ολοκλήρωση της γαστριδίωσης. Στην εικόνα απεικονίζονται η κάθε εμβρυϊκή περιοχή με ξεχωριστό αναπτυξιακό δυναμικό, και η πολικότητα του εμβρύου. ΑΚ: Αμνιακή Κοιλότητα, ΑΣΕ: Άπω Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα, ΕΚ: Εξωπλακουντικός Κώνος, ΕΚΜ: Εσωτερική Κυτταρική Μάζα, ΤΤ: Τοιχωματικό Τροφοεξώδερμα, ΠΤ: Πολικό Τροφοεξώδερμα, ΠΣ: Πολικό Σωμάτιο, ΠΚ: Προαμνιακή Κοιλότητα, ΕΚ: Εξωπλακουντικός Κώνος, ΕΕ: Εξωεμβρυϊκό Εξώδερμα, ΕΜ: Εμπρόσθιο Μεσενδόδερμα, ΕΜΣΕ: Εμπρόσθιο Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα, ΕΝ: Εμπρόσθιο Νευροεξώδερμα, ΕΣΕ: Εξωεμβρυϊκό Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα, ΟΕ: Οριστικό Ενδόδερμα, ΠΕ: Πρωτογενές Ενδόδερμα, ΠΛ: Πρωτογενής Λωρίδα ΣΕ: Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα, ΤΕ: Τοιχωματικό Ενδόδερμα. Τροποποιημένη από (Lu et al., 2001).

A.4.3. Η γαστριδίωση και ο σχηματισμός των τριών εμβρυϊκών βλαστικών δερμάτων

Στις 6,5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση τοποθετείται η έναρξη της γαστριδίωσης (εικόνα A.2,A.3). Τότε καθίσταται εμφανής και ο εμπροσθοπίσθιος άξονας του μελλοντικού εμβρύου με το σχηματισμό της **πρωτογενούς λωρίδας** (primitive streak) στο άκρο της επιβλάστης που υποδεικνυεί το οπίσθιο (posterior) άκρο του μελλοντικού εμβρυϊκού άξονα. Η λωρίδα σχηματίζεται, όταν τα κύτταρα της επιβλάστης που βρίσκονται στην περιοχή που θα καθορίσει το οπίσθιο τμήμα του εμβρύου διογκώνονται και μεταναστεύουν κατά μήκος της αρχικής λωρίδας στις E6,5. Ταυτόχρονα με τη μετανάστευση τα επιθηλιακά κύτταρα της πρωτογενούς λωρίδας μεταπίπτουν σε μεσεγγύμα, μια διαδικασία γνωστή ως επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition-EMT). Η διαδικασία χαρακτηρίζεται από απώλεια κυτταρικής προσκόλλησης, καταστολή της έκφρασης της E-καδερίνης και αυξημένη κυτταρική κινητικότητα. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής και των κυτταρικών μεταναστεύσεων είναι η δημιουργία του **οριστικού ενδοδέρματος-ΟΕ** (definitive endoderm) και του **μεσοδέρματος** του εμβρύου (Lewis and Tam, 2006; Lu et al., 2001; Tam and Behringer, 1997).

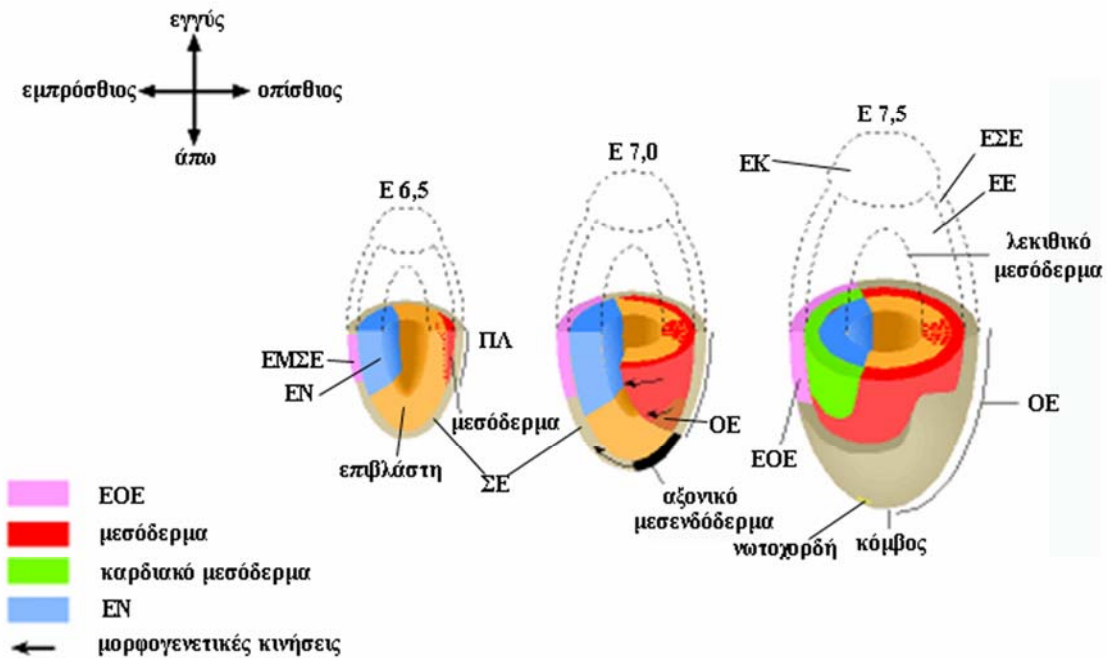
Μελέτες ανίχνευσης πεπρωμένου των κυττάρων της πρωτογενούς λωρίδας έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη των πληθυσμών του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος ελέγχεται χωροχρονικά (Loebel DA, 2003). Πρώτα, τα κύτταρα της επιβλάστης που βρίσκονται στο οπίσθιο άκρο της πρωτογενούς λωρίδας μεταναστεύουν και είναι αυτά που θα δώσουν το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα που εποικίζει τον αναπτυσσόμενο εξωεμβρυϊκό λεκιθικό σάκο και θα γεννήσει τα αιμοποιητικά και αγγειακά κύτταρα των εμβρυϊκών αγγειογενετικών δομών, των νησίδων του αίματος. Στη συνέχεια μεταναστεύουν τα κύτταρα της πρωτογενούς λωρίδας που βρίσκονται πιο εμπρόσθια από τα προηγούμενα και που αποτελούν τους πρόγονους του εμβρυϊκού μεσοδέρματος, που θα δώσει το καρδιακό, το παραξονικό και το κεφαλικό μεσόδερμα. Τελευταία μεταναστεύουν τα διακείμενα στο εμπρόσθιο άκρο της πρωτογενούς λωρίδας κύτταρα και είναι αυτά που θα δώσουν το ενδόδερμα και το αξονικό εμβρυϊκό μεσόδερμα, από το οποίο θα προέλθει η **νωτοχορδή** (notochord) (εικόνα A.3.).

Η νωτοχορδή καθορίζει τον πρωτογενή και ραχιαιοκοιλιακό άξονα του εμβρύου. Ακόμα, η νωτοχορδή με δύο στιβάδες εκατέρωθεν, το οριστικό ενδόδερμα και την νευρική πλάκα, αποτελεί συστατικό, της αναδυόμενης κατά την E7,5, κεφαλικής απόφυσης. Από την τελευταία προέρχεται η κεφαλική πτυχή, το εμπρόσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα. Επιπλέον στο εμπρόσθιο άκρο της αρχικής λωρίδας βρίσκεται ο **κόμβος** (node) (εικόνες A.2, A.3). Ο κόμβος συνιστά μια πάχυνση ανάλογη με τον κόμβο του Hensen στην όρνιθα και λειτουργεί επαγωγικά, όπως ο οργανωτής του Xenopus. Εάν σε ένα έμβryo-δέκτη μεταμοσχευθεί δεύτερος κόμβος, τότε αυτός επάγει από την επιβλάστη του δέκτη το σχηματισμό ενός δευτερογενή άξονα, ο οποίος φέρει νευρικό σωλήνα και σωμίτες. Μάλιστα, ο κόμβος του ποντικού είναι σε θέση να δημιουργήσει δευτερογενή άξονα ακόμα και από το βλαστόδερμα εμβρύου όρνιθας.

Τα κύτταρα του εμπρόσθιου άκρου της επιβλάστης, που δε μεταναστεύουν κατά μήκος της πρωτογενούς λωρίδας θα σχηματίσουν το εμβρυϊκό **νευροεξώδερμα** (embryonic neuroectoderm), από το οποίο θα προέλθει η επιδερμίδα και το νευρικό σύστημα.. Αυτό είναι το πρώτο σημείο στη ζωή του οργανισμού που εμφανίζονται τα πρώτα **νευρικά βλαστικά κύτταρα** (NBK): πρόδρομα κύτταρα που μπορούν να δώσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους του νευρικού συστήματος. Τα NBK θεωρούνται **πολυδύναμα** κύτταρα, που σημαίνει ότι διαθέτουν το δυναμικό να δώσουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ενός συγκεκριμένου ιστού, στην προκειμένη περίπτωση του νευρικού. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ότι πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα έχουν βρεθεί και σε άλλους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου-αιμοποιητικά, ενδοθηλιακά, - καθώς και νησίδες αυτών σε ιστούς ενηλίκων, οπότε αποκαλούνται βλαστικά κύτταρα ενήλικου (adult stem cells). Θα πρέπει δε να είναι σαφής η διάκρισή τους από τους προγεννήτορες (progenitors) των διαφόρων κυτταρικών τύπων, οι οποίοι συνιστούν κύτταρα με ακόμα πιο περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό, καθώς από αυτούς προκύπτουν συγκεκριμένα διαφοροποιημένα παράγωγα (π.χ. νευρωνικοί προγεννήτορες-neuronal progenitors).

Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης, στον εξωεμβρυϊκό ιστό λαμβάνουν χώρα μεταβολές που συμποσούνται στην ανάπτυξη της αμνιακής πτυχής στην περιοχή ένωσης του οπίσθιου τμήματος της αρχικής λωρίδας με το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα (εικόνα A.2). Από το κοντινότερο στο έμβryo τμήμα αυτής της πτυχής αναπτύσσεται το **άμνιο**, ενώ από το κοντινότερο τμήμα στον **εξωπλακουντικό κόνο** το **χόριο**. Η πτυχή επεκτείνεται

στον προαμνιακό χώρο, ο οποίος πλέον διαιρείται σε τρία τμήματα: την αμνιακή κοιλότητα πάνω από το έμβρυο, το εξωκοίλωμα, που διαχωρίζει άμνιο και χόριο και την εξωπλακουντική κοιλότητα, η οποία επενδύεται από το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα. Μέσα στο εξωκοίλωμα αναπτύσσεται η **αλλαντοΐδα** σχηματιζόμενη από μεσόδερμα του οπίσθιου άκρου της αρχικής λωρίδας. Η αλλαντοΐδα επεκτείνεται, έρχεται σε επαφή με το χόριο και αργότερα σχηματίζει τα εμβρυϊκά αιμοφόρα αγγεία του πλακούντα. Ο πλακούντας αναπτύσσεται από την περιοχή του εξωπλακουντικού κώνου και είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη θρέψη του εμβρύου και την παροχή των απαραίτητων ορμονών για την εγκυμοσύνη.



Εικόνα Α.3: Ο σχηματισμός των τριών εμβρυϊκών βλαστικών δερμάτων κατά τη γαστριδίωση. Κατά την E6,5 ξεκινούν οι διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των τριών εμβρυϊκών βλαστικών δερμάτων. Και τα τρία προέρχονται από την επιβλάστη. Αρχικά στο οπίσθιο άκρο της επιβλάστης σχηματίζεται η πρωτογενής λωρίδα, μια παροδική πάχυνση. Η κυρτή γραμμή υποδεικνύει το μήκος της πρωτογενούς λωρίδας κατά μήκος του άξονα εγγύς-άπω, το οποίο αυξάνεται όσο προχωράει η γαστριδίωση. Οι κυτταρικοί πρόγονοι του μεσοδέρματος, του οριστικού ενδόδερματος και το αξονικού μεσενδόδερματος εμφανίζονται στην πρωτογενή λωρίδα κατά την E7,0, οπότε και ξεκινούν μορφογενετικές κινήσεις που οδηγούν στην τελική τους τοποθέτηση σε εμπρόσθιες θέσεις. Το οριστικό ενδόδερμα καλύπτει το εξωτερικό μέρος του εμβρύου, ενώ τα κύτταρα που θα δώσουν το μεσόδερμα τοποθετούνται ενδιάμεσα και καλύπτουν εξωτερικά αρχικά την επιβλάστη και αργότερα το νευροεξώδερμα. Οι κυτταρικοί πρόγονοι του μεσοδέρματος, που εμφανίζονται στην εμπρόσθια πλευρά της επιβλάστης, θα δώσουν το καρδιακό, το παραξονικό και το κεφαλικό μεσόδερμα. Το αξονικό μεσενδόδερμα προκύπτει χρονικά τελευταίο από τους υπόλοιπους μεσοδερμικούς προγόνους. Το εμπρόσθιο σπλαγγχνικό ενδόδερμα, το οποίο προκύπτει από κινήσεις του άπω σπλαγγχνικού ενδοδέρματος προς το εμπρόσθιο άκρο του εμβρύου, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την E6,0, διαδραματίζει ρόλο στην επαγωγή του νευροεξώδερματος. Αργότερα, κατά τη γαστριδίωση, E6,5-E7,5, οι κινήσεις των αναδυόμενων κυττάρων του οριστικού ενδοδέρματος προς το εμπρόσθιο και εγγύς άκρο του εμβρύου μετατοπίζουν το σπλαγγχνικό ενδόδερμα προς εξωεμβρυϊκές θέσεις. ΕΕ: Εξωεμβρυϊκό Εξώδερμα, ΕΚ: Εξωπλακουντικός Κώνος, ΕΜΣΕ: Εμπρόσθιο Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα, ΕΝ: Εμπρόσθιο Νευροεξώδερμα, ΕΟΕ: Εμπρόσθιο Οριστικό Ενδόδερμα, ΕΣΕ: Εμπρόσθιο Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα, ΟΕ: Οριστικό Ενδόδερμα, ΠΛ: Πρωτογενής Λωρίδα, ΣΕ: Σπλαγγχνικό Ενδόδερμα. Τροποποιημένη από (Yamaguchi, 2001)

A.4.4. Από την ασυμμετρία των πρώτων αυλακώσεων στην τοπική εξειδίκευση και την αρχιτεκτονική του πρώιμου εμβρύου

A.4.4.1. Η αφετηρία της εμβρυϊκής πολικότητας: η πρώτη αυλάκωση

Το έμβρυο των θηλαστικών είναι **ρυθμιστικό** (Tarkowski, 1959). Αυτό σημαίνει πως η αλλαγή θέσης μεταξύ των βλαστομεριδίων ή η προσθαφαίρεσή τους δεν απαγορεύει στο έμβρυο να ανακάμψει ακολουθώντας φυσιολογική αναπτυξιακή πορεία. Αυτό ισχύει μέχρι το στάδιο των 8 βλαστομεριδίων. Τα βλαστομερίδια του σταδίου αυτού θεωρούνται τα τελευταία ολόδυναμα κυτταρα του οργανισμού μας. Παρόλη την πολικότητά τους, που οφείλεται σε άνισο καταμερισμό του μητρικής προέλευσης ζυγωτικού κυτταροπλάσματος, τα βλαστομερίδια μέχρι το στάδιο των 8 διαθέτουν δυναμικό να δώσουν γένεση σε έναν ολόκληρο οργανισμό συμπεριλαμβανομένων και των εξωεμβρυϊκών ιστών του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Το σημαντικό αυτό δεδομένο οδήγησε αρχικά στην υπόθεση ότι η διαμόρφωση του προτύπου σώματος ξεκινά πολύ αργότερα και ανεξάρτητα από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Όμως, τελευταία δεδομένα συνηγορούν υπέρ ενός αρχικού ερεθίσματος – εναύσματος ασυμμετρίας και πολικότητας στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης που ενισχύεται στη συνέχεια από διαδοχικά επόμενα ερεθίσματα (Ciemerych et al., 2000; Gardner, 1997b; Zernicka-Goetz, 2004).

Αυτό το πρώτο ερέθισμα πιστεύεται πλέον πως ξεκινά με την πρώτη αυλάκωση. Μια σειρά γεγονότων πρωθύστερων της πρώτης αυλάκωσης έχει δειχθεί πως επηρεάζουν το επίπεδο και τον προσανατολισμό της. Συγκεκριμένα, το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου σε συνδυασμό με τη δεύτερη μειωτική διαίρεση αποτελούν τα πρώτα σημεία ορισμού του άξονα μεταξύ ζωϊκού (θέση ανάδυσης του δεύτερου πολικού σωματίου-ΔΠΣ) και φυτικού πόλου (θέση εισόδου του σπερματοζωαρίου), του καθορισμού του επιπέδου της πρώτης αυλάκωσης και του χρόνου της δεύτερης αυλάκωσης. Αυτά τα γεγονότα με τη σειρά τους παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της πρώτης ασυμμετρίας του πρώιμου εμβρύου (Weber et al., 1999).

Η αρχική αυτή ασυμμετρία επιτρέπει στο έμβρυο να αποκτήσει την πρώτη του, αν και όχι καθοριστική για τη συνέχεια, πολικότητα. Η πολικότητα γενικά συνιστά αναγκαίο αναπτυξιακό γεγονός, προκειμένου να υπάρξει προοδευτική αναπτυξιακή **δέσμευση** (commitment) και **εξειδίκευση** (specification) των κυττάρων: ήτοι να

κατευθυνθούν συγκεκριμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί προς συγκεκριμένες αναπτυξιακές πορείες, δίδοντας συγκεκριμένες δομές με τελικό αποτέλεσμα ένα σχέδιο σώματος πολυκύτταρου οργανισμού με περίπου 200 διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Η υπόθεση της απόκτησης της εμβρυϊκής πολικότητας μέσω μιας διαδικασίας που εξαρτάται και ίσως καθοδηγείται από την ασυμμετρία της αυλάκωσης προτείνει ότι η πολικότητα αναδύεται ως αποτέλεσμα του προτύπου αυλάκωσης και της σταδιακής ασυμμετρίας που αυτό δημιουργεί κατά τη διάρκεια των διαδοχικών αυλακώσεων. Το έναυσμα της πρώτης αυλάκωσης για τη μελλοντική πολικότητα του εμβρύου ενισχύεται στην πορεία και μέχρι το στάδιο του κυλίνδρου την E6,0, όπου πια είναι ορατός ο εμπρόσθιο-οπίσθιος άξονας του εμβρύου, από μια σειρά από παράγοντες ασυμμετρίας. Αρχικά από τις ασύμμετρες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων, στη συνέχεια μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών γενεαλογιών (cell lineages) της βλαστοκύστης και επιπλέον από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας που λαμβάνουν χώρα κατά την εμφύτευση. Άγνωστος παραμένει, ακόμα βέβαια, ο ακριβής μηχανισμός που χρησιμοποιούν όλοι οι παραπάνω παράγοντες.

A.4.4.2. Η πολικότητα της βλαστοκύστης ως αποτέλεσμα της ασυμμετρίας των πρώτων αυλακώσεων και η μοριακή της ταυτότητα

Το σημαντικό στοιχείο που χρήζει ιδιαίτερης μνείας είναι ότι το επίπεδο και ο προσανατολισμός της πρώτης αυλάκωσης έχει επιπλέον βρεθεί πως σχετίζονται με την οριοθέτηση μεταξύ εμβρυϊκής και εξωεμβρυϊκής περιοχής της μελλοντικής βλαστοκύστης (Zernicka-Goetz, 2005; Zernicka-Goetz et al., 2009). Συγκεκριμένα, το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου και συνεπακόλουθα αυτό του σχηματισμού του ΔΠΣ καθορίζουν το όριο μεταξύ των δύο αναπτυξιακά διακριτών περιοχών της βλαστοκύστης. Το επικρατές μοντέλο (εικόνα A.4) προτείνει ότι ο χωροταξικός απόγονος του σημείου εισόδου του σπερματοζωαρίου τοποθετείται στο στάδιο της βλαστοκύστης στα τροφοεξωδερμικά κύτταρα που βρίσκονται στο σύνορο μεταξύ EKM και βλαστόκοιλου καθορίζοντας την άκρη του αμφίπλευρου άξονα εκείνη τη στιγμή (Bischoff et al., 2008).

Καθένα από τα δύο βλαστομερίδια της πρώτης αυλάκωσης μπορεί να συνεισφέρει και στις δύο γενεαλογίες, εμβρυϊκή και εξωεμβρυϊκή, αλλά η συνεισφορά του καθενός λαμβάνει χώρα σε διαφορετικά τμήματα της βλαστοκύστης: το πρώτο δίδει γένεση κυρίως σε εσώτερα τμήματα της EKM και στο υπερκείμενο της πολικό τροφοεξώδερμα, ενώ το άλλο συνεισφέρει κυρίως στο τοιχωματικό τροφοεξώδερμα και στα επιφανειακά κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας που κείνται εγγύτερα στο βλαστόκοιλο. Και τα δύο κύτταρα πιστεύεται πως συνεισφέρουν στην οριακή ενδιάμεση ζώνη μεταξύ των δύο τμημάτων της βλαστοκύστης.

Ο μηχανισμός που καθορίζει ποιο βλαστομερίδιο θα ακολουθήσει την κάθε πορεία, εν πολλοίς άγνωστος, φαίνεται πως σχετίζεται με το χρόνο διαίρεσης του καθενός από αυτά. Μεταξύ των δύο διαιρέσεων των δύο βλαστομεριδίων παρατηρείται έλλειψη συγχρονισμού. Το βλαστομερίδιο που διαιρείται πιο νωρίς δίδει γένεση σε περισσότερα κύτταρα της EKM που θα ακολουθήσουν την εμβρυϊκή γενεαλογία.

Τα μόρια και οι μηχανισμοί που καθορίζουν την τοποθέτηση της εμβρυϊκής και εξωεμβρυϊκής γενεαλογίας στη βλαστοκύστη παραμένουν άγνωστοι. Πιθανός καθοριστής θεωρείται ο POU μεταγραφικός παράγοντας OCT4. Η μητρική πρωτεΐνη OCT4 είναι παρούσα στο ωάριο και μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων. Το ζυγωτικό γονίδιο OCT4 αρχίζει να εκφράζεται και στα 4 βλαστομερή του αντίστοιχου σταδίου. Στο μορίδιο εκφράζεται στα κύτταρα-προγόνους της EKM και στη συνέχεια στη

βλαστοκύστη στα κύτταρα της EKM και στα κύτταρα του ΠΕ, ενώ η έκφρασή του μειώνεται στα τροφοεξωδερμικά κύτταρα(Palmieri SL, 1994). Είναι απαραίτητος παράγοντας για το σχηματισμό της EKM, όπως δείχνουν τα μεταλλαγμένα ομόζυγα στελέχη, που συγκροτούνται στο στάδιο της βλαστοκύστης μόνο από τροφοεξώδερμα(Nichols J and Chambers I, 1998). Παρόλα αυτά, είναι άγνωστο ακόμα αν η αρχική πολικότητα της πρώτης αυλάκωσης σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης του(Niwa H, 2000).

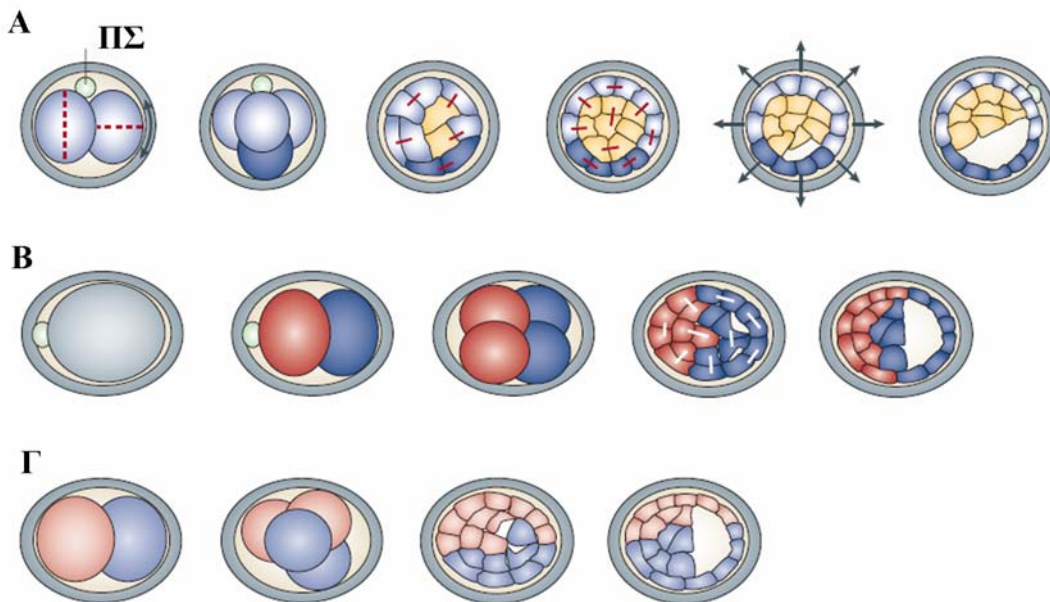
Ο μεταγραφικός παράγοντας NANOG (για πάντα νέος στα κέλτικα) που φέρει ομοιοεπικράτεια, χαρακτηριστική πρωτεϊνική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, αρχικά εκφράζεται στο μορίδιο, στη συνέχεια στην EKM και στην εγγύτερη επιβλάστη, αλλά δεν εκφράζεται στο τροφοεξώδερμα και το ΠΕ. Έμβρυα ομόζυγα για μεταλλαγμένη μορφή του NANOG σχηματίζουν μόνο ΠΕ και καθόλου επιβλάστη(Hyslop L and Przyborski S, 2005; Mitsui K and Takahashi K, 2003). Τη δράση των OCT4 και NANOG και πιθανώς και ενός τρίτου, του SOX2, φαίνεται ότι διατηρεί ο μεταγραφικός παράγοντας SAL4(Elling and Treier, 2006; Zhang and 8, 2006).

Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA6 που εκφράζεται μόνο στα κύτταρα του ΠΕ και όχι σε αυτά της EKM είναι υποψήφιος για τη δημιουργία της πολικότητας της βλαστοκύστης. Άλλος υποψήφιος παράγοντας είναι η πρωτεΐνη Taube nuss (Tbn) που φαίνεται πως απαιτείται για τη διατήρηση της EKM, όπως δείχνουν τα μεταλλαγμένα στελέχη που είναι φυσιολογικά στην πρώιμη βλαστοκύστη, αλλά στο όψιμο στάδιό της αποτελείται μόνο από τροφοεξώδερμα λόγω εκτεταμένου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στην EKM(Voss AK, 2000). Από την άλλη πλευρά, παράγοντες όπως οι T-box μεταγραφικοί παράγοντες EOMES και CDX2(al., 2003, 2005; Russ, 2000; Strumpf, 2005), που εκφράζονται στο τροφοεξώδερμα στο στάδιο της βλαστοκύστης, και οι ρυθμιστές του CDX2, TEAD4 και ELF5 είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη της τροφοεξωδερμικής γενεαλογίας(Loh, 2006). Ακόμα, ο αυξητικός παράγοντας Fgf4, που παράγεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα της EKM και προσλαμβάνεται από τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος μέσω του υποδοχέα Fgfr2, έχει προταθεί πως συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία.

Όλα τα παραπάνω μόρια, και ίσως και πολλά περισσότερα των οποίων την ύπαρξη ή το ρόλο αγνοούμε, συμμετέχουν σε ένα κύκλωμα ενεργοποίησης και καταστολής

παραγόντων απαραίτητων για την ενεργοποίηση και την καταστολή των διαφορετικών γενεαλογιών του σταδίου της βλαστοκύστης (εικόνα A.5A).

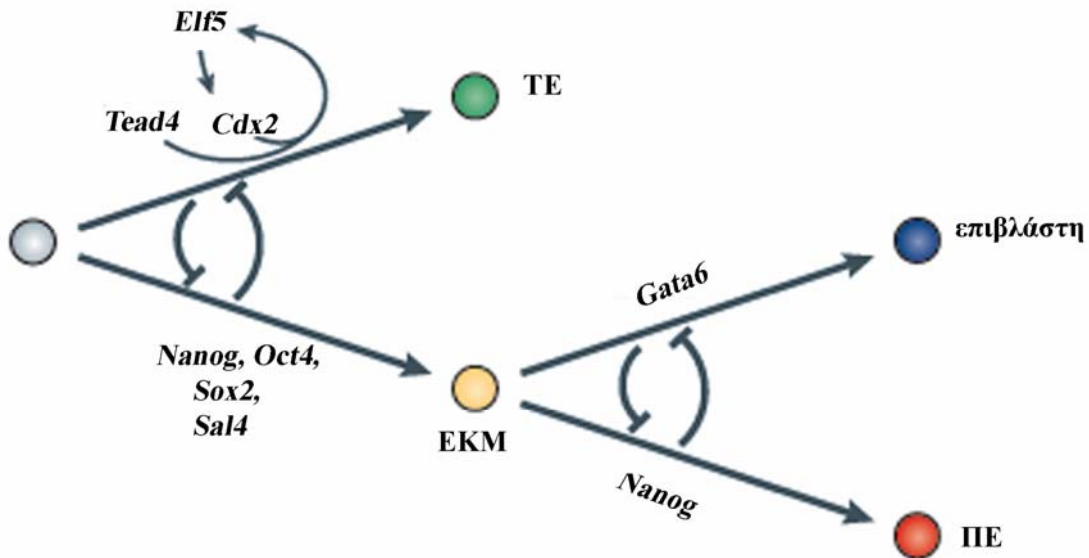
Η εγκαθίδρυση των γενεαλογιών του σταδίου της βλαστοκύστης και της συνακόλουθης πολικότητας του εμβρύου στο στάδιο αυτό είναι αποτέλεσμα δύο απανωτών σταδίων-κυμάτων απόφασης πεπωμένου, στις οποίες συμμετέχουν οι παραπάνω παράγοντες. Συγκεκριμένα, στο πρώτο κύμα λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός ανάμεσα στην εμβρυϊκή περιοχή της ΕΚΜ και την εξωεμβρυϊκή περιοχή του ΤΕ, ενώ στο δεύτερο ο διαχωρισμός ανάμεσα στην επιβλάστη και στο ΠΕ κατά το στάδιο της ύστερης βλαστοκύστης (Pedersen et al., 1986; Zernicka-Goetz, 2005; Zernicka-Goetz et al., 2009).

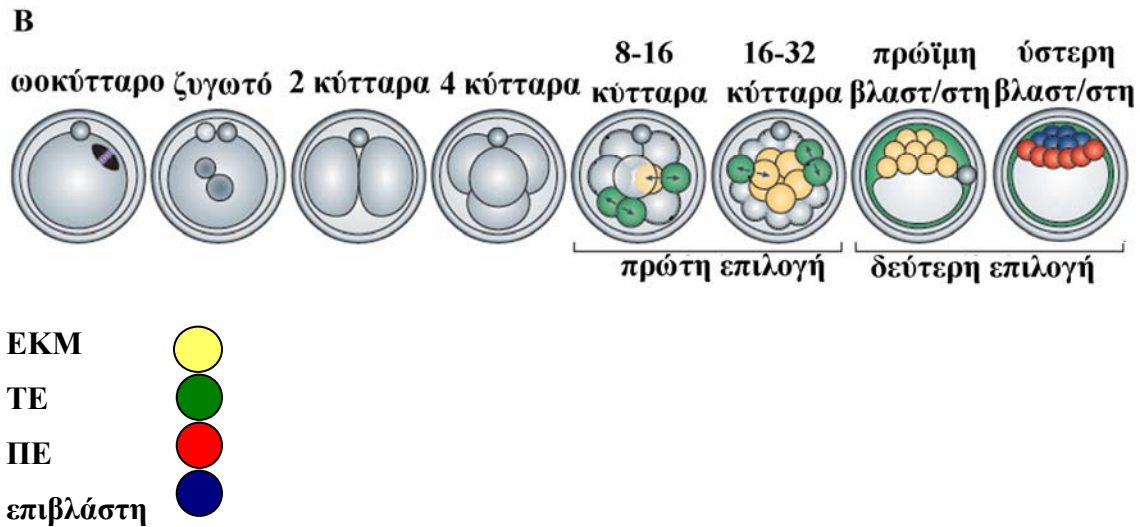


Εικόνα A.4: Μοντέλα για το σχηματισμό της βλαστοκύστης. A-B. Η επικρατούσα σήμερα υπόθεση σύμφωνα με την οποία το σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου που αντιστοιχεί στη θέση ανάδυσης του δεύτερου πολικού σωματίου ορίζει το χωροταξικό

όριο ανάμεσα στην εξωεμβρυϊκή και την εμβρυϊκή περιοχή της βλαστοκύστης. Ακόμα, το μοντέλο προτείνει ότι η προέλευση των δύο διακριτών περιοχών της βλαστοκύστης ξεκινάει ήδη από το στάδιο των των 2 κυττάρων. Οι απόγονοι του ενός από τα δύο (σκούρο μπλε), παρουσιάζουν την τάση για κύκλους συμμετρικών διαιρέσεων από το στάδιο των 8 κυττάρων που θα δώσουν γένεση στα εξωτερικά κύτταρα της ΕΚΜ, τα οποία είναι λιγότερα από τα εσωτερικά και με ασθενέστερες συνδέσεις μεταξύ τους, καθώς θα πρέπει να ελευθερώσουν χώρο για το υγρό του βλαστούκοιλου. Από τους απογόνους αυτού του κυττάρου προέρχεται και το τοιχωματικό τροφοεξώδερμα. Οι απόγονοι του έτερου κυττάρου στο στάδιο των 2 έχουν την τάση να δίδουν το πολικό τροφοεξώδερμα και την πλειοψηφία των των κυττάρων της ΕΚΜ. Ακόμα και αν συμπιέσουμε το ζυγωτό μέχρι του σημείου της ισοπέδωσης (B), μπορεί να αλλάζει ο εμβρυϊκός-εξωεμβρυϊκός άξονας σε σχέση με τον άξονα φυτικού-ζωϊκού πόλου, αλλά όχι και σε σχέση με το επίπεδο της πρώτης αυλάκωσης. Γ. Ένα εναλλακτικό πρότυπο βάσει του οποίου το υγρό του βλαστούκοιλου σωρεύεται ως απόκριση της πίεσης από τη διάφανη ζώνη, καθώς το έμβρυο των δύο κυττάρων επιμηκύνεται. Το πρότυπο αυτό δε σχετίζει το πρότυπο της πρώτης αυλάκωσης με τη δημιουργία της πολικότητας της βλαστοκύστης. ΠΣ: Πολικό Σωματίο, εξωτερικά κύτταρα με μπλε χρώμα, εσωτερικά με κίτρινο και οι κόκκινες γραμμές τα θηγατρικά κύτταρα. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της επέκτασης του βλαστούκοιλου. **Τροποποιημένη από (Zernicka-Goetz, 2005).**

A





Εικόνα Α.5: Η εγκαθίδρυση των κυτταρικών γενεαλογιών της βλαστοκύστης και η πολικότητα. Α. Εποπτική εικόνα των μεταγραφικών παραγόντων και των σχέσεων μεταξύ τους για την εγκαθίδρυση των γενεαλογιών της βλαστοκύστης. Τα βέλη υποδεικνύουν επαγωγή και τα μπλόκα την καταστολή. **Β.** Η εγκαθίδρυση της πολικότητας της βλαστοκύστης λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: στο πρώτο διαχωρίζονται τα κύτταρα της ΕΚΜ από αυτά του ΤΕ και στο δεύτερο μετά από επαγωγικές δράσεις, υτταρικές κινήσεις και απόπτωση ο διαχωρισμός ανάμεσα στο ΠΕ και στην επιβλάστη. ΕΚΜ:Εσωτερική Κυτταρική Μάζα, ΠΕ:Πρωτογενές Ενδόδερμα, ΤΕ: Τροφοεξώδερμα Τροποποιημένη από (Zernicka-Goetz, 2005).

A.4.4.3. Η πολικότητα της βλαστοκύστης λειτουργεί ως προάγγελος της εμπρόσθιο-οπίσθιας πολικότητας του μετεμφυτευτικού εμβρύου

Η πολικότητα της βλαστοκύστης συνδέεται με βάση πρόσφατα δεδομένα με την εμπρόσθιο-οπίσθια πολικότητα του μετεμφυτευτικού εμβρύου. Η πολικότητα αυτή αρχικά μεταφράζεται σε πολικότητα ανάμεσα στο τμήμα της επιβλάστης που βρίσκεται εγγύτερα στο υπερκείμενο εξωεμβρυϊκό εξώδερμα (εγγύς επιβλάστη-proximal epiblast) και στο τμήμα της εκείνο που βρίσκεται στο αντιδιαμετρικά αντίθετο άκρο (άπω επιβλάστη-distal epiblast). Τα κύτταρα του ΠΕ της βλαστοκύστης, τοποθετημένα κοντά στο σημείο του ζωϊκού πόλου δίδουν γένεση στο ΣΕ που επενδύει την επιβλάστη (απώτερο άκρο), ενώ τα αντιδιαμετρικώς κείμενα κύτταρα του ΠΕ δίδουν γένεση στο ΣΕ που επενδύει το ΕΕ (εγγύτερο άκρο)(Gardner, 1997a; Weber et al., 1999). Αυτό σημαίνει ότι η πολικότητα του ζωϊκού-φυτικού πόλου κληρονομείται στο στάδιο της επιβλάστης σε πολικότητα εγγύτερου-απώτερου άκρου του εμβρύου.

Στη συνέχεια αυτή η πολικότητα μεταφράζεται σε εμπρόσθιο-οπίσθια πολικότητα. Σηματοδοτικά μορια που προέρχονται από το ΕΕ και το ΣΕ και συγκεκριμένα ο εξωκρινής παράγοντας BMP4(Lawson KA and • Wright CVE, 1999), μέλος της υπερικογένειας Tgfβ, που εκρίνεται από το ΕΕ και οι BMP2 (Tgfβ), Amnionless και WNT3 που εκκρίνονται από το ΣΕ, είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία της αλλαντοΐδας, των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (primordial germ cells) και του εμβρυϊκού μεσοδέρματος, όλες δομές της οπίσθιας πλευράς του εμβρύου. Ο BMP4 ελέγχει άμεσα την έκφραση του T-box μεταγραφικού παράγοντα T (Brachyury στο Xenopus), ο οποίος θεωρείται καθοριστής της οπίσθιας-εγγύτερης πλευράς του εμβρύου κατά τη γαστριδίωση και ειδικότερα γονίδιο-μάρτυρας των πρόδρομων κυττάρων του εμβρυϊκού μεσοδέρματος(Winnier G, 1995). Ταυτόχρονα ο μεταγραφικός παράγοντας EOMES, εκφραζόμενος από το τροφοεξώδερμα της βλαστοκύστης ήδη, εκφράζεται στο ΕΕ μετεμφυτευτικά και ελέγχει την έκφραση των εξωκρινών παραγόντων Fgf8 και Wnt3, μαρτύρων της οπίσθιας-εγγύτερης πλευράς της επιβλάστης. Ο επίσης εξωκρινής παράγοντας NODAL, μέλος και αυτός της υπερικογένειας Tgfβ, που εκρίνεται αρχικά από τον κόμβο αλλά στη συνέχεια εκφράζεται σε όλη την επιβλάστη φαίνεται ότι ελέγχει την έκφραση των T, Fgf8 και Wnt3, μέσω των BMP4 και EOMES(Brennan J and EJ, 2001). Το ΣΕ αποτελεί και αυτό πηγή σημάτων που καθορίζουν τον οπίσθιο χαρακτήρα της αντίστοιχης πλευράς. Τα μόρια BMP2, AMNIONLESS και WNT3 παράγονται σε

αυτό και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία της αλλαντοΐδας, των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων-ΑΓΚ, των εμβρυϊκών πρόδρομων γαμετικών κυττάρων. Αυτό που προκύπτει συνολικά από τα παραπάνω είναι ότι ταυτόχρονες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΕΕ και επιβλάστης, ιδίως της εγγύτερης, καθορίζουν το πρότυπο του οπίσθιου εμβρύου. Δύο είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που παίζουν κυρίαρχο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία: τα Tgfβ και Wnt.

Την ίδια στιγμή το εμπρόσθιο τμήμα του ΣΕ (εμμπρόσθιο σπλγχνικό ενδόδεσμα-ΕΣΕ) έχειδειχθεί ότι είναι υπεύθυνο για την καταστολή της έκφρασης των παραπάνω «οπισθιογενών» παραγόντων στο εμπρόσθιο άκρο του εμβρύου. Ήδη πριν από το σχηματισμό της αρχικής λωρίδας κυτταρικοί πληθυσμοί από το απώτερο άκρο του κυλίνδρου που εκφράζουν το γονίδιο Hex μεταναστεύουν προς την εμπρόσθια πλευρά σχηματίζοντας το ΕΣΕ (Beddington RSP, 1999; Thomas P, 1996; Thomas PQ and Development 1998, 1998). Η παρουσία τους εκεί συνοδεύεται από την έκφραση γονιδίων που έχει προταθεί ότι δρουν ανταγωνιστικά προς τη δράση των Tgfβ και Wnt σηματοδοτικών μονοπατιών που δρουν στη οπίσθια πλευρά. Τέτοιοι είναι οι Dkk1, Cer1 και Lefty1. Ακόμα τα μεταλλαγμένα στελέχη για τα γονίδια του ΣΕ Foxa2 (Hnf3β), Lim1 ή του Smad2, μεταγωγέα σήματος του Nodal, αναγκαίου για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων αποτελούνται από έμβρυο με απώλεια της εμπρόσθιας - οπίσθιας ασυμμετρίας, οπίσθια ταυτότητα και έκφραση σε όλη την επιβλάστη των T, Fgf8 και Nodal (Waldrip WR, 1998).

Μόρια καθοριστικά για την εγκαθίδρυση της εμπρόσθιας - οπίσθιας ασυμμετρίας πιστεύεται ότι αποτελούν και τα Otx2 και Cripto με αντίρροπες και αλληλοσυμπληρούμενες δράσεις για την επίτευξη της ασυμμετρίας. Το Otx2, γενικά γονίδιο του αδιαφοροποίητου εξωδέρματος με ρόλο και στη νευρική εξειδίκευση στα επόμενα στάδια, εκφράζεται στο στάδιο του μετεμφυτευτικού κυλίνδρου στο ΕΣΕ, και καταστέλλει την έκφραση των «οπισθιογενών» γονιδίων στην εμπρόσθια πλευρά. Αυτό που είναι σημαντικό είναι ότι το ΕΣΕ από μόνο του δεν μπορεί να επάγει την έκφραση των πρώιμων νευροειδικών γονιδίων, παρά μόνο να διατηρήσει την εμπρόσθια πλευρά δεκτική σε μελλοντικά σήματα που θα της προσδώσουν νευροεξωδερμικό χαρακτήρα, μια υπόθεση που έχειδειχθεί και στο Xenopus. Από την άλλη πλευρά το Cripto εκφράζεται στην αρχική λωρίδα και συμμετέχει στην απόκτηση οπίσθιας ταυτότητας στην πλευρά που βρίσκεται η αρχική λωρίδα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αναγκαιότητα

του Nodal μονοπατιού, και μάλιστα του κλάδου που συμμετέχει και ο καταρροϊκός του Nodal μεταγωγέας σήματος Smad2, για την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων του ΕΣΕ που οδηγούν στην απόκτηση του εμπρόσθιου χαρακτήρα της αντίστοιχης πλευράς. Αποδεικνύει έτσι το διττό του αναπτυξιακό ρόλο, πέρα από την επαγωγή του μεσοδέρματος και στη διατήρηση της απαραίτητης γονιδιακής έκφρασης στο ΕΕ.

Το ΟΕ αναδύεται κατά τη διάρκεια του σταδίου του κυλίνδρου από την οπίσθια αρχική λωρίδα πριν από το σχηματισμό του κόμβου. Μετακινείται εμπρόσθια, όπου αντικαθιστά το ΕΣΕ και επενδύει εξωτερικά το μελλοντικό νευροεξώδερμα, όπου εκφράζει γονίδια που εκφράζει και το ΕΣΕ (Hex, Cer1)(Lawson KA, 1987; Tam PP, 1992). Απομάκρυνση του οδηγεί σε ελαττωματικό σχηματισμό του εμπρόσθιου νευροεξώδερματος. Αυτό είναι πολύ σημαντικό και τοποθετεί το ΟΕ στους πιθανούς υπεύθυνους, μαζί με άλλα παράγωγα της εμπρόσθιας αρχικής λωρίδας, της δημιουργίας του προτύπου της εμπρόσθιας πλευράς του εμβρύου(Camus A and Wakamiya M, 2000; Martinez Barbera JP and •• Kioussis D, 2000). Συνολικά για το ενδόδερμα μπορούμε να πούμε ότι το ΕΣΕ φαίνεται πως διατηρεί αρχικά την εμπρόσθια πλευρά δεκτική για την απόκτηση νευροεξωδερμικού χαρακτήρα και το ΟΕ συμμετέχει αργότερα στην απόκτηση αυτού. Έτσι το ενδόδερμα συμβάλλει στην απόκτηση της εμπρόσθιο-οπίσθιας πολικότητας του εμβρύου. Η μεγάλη πρόκληση είναι η διαλεύκανση των ακριβών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ΣΕ, ΕΣΕ και μη, και της επιβλάστης που οδηγούν σε αυτό το ρόλο του ενδοδέρματος. Τέλος, είναι αναγκαίο να τονιστεί ότι γονίδια-μάρτυρες του μετεμφυτευτικού κυλίνδρου, όπως ο Fgf5(IJEAN M. HUBERT, 1990), δεν έχουν εξακριβωμένο ρόλο στις παραπάνω διαδικασίες.

A.5. Μοντέλα και εργαλεία μελέτης της πρώιμης ανάπτυξης του ποντικού

A.5.1. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα – EBK (Embryonic Stem Cells-ESC)

A.5.1.1. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (EBK) και οι μοναδικές τους ιδιότητες

Ήταν πριν από 4 δεκαετίες περίπου, όταν η μελέτη των τερατοκαρκινωμάτων, κακοήθων όγκων που αποτελούνται από κυτταρικούς τύπους προερχόμενους και από τα τρία βλαστικά δέρματα (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα), έδειξε ότι ανάμεσα στα διαφοροποιημένα κύτταρα των όγκων υπάρχουν και αδιαφοροποίητα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, που ονομάστηκαν εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα-EKK (embryonic carcinoma cells-ECC), μπορούν να αναπτυχθούν σε κυτταροκαλλιέργεια για μεγάλο διάστημα, αποτελώντας την πηγή κυτταρικών σειρών. Οι διάφορες κυτταρικές σειρές τερατοκαρκινωματικής προέλευσης παρουσιάζουν εντούτοις μεταξύ τους διαφορές. Οι διαφορές τους αφορούν τη δυνατότητά τους να διαφοροποιηθούν *in vivo* ή *in vitro*, το φυσιολογικό ή μη καρυότυπό τους και την αναγκαιότητα για τροφοδοτικά κύτταρα μη διαιρούμενων ινοβλαστών (feeder cells – inactive fibroblasts), προκειμένου να καλλιεργηθούν επί μακρόν *in vitro*. Οι διαφορές τους οφείλονται κυρίως στη διαφορετική προέλευση του τερατοκαρκινώματος: μπορεί να αναπτύσσεται στους όρχεις, στις ωοθήκες ή να είναι εμβρυϊκής προέλευσης. Η πιο σημαντική ιδιότητα όμως των EKK είναι ότι μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη χμαιοκικών ατόμων όταν ενεθούν σε βλαστοκύστες. Αν και τα άτομα που προκύπτουν εμφανίζουν σε μεγάλα ποσοστά καρκίνους, η ιδιότητά τους αυτή δείχνει τη δυνατότητα που διαθέτει ένα καρκινικό κύτταρο να επανέλθει στη φυσιολογική συμπεριφορά, αν βρεθεί σε κατάλληλο μικροπεριβάλλον.

Αυτή τους η ιδιότητα οδήγησε τους Evans και Kaufmann στην υπόθεση ότι πρέπει να υπάρχει ένας φυσιολογικός κυτταρικός πληθυσμός σε κάποιο σημείο της ανάπτυξης του οργανισμού με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των EKK. Και μάλιστα, ότι το σημείο αυτό της ανάπτυξης πρέπει να βρίσκεται κοντά στο στάδιο της βλαστοκύστης, αφού τα πειράματα ενέσεων σε βλαστοκύστες έδειξαν ότι τα EKK βρίσκονται σε μικροπεριβάλλον οικείο. Πράγματι, η υπόθεση αποδείχθηκε σωστή και οδήγησε στην πρώτη απόμονωση και ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργεια των πρώτων εμβρυονικών

βλαστικών κυττάρων-EBK από την EKM της βλαστοκύστης ποντικού (Evans and Kaufman, 1981).

Τα EBK διαθέτουν ιδιότητες μοναδικές σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη κυτταρική σειρά προερχόμενη από φυσιολογικό ιστό (Keller, 2008). Πρόκειται για κύτταρα αδιαφοροποίητα, ταχέως πολλαπλασιάζομενα, όπως και ο *in vivo* αντίστοιχος πληθυσμός της EKM. Η κυτταρική διαίρεσή τους, ενώ διατηρούν τον αδιαφοροποίητο χαρακτήρα τους, ονομάζεται **αυτο-ανανέωση** (self-renewal). Δύνανται δε να αυτο-ανανεώνονται *in vitro* θεωρητικά επ' άπειρον διατηρώντας το φυσιολογικό καρυότυπο. Οι αναφορές μέχρι τώρα μιλούν για διατήρηση σε καλλιέργεια για τουλάχιστον 250 ανακαλλιέργειες (passages), που σημαίνει 500-1250 ημέρες ανάλογα με την πυκνότητα της καλλιέργειας. Η δεύτερη χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι ότι μπορούν να διατηρούν το **αναπτυξιακό δυναμικό** του *in vivo* πατρικού πληθυσμού τους, το οποίο σημαίνει **διατήρηση της πλειοδυναμίας** τους *in vitro*. Αυτό αποδεικνύει η δημιουργία γόνιμων χμιαϊκών απογόνων, όταν ενεθούν σε βλαστοκύστες, τα οποία περιέχουν απογόνους του ενεθούς πληθυσμού σε όλους τους ιστούς του ενήλικου οργανισμού συμπεριλαμβανομένης και της γαμετικής σειράς. Επιπλέον, τα EBK δύνανται να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε όλους τους διαφοροποιημένους κυτταρικούς τύπους με υψηλά ποσοστά ομοιογένειας. Αυτό προσδίδει στα EBK *in vitro* πλαστικότητα που συνάδει με το αναπτυξιακό δυναμικό τους. Επίσης, η υποδόρια εμφύτευση EBK καθώς και η εμφύτευση τους στη νεφρική κάψα ή στους όρχεις ανοσοκατεσταλμένων ζώων – δεκτών δημιουργεί τερατώματα. Η ικανότητα γένεσης τερατωμάτων είναι άλλη μια επιβεβαίωση του πλειοδύναμου χαρακτήρα τους.

Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι, εκτός από τα EBK, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ποντικού κύτταρα με χαρακτηριστικά πλειοδυναμίας έχουν απομονωθεί επίσης και από τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα-ΑΓΚ, τους κυτταρικούς πρόδρομους της γαμετικής σειράς. Τα τελευταία γεννώνται κατά την E8,5 στο οπίσθιο έμβρυο κατά τη γαστριδίωση. Από αυτά απομονώνονται τα εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα-ΕΓΚ, τα οποία μπορούν να επανεισαχθούν σε βλαστοκύστες και να δώσουν γόνιμες χίμαιρες, εμφανίζουν ήτοι πλειοδύναμο χαρακτηριστικά.

EBK έχουν απομονωθεί και από τη βλαστοκύστη του ανθρώπινου εμβρύου, καθιστώντας τη χρησιμότητα των EBK ακόμα πιο εμφανή (Irene Ginis et al., 2004; Thomson et al., 1998).

Τέλος, θα ήταν παράλειψη αν δε αναφερόμασταν στα τελευταία ευρήματα που έφεραν στο φως τη δημιουργία των επαγόμενων πλειοδύναμων βλαστικών κυττάρων – **ΕΠΒΚ(induced pluripotent stem cells-iPS cells)**. Δείχθηκε ότι αρκεί η παρουσία 4 μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την πλειοδυναμία, των Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc για να επαναπρογραμματιστεί ένα ανθρώπινο σωματικό κύτταρο ποικίλης ιστικής προέλευσης σε κύτταρο με χαρακτήρα πλειοδύναμου (Takahashi K, 2007; Wernig et al., 2007; Yu J, 2007). Αυτή είναι και η πιο πρόσφατα ανακαλυμμένη κατηγορία πλειοδύναμων κυττάρων. Τα νέα αυτά ευρήματα πραγματικά έδωσαν νέα ώθηση στο χώρο του αναπτυξιακού επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων (reprogramming of somatic cells) με ταυτόχρονα μεγάλες προεκτάσεις για την αναγεννητική ιατρική. Κυρίως όμως από την οπτική της βασικής έρευνας ειδωμένα, τα ΕΠΒΚ είναι ένα βήμα προς τα εμπρός για την κατανόηση της βιολογίας των EBK και του φαινομένου της πλειοδυναμίας (Holm Zaehres¹ and Hans R. Schöler¹, 2007).

A.5.1.2. Η χρησιμότητα των EBK

Οι μοναδικές ιδιότητες των EBK τα ανέδειξαν ως το πιο δυναμικό εργαλείο μελέτης της ανάπτυξης των θηλαστικών. Το μεγάλο ενδιαφέρον επεκτάθηκε και σε άλλους οργανισμούς και κυρίως στον άνθρωπο. Και επρεπε να περάσουν σχεδόν 20 χρόνια για να φτάσουμε το 1998 στην απομόνωση των πρώτων ανθρώπινων EBK. Η χρήση των EBK έχει σήμερα δύο κατευθύνσεις.

Πρώτον, είναι το πιο αξιόπιστο εργαλείο μελέτης της ανάπτυξης των θηλαστικών. Δεν είναι μόνο το γεγονός ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της πρώιμης ανάπτυξης και των ιδιοτήτων του *in vivo* πατρικού τους πληθυσμού. Η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται *in vitro* σε όλα τα διαφοροποιημένα παράγωγα και να αποκρίνονται *in vitro* σε σηματοδοτικά μόρια που συμμετέχουν *in vivo* στην ανάπτυξη μας επιτρέπει να τα χρησιμοποιήσουμε για τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν βασικές αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως είναι η διαφοροποίηση.

Επιπλέον, η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται προς όλες τις κατευθύνσεις, και μάλιστα ομοιογενώς, έχει δημιουργήσει βάσιμη προσδοκία ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή καθαρών διαφοροποιημένων και ευάριθμων κυτταρικών πληθυσμών για θεραπευτική χρήση (Charles E. Murry¹ and Gordon Keller², 2008). Η ανακάλυψη των ΕΠΒΚ έδωσε νέα πνοή σε αυτές τις προσπάθειες, αφού τώρα τίθενται οι προϋποθέσεις υπερκερασμού των ηθικών σκοπέλων που σχετίζονται με τη χρήση ανθρώπινων εμβρύων για την απομόνωση πλειοδύναμων κυττάρων καθώς και των προβλημάτων ιστοσυμβατότητας μοσχευμάτων. Τα ΕΠΒΚ υπόσχονται λύσεις για τον καθένα από τα δικά του σωματικά κύτταρα.

Τα EBK είναι το εργαλείο για να αποκτήσουμε γνώση των μηχανισμών που ελέγχουν το δυσπρόσιτο και ολιγοκύτταρο πρώιμο έμβρυο και για να παράγουμε καθαρούς πολυπληθείς πληθυσμούς για θεραπευτική χρήση (BOHELER, 2005).

Τέλος, και σε συνδυασμό με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας, τα ταχέως αυτο-ανανεούμενα EBK που αναπτύσσονται σε μεγάλους αριθμούς, είναι δεκτικά σε σπάνια γεγονότα μετασχηματισμού (transformation), όπως είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination) ανάμεσα στο γενωμικό DNA του EBK δέκτη και το εξωγενές DNA, κατά τον οποίο γίνεται ένθεση του εξωγενούς DNA μόνο στη συγκεκριμένη θέση. Αυτό έχει επιτρέψει τη χρήση τους για τη στοχευμένη αδρανοποίηση (knock out) μεμονωμένων γονιδίων, την υπό συνθήκη αδρανοποίηση

(conditional knock out) ή την αντικατάστασή τους από ένα άλλο (knock in). Η χρήση γονιδίων αναφοράς (reporter genes), των οποίων τα προϊόντα ανιχνεύονται εύκολα, και γονιδίων επιλογής (π.χ. ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά) μας επιτρέπουν να παίρνουμε καθαρούς πληθυσμούς των μετασηματισμένων κυττάρων. Στη συνέχεια αυτοί οι καθαροί πληθυσμοί μπορούν να ενεθούν σε βλαστοκύστη και να δώσουν χιμαιρικά άτομα. Η διασταύρωση των χιμαιρικών ατόμων δίνει και κάποιους ετερόζυγους απογόνους. Η διασταύρωση των τελευταίων δίνει με μενδελικές αναλογίες και ομόζυγα μεταλλαγμένα στελέχη. Αυτή η διαδικασία έχει αποδειχθεί εξαιρετικά δυναμική για την αξακρίβωση του λειτουργικού ρόλου γονιδίων, για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασής τους και για τη διαλεύκανση της συμμετοχής γονιδίων σε ασθένειες (μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών).

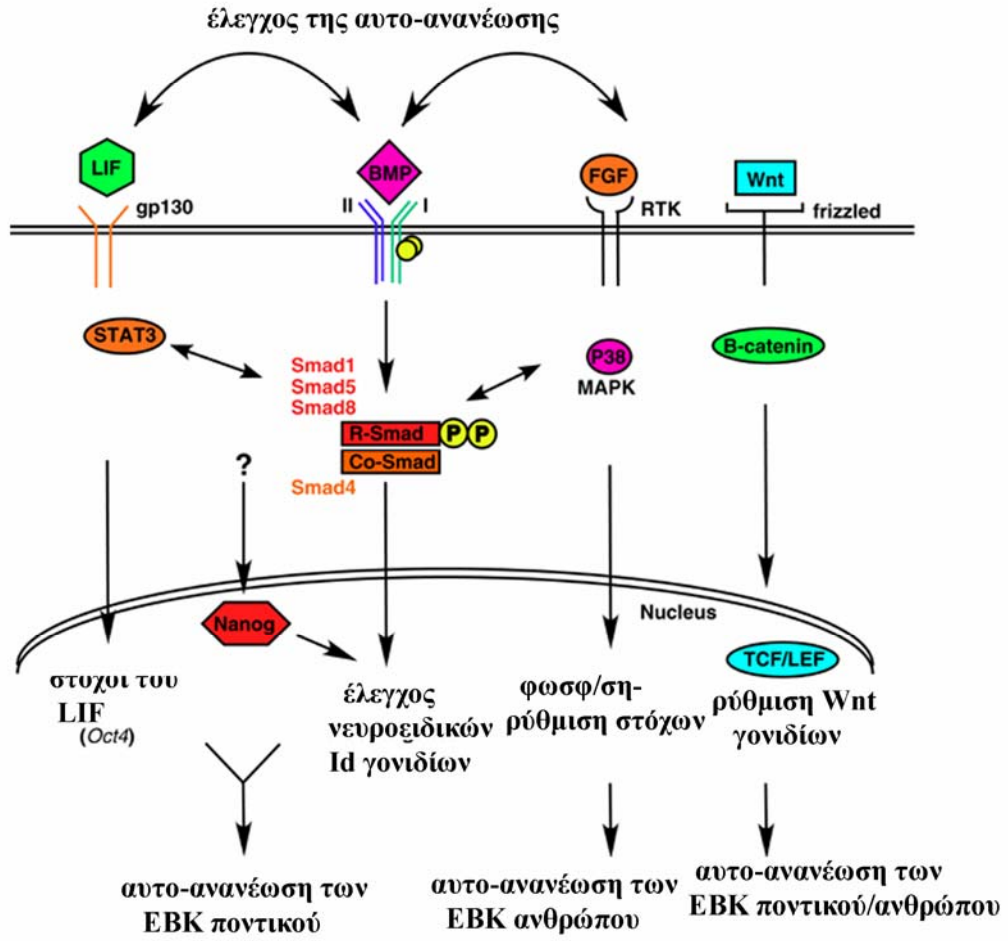
A.5.1.3. Οι μοριακές προϋποθέσεις της διατήρησης της πλειοδυναμίας των EBK και η μοριακή τους ταυτότητα

A.5.1.3.1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι απαραίτητα για την ταυτότητα των EBK

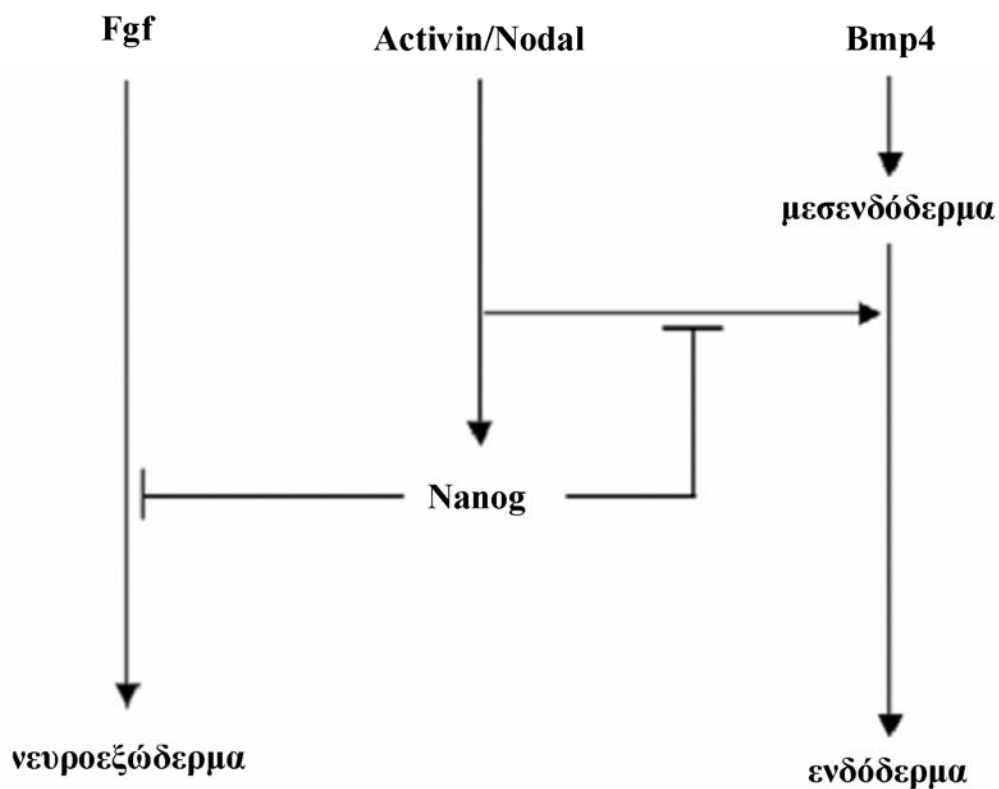
Καθίσταται σαφές ότι ο δρόμος για την αποτελεσματικότερη χρήση των EBK διέρχεται μέσα από τη στενωπό της διαλεύκανσης της βιολογίας τους. Τα EBK απαιτούν συγκεκριμένο περιβάλλον για να διατηρήσουν την πλειοδυναμία τους και το δυναμικό αυτο-ανανέωσής τους. Τα EBK απαιτούν την ύπαρξη στρώματος υποκείμενων μη διαιρούμενων ινοβλαστών παρουσία ορού για τη διατήρησή τους σε καλλιέργεια. Οι ινοβλάστες παρέχουν στα EBK τον εξωκρινή παράγοντα Bmp4, μέλος της υπερικογένειας των εξωκρινών μορίων Tgfb, και την κυτοκίνη LIF (Leukemia Inhibitory Factor), μέλος του Jak/Stat σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο εμπλέκεται γενικά στη διατήρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Burdon, 2002). Είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν τα EBK παρουσία του LIF, απουσία ινοβλαστών με επιλογή κατάλληλου υποκαταστάτη ορού, το οποίο δείχνει ότι ο Bmp4 είναι βοηθητικός αλλά όχι απαραίτητος παράγοντας για την αυτό-ανανέωση των EBK αυτή καθεαυτή. Έχει προταθεί πως ο Bmp4 επάγει την ενεργοποίηση των γονιδίων Id που καταστέλλουν τη διαφοροποίηση (Ying, 2003). Από τον LIF, που είναι απαραίτητος για την αυτό-ανανέωση, χρειάζεται και επιπλέον χορηγούμενη ποσότητα που προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας. Απουσία του LIF επιφέρει τη διαφοροποίηση των EBK. Μόνο η υπερέκφραση του Stat3 ή του Nanog (Chambers, 2003; Mitsui, 2003) έχει δειχθεί ότι μπορεί να διασώσει το φαινότυπο των EBK (Matsuda, 1999). Ο LIF και in vivo συμμετέχει στην πρώιμη ανάπτυξη, αλλά δεν είναι απαραίτητος για το στάδιο της βλαστοκύστης. Εκκρίνεται από το τροφοεξώδερμα και προσλαμβάνεται από τα κύτταρα της EKM μέσω του υποδοχέα του gp130. Το knock out στέλεχος για τον υποδοχέα, παρά το γεγονός ότι διέρχεται από τις E3,5-E4,5 ημέρες φυσιολογικά, πεθαίνει πολύ αργότερα στις E12,5, ενώ το αντίστοιχο στέλεχος για τον LIF αναπτύσσεται φυσιολογικά. Έχει προταθεί ότι ο LIF εκκρινόμενος από τη μήτρα προεμφυτευτικά, σταματάει το σχηματισμό του πρωτογενούς εξωδέρματος in vitro (LEDER, 1992). Ακόμα και το knock out στέλεχος για τον καταρροϊκό μεταγραφικό παράγοντα Stat3 του Jak/Stat μονοπατιού διέρχεται από το στάδιο της βλαστοκύστης και αναπτύσσεται μέχρι

το μετεμφυτευτικό κύλινδρο την E6,0, οπότε και πεθαίνει. Αυτό το γεγονός αναδεικνύει και τους περιορισμούς της κυτταροκαλλιέργειας να μιμηθεί την in vivo ανάπτυξη, καθώς υποδεικνύει ότι και άλλοι παράγοντες εμπλέκονται στην ταυτότητα της EKM in vivo, οι οποίοι δεν υπάρχουν στο περιβάλλον της in vitro καλλιέργειας. Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι και το Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι πιθανότατα συμμετέχει στη διατήρηση της πλειοδυναμίας των EBK μέσω ενός άγνωστου ακόμα μηχανισμού, που πάντως φαίνεται ότι σχετίζεται με το Jak/Stat μονοπάτι(Sato, 2004). Αυτό που παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον είναι ότι τα ανθρώπινα EBK δε φαίνεται ότι απαιτούν τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια για να διατηρήσουν την ταυτότητά τους. Συγκεκριμένα , ενώ για τη διατήρηση των EBK των ποντικών απαιτείται η δράση του Jak/Stat και συμμετέχουν και τα Wnt και Bmp4 μονοπάτια (εικόνα A.6.A), για τα ανθρώπινα φαίνεται ότι δεν απαιτείται το Jak/Stat, αλλά το Nodal/Activin, που είναι παρακλάδι του Tgfβ, και το Fgf και μάλιστα κεντρικό ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζει εδώ το Nanog (LEI XIAO, 2006; Ludovic Vallier*, 2005)(εικόνα A.6.B).

A



B



Εικόνα Α.6: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τα EBK ποντικού και ανθρώπου. Α. Στον ποντικό παίζουν ρόλο τα μονοπάτια Jak/Stat, Wnt, Bmp. Β. Στα EBK του ανθρώπου τον έλεγχο ασκούν τα μονοπάτια Fgf και Nodal/Activin και μάλιστα μέσω του Nanog. Κάθε μονοπάτι εκτελεί διακριτή λειτουργία για τη διατήρηση της πλειοδυναμίας και την ικανότητα αυτο-ανανέωσης των EBK. EBK: Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα. Τροποποιημένη από (Ludovic Vallier et al., 2009)

A.5.1.3.2. Το μεταγραφικό κύκλωμα της πλειοδυναμίας

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι ενεργά για τη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης των EBK έχουν ως τελικό αποδέκτη της δράσης τους τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων κομβικών για τη διατήρηση της πλειοδυναμίας. Στο επίκεντρο των ευρυμάτων έχει βρεθεί ένας μικρός αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν επιβεβαιωμένο ανάλογο ρόλο και *in vivo* στην πρώιμη ανάπτυξη. Μάλιστα, οι παράγοντες αυτοί συγκροτούν μεταγραφικό κύκλωμα, με την έννοια ότι αλληλορυθμίζονται, με τον καθένα να ρυθμίζει την έκφραση των άλλων αλλά και του εαυτού του. Ο σκληρός πυρήνας των μεταγραφικών παραγόντων περιλαμβάνει τους Oct4, Nanog, Sox2 (εικόνα A.7.A). Το ενδιαφέρον έγκειται στο ότι οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες επιτελούν την ίδια λειτουργία και στα ανθρώπινα EBK, μολονότι τα αναγκαία αναρροϊκά (*upstream*) σηματοδοτικά μονοπάτια διαφέρουν, όπως είδαμε(Boyer LA, 2005). Η βασική αποστολή του μεταγραφικού κυκλώματος είναι διττή: αφενός να καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που επάγονται κατά τη διαφοροποίηση ή επάγουν τη διαφοροποίηση προς διαφορετικές κατευθύνσεις και αφετέρου να προάγει την αυτό-ανανέωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EBK, διατηρώντας την έκφραση γονιδίων που απαιτούνται για την πλειοδυναμία(Sharov, 2008). Οι ρόλοι του κάθε μέλους του κυκλώματος, διακριτοί όπως προκύπτει, έρχονται σταδιακά στο φως, τόσο σε ό,τι αφορά τη διατήρηση της πλειοδυναμίας στα EBK όσο και *in vivo* στην πρώιμη ανάπτυξη.

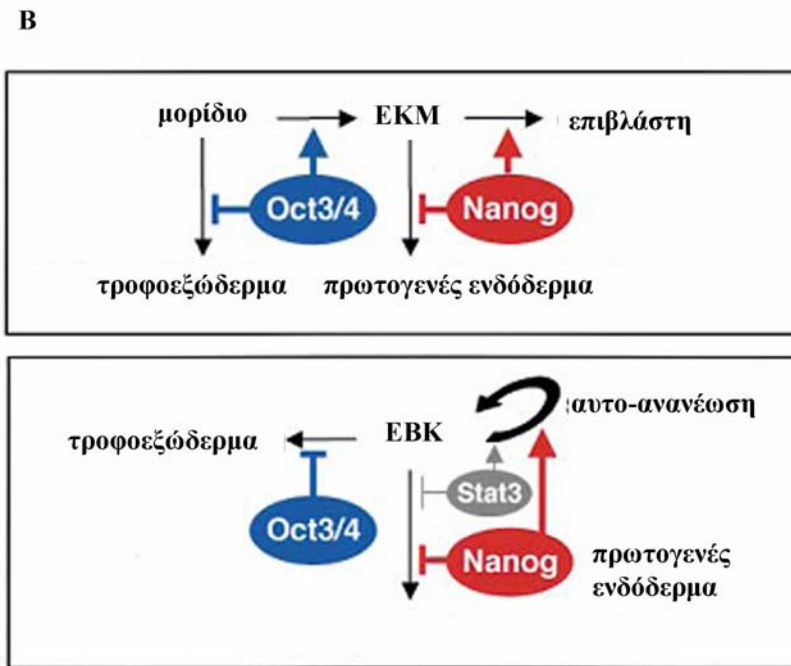
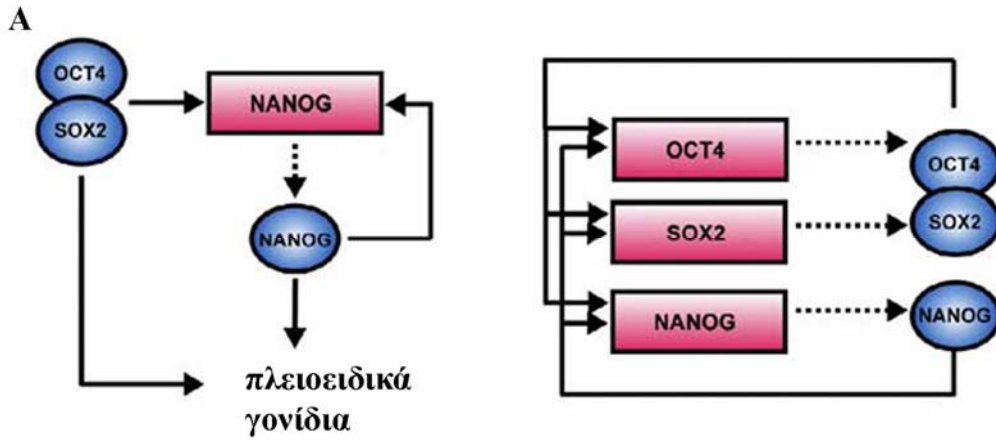
Το γονίδιο **Oct4**, μεταγραφικός παράγοντας με πρότυπο έκφρασης μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης ήδη περιγεγραμμένο, συνεχίζει να εκφράζεται ομοιογενώς και στη μετεμφυτευτική επιβλάστη, ενώ απουσιάζει από όλους τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Κατά τη γαστριδίωση η έκφρασή του περιορίζεται στα ΑΓΚ και επίσης σε όγκους προερχόμενους από γαμετικά κύτταρα. Διατηρούνται κάποια επίπεδα έκφρασης σε νησίδες κυττάρων σε διάφορους εμβρυϊκούς και ενήλικους ιστούς, που το συσχετίζουν με την παρουσία θύκων βλαστικών κυττάρων και τις δυνατότητες αναγέννησης. Σε κυτταροκαλλιέργεια EBK η στοχευμένη αδρανοποίηση ή η πτώση των επιπέδων έκφρασης του Oct4 κατευθύνει τα κύτταρα να αποκτήσουν μόνο χαρακτήρα τροφοεξωδερμικό. Αντίθετα, η αύξηση των επιπέδων του οδηγεί σε παραγωγή κυτάρων με χαρακτήρα είτε ΠΕ είτε μεσοδέρματος(Jennifer Nichols et al., 1998). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τον πιθανό ρόλο των επιπέδων του Oct4 στον καθορισμό

των διαφορετικών κυτταρικών τύπων της πρώιμης ανάπτυξης και ότι η διατήρηση της πλειοδυναμίας είναι συνδεδεμένη με τα επίπεδα έκφρασής του. Και επιπλέον, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι βασικός μηχανισμός, μέσω του οποίου ο OCT4 διατηρεί την πλειοδυναμία είναι η παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των EBK ή της EKM προς τροφοεξώδερμα (εικόνα A.7.B).

Η έκφραση του Oct4 ελέγχεται από το SOX2(Masui, 2007). Η πρωτεΐνη OCT4 ελέγχει την έκφραση μιας σειράς καταρροϊκών (downstream) γονιδίων. Ο έλεγχος της έκφρασης γίνεται με δύο τρόπους: είτε επάγοντας την έκφραση γονιδίων πλειοδυναμίας, όπως αυτά για τον μεταγραφικό παράγοντα Rex1, το μεταγραφικό παράγοντα Zfp206(Zheng-Xu Wang and Stanton, 2007) και τον επίσης μεταγραφικό παράγοντα Klf4(Yuhki Nakatake and Kiyohito Yagi, 2006) και τον εξωκρινή παράγοντα Fgf4 που εκφράζεται στην EKM και διαδραματίζει ρόλο στη διαμόρφωση του τροφοεξωδέρματος, είτε καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που κατευθύνουν τη διαφοροποίηση, όπως τα Osteopontin και Hnad1. Αυτές τις λειτουργίες τις επιτελεί σε συνεργασία με το SOX2. Ο έλεγχος της έκφρασης γίνεται άμεσα μέσω πρόσδεσης του OCT4 στους υποκινητές και ενισχυτές (ρυθμιστικές αλληλουχίες) των γονιδίων-στόχων. Ο OCT4 μπορεί να έχει επαγωγική ή κατασταλτική δράση ως POU μεταγραφικός παράγοντας που προσδέεται σε οκταμερή DNA. Επίσης, ο γενετικός τόπος του Oct4 διαθέτει απομακρυσμένο ενισχυτή (distal enhancer), στον οποίο προσδέεται και ο ίδιος και ο οποίος ενισχυτής είναι ενεργός μέχρι και το στάδιο της επιβλάστης in vivo και στα EBK in vitro, αλλά καθίσταται ανενεργός μετά τη γαστριδίωση και κατά τη διαφοροποίηση των EBK αντίστοιχα(Joon-Lin Chew et al., 2005).

Ο OCT4 συνεργάζεται άμεσα ή έμμεσα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την πρόσδεση στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων – στόχων. Ένας από αυτούς είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NANOG(Yuin-Han Loh et al., 2006), του οποίου το πρότυπο της in vivo έκφρασης μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης έχει επίσης περιγραφεί. Ο Nanog, σε αντίθεση με τον Oct4 που σταδιακά περιορίζει την έκφρασή του στον πλειοδύναμο πληθυσμό της επιβλάστης, απουσιάζει εξ αρχής από οποιοδήποτε εξωεμβρυϊκό ιστό και εκφράζεται ομοιογενώς στην επιβλάστη(Chambers, 2003; Mitsui, 2003). Η έκφρασή του μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση που ακολουθεί τη γαστριδίωση. Στη συνέχεια απαντάται μόνο στα ΑΓΚ και τα ΕΓΚ καθώς και σε θώκους ενήλικων ιστών, όπου εικάζεται ότι υπάρχουν πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων.

Στα EBK ο NANOG είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης. Μεταλλαγμένα ομόζυγα στελέχη EBK για το Nanog διαφοροποιούνται προς κύτταρα με χαρακτήρα ΠΕ (Takashi Hamazaki¹, 2004). Ο NANOG πιστεύεται ότι καταστέλλει την έκφραση γονιδίων διαφοροποίησης και συγκεκριμένα αυτών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ΠΕ. Έχουν βρεθεί περιοχές πρόσδεσης του NANOG στον ενισχυτή του μεταγραφικού παράγοντα Gata6 που εμπλέκεται στην ανάπτυξη του ΠΕ (Amar M. Singh, 2007). Επιπλέον ελέγχει την έκφραση γονιδίων αυτό-ανανέωσης. Έχουν ταυτοποιηθεί θέσεις πρόσδεσης του NANOG στις ρυθμιστικές αλληλουχίες των Oct4 και Sox2 και των επίσης μεταγραφικών παραγόντων πλειοδυναμίας Rest και Foxd3 και Rex1. Η έκφραση του Nanog στα EBK ελέγχεται άμεσα από τους Sox2 και Oct4 καθώς και από τον ίδιο του τον εαυτό. Αυτό έχουν δείξει πειράματα μελέτης της γονιδιακής έκφρασης του καθενός από τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες σε μεταλλαγμένα στελέχη για καθένα από αυτούς και πειράματα σάρωσης θέσεων ανοσοκατακρήμνισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα των EBK για αυτούς τους τρεις μεταγραφικούς παράγοντες.



Εικόνα A.7: Το βασικό μεταγραφικό κύκλωμα της πλειοδυναμίας και οι βασικές γενεαλογίες που ελέγχουν τα NANOG και OCT4. A. Οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν ο καθένας την έκφρασή τους και την έκφραση των υπόλοιπων δύο. B. Ο OCT4 ελέγχει και καταστέλλει τη μετάβαση προς το τροφοεξώδερμα και ο NANOG προς το πρωτογενές ενδόδερμα. Τροποποιημένη από A (Boyer LA, 2005) και B (Mitsui, 2003).

A.5.1.3.3. Το γονίδιο Sox2 και ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 ως μέλος του μεταγραφικού κυκλώματος πλειοδυναμίας.

Ο παράγοντας Sox2 είναι το τρίτο μέλος του μεταγραφικού κυκλώματος. Είναι το λιγότερο μελετημένο μόριο από τα τρία. Αρχικά ανακαλύφθηκε ως μέλος της οικογένειας Sox (SRY-related HMG box) που βρίσκονται στο γενετικό τόπο SRY ο οποίος σχετίζεται με το φυλοκαθορισμό και την ανάπτυξη της γαμετικής σειράς. Τα γονίδια Sox κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες που διαθέτουν μια μοναδική περιοχή πρόσδεσης στο DNA, την HMG. Ανήκει στην SOX B1 υποομάδα, στην οποία ανήκουν και τα Sox1 και Sox3. Η ομαδοποίηση αυτή βασίζεται στην ομολογία της HMG περιοχής των μελών της οικογένειας (Veronique Lefebvre * and Yu Han, 2007).

Η μητρική πρωτεΐνη Sox2 μεταφέρεται από τη μητέρα στο έμβρυο, όπως και αυτή του Oct4. Και μάλιστα, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στην Oct4 και στις υπόλοιπες μητρικές που περνούν στο έμβρυο και μέχρι το στάδιο των 8 βλαστομεριδίων έχουν καταστραφεί, η μητρική Sox2 είναι παρούσα μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Το ζυγωτικό Sox2 αρχίζει να εκφράζεται στο μορίδιο και συνεχίζει το mRNA του να είναι ορατό στην ΕΚΜ της βλαστοκύστης. Η έκφραση συνεχίζεται και σε ολόκληρη την επιβλάστη του σταδίου του κυλίνδρου, αλλά καθώς πλησιάζουμε στην αρχή της γαστριδίωσης (E7,5) περιορίζεται στην εμπρόσθια πλευρά του εμβρύου, εκεί όπου θα ξεκινήσει ο σχηματισμός του μελλοντικού εμβρυϊκού νευροεξωδέρματος (Avilion et al., 2003). Ταυτόχρονα, και ενώ βρισκόμαστε στο στάδιο του μετεμφυτευτικού κυλίνδρου, ένας δεύτερος πυρήνας έκφρασης εκκινεί από τον εξωπλακουντικό κώνο για να καταλάβει σταδιακά ολόκληρο το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα και αργότερα το εξωεμβρυϊκό τμήμα του χόριου. Στα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης και κατά την οργανογένεση (E9,5) το Sox2 εκφράζεται στον εγκέφαλο, το νευρικό σωλήνα αλλά και τα βραγχιακά τόξα, το εντερικό ενδόδερμα του εμβρύου και τα θηλυκά και αρσενικά γαμετικά κύτταρα. Και στους ενήλικες υπάρχουν θώκοι έκφρασης του Sox2 σε διάφορους ιστούς του σώματος. Το πρότυπο έκφρασης του Sox2 έχει αποτελέσει το λόγο να διατυπωθεί η υπόθεση πως πρόκειται για νευροειδικό γονίδιο και πως η έκφραση του σε όργανα αλλότριας αναπτυξιακής κατεύθυνσης παρατηρείται στις θέσεις εξωδερμικής προέλευσης που σχετίζονται πιθανότατα με τη νεύρωση των οργάνων και με τους πιθανούς θώκους βλαστικών κυττάρων που χρησιμεύουν για την αναγέννηση των ιστών.

Το SOX2 είναι βέβαια πρώτα από όλα γονίδιο πλειοδυναμίας. Είναι *in vivo* απαραίτητο για το σχηματισμό της επιβλάστης. Τα ομόζυγα μεταλλαγμένα έμβρυα για το Sox2 διέρχονται από το στάδιο της βλαστοκύστης, αλλά, ενώ σχηματίζουν κανονικά εξωεμβρυϊκούς ιστούς, δεν κατορθώνουν να σχηματίσουν επιβλάστη, και πεθαίνουν (Masui, 2007). Καλλιέργειες βλαστοκύστεων εκτός εμβρύου (*ex vivo*) από μεταλλαγμένα στελέχη για το Sox2, σχηματίζουν μόνο τροφοεξωδερμικά κύτταρα και κύτταρα ΠΕ. Αυτό υποδεικνύει ότι το Sox2 είναι απαραίτητο για τη γένεση και διατήρηση της επιβλάστης. Πιθανός πρότερος καθοριστικός ρόλος της SOX2 πρωτεΐνης πιθανότατα να μη διαπιστώνεται στο στάδιο της βλαστοκύστης λόγω επίδρασης της μητρικής SOX2 μέχρι αυτό το στάδιο.

Και στα EBK ο ρόλος του Sox2 έχει επιβεβαιωθεί και είναι ανάλογος. Τα Sox2^{-/-} στελέχη διαφοροποιούνται ταχύτατα προς τροφοεξώδερμα (Masui, 2007). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπερέκφραση του Oct4 μπορεί να διατηρήσει το φαινότυπο πλειοδυναμίας στα Sox2^{-/-} στελέχη. Αυτό υποδηλώνει τη συνέργεια των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων για τη διατήρηση της πλειοδυναμίας. Πράγματι, έχει βρεθεί πως οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται από κοινού, σε κοντινές θέσεις ο ένας με τον άλλο, σε ρυθμιστική αλληλουχία ενισχυτή (Oct-Sox element) που φέρουν γονίδια που σχετίζονται με την πλειοδυναμία, όπως τα Nanog, Fgf4, Utl1, Lefty1, Klf4 (Yuhki Nakatake and Kiyohito Yagi, 2006) αλλά και τα ίδια τα Sox2 και Oct4. Έτσι, επάγουν την έκφραση των γονιδίων αυτών και ενισχύουν και τη δική τους. Στις μελέτες αυτές, εντούτοις, ξεχωριστή θέση κατέχουν δύο πορίσματα: πρώτον, η πτώση των επιπέδων του Sox2 δε φαίνεται να επηρεάζει τόσο άμεσα –στις πρώτες 24 ώρες– την έκφραση των παραπάνω γονιδίων, ενώ έχει δειχθεί ότι η απουσία του Oct4 επιφέρει στον ίδιο χρόνο την άμεση πτώση των επιπέδων τους. Αυτό σημαίνει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 πιθανότατα δεν είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της συγκεκριμένης ρυθμιστικής αλληλουχίας. Και επιπλέον, άλλα μέλη της οικογένειας Sox που εκφράζονται στα EBK, που είναι τα Sox15 (ομάδα G) και Sox4 και Sox11 (ομάδα C), και προσδένονται στην ίδια αλληλουχία, δεν αντικαθιστούν το Sox2 σε αυτό το ρόλο. Όμως η πτώση του Sox2 επιφέρει την πτώση άλλων γονιδίων που προάγουν την έκφραση του Oct4 (Nr5a2) ή την αύξηση της έκφρασης άλλων που την καταστέλλουν (Nr2f2) και επιπρόσθετα γονίδια σχετιζόμενα με τη διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ένα πιθανό άλλο έμμεσο μηχανισμό ρύθμισης του

Oct4 από το Sox2. Δεύτερον ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι εισαγωγή του διαγονιδίου του Nanog, ο οποίος συμμετέχει στο ίδιο μεταγραφικό κύκλωμα, δεν διατηρεί τον πλειοδύναμο φαινότυπο των Sox2^{-/-} EBK κυττάρων. Αυτό, σε συνδυασμό με το ότι τα επίπεδα του Nanog δε φαίνεται να μειώνονται πιο άμεσα μετά την επαγωγή της μείωσης των επιπέδων της Sox2 πρωτεΐνης από ότι άλλα γονίδια που σχετίζονται με την πλειοδυναμία αλλά δε συμμετέχουν στο μεταγραφικό κύκλωμα των Sox2, Nanog και Oct4 μας δείχνει ότι η υπόθεση του ενός μεταγραφικού κυκλώματος που καθορίζει την πλειοδυναμία είναι απλουστευτική.

A.5.1.3.4. Το Nanog ως η πύλη του θεμελιώδους επιπέδου πλειοδυναμίας

Ο χαρακτήρας της πλειοδυναμίας και οι παράγοντες που την καθορίζουν έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος από την εποχή της ανακάλυψης των EBK. Συσσωρευμένα δεδομένα των τελευταίων ετών δείχνουν ότι το καθεστώς της πλειοδυναμίας καθορίζεται από ένα μεταγραφικό κύκλωμα, στον στενό πυρήνα του οποίου βρίσκονται οι μεταγραφικοί παράγοντες OCT4, SOX2 και NANOG. Το μεταγραφικό κύκλωμα συνιστά το βασικό σημείο ελέγχου, στο οποίο καταλήγουν σήματα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την πλειοδυναμία, όπως τα Jak/Stat, Bmp4, Activin-Nodal, Wnt, Fgf. Οι τρεις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες σε συνδυασμό με τους πιθανούς τους συνεργάτες, ελέγχουν την ενεργοποίηση βασικών γονιδίων πλειοδυναμίας και την καταστολή βασικών γονιδίων διαφοροποίησης. Παρόλα αυτά, οι ακριβείς σχέσεις μεταξύ των τριών είναι υπό διερεύνηση.

Τελευταία δεδομένα είναι διαφωτιστικά, καθώς προτείνουν ότι η πλειοδυναμία συνιστά γεγονός πολυεπίπεδο σταδιακής ολοκλήρωσης. Υπάρχουν δύο βασικά επίπεδα πλειοδυναμίας: το θεμελιώδες επίπεδο (ground state of pluripotency ή naïve pluripotency) που αντιστοιχεί in vivo στο στάδιο της προεμφυτευτικής επιβλάστης και in vitro στα EBK και τα EPIBK και το επίπεδο της προχωρημένης ή ενεργοποιημένης πλειοδυναμίας (primed pluripotency) το οποίο αντιστοιχεί in vivo στη μετεμφυτευτική επιβλάστη και in vitro στα EpiSCs (Jennifer Nichols¹, 2009b; Qi-Long Ying¹ and Smith², 2008) (εικόνα A.8). Δεν πρέπει να διαφεύγει της προσοχής μας ότι τα EBK έχουν απομονωθεί από βλαστοκύστες σε διάπαυση, οι οποίες, όταν απομονώνουμε τα EBK, έχουν προχωρήσει και βρίσκονται στην E4,5, ήτοι στο στάδιο της προεμφυτευτικής επιβλάστης. Για αυτό θεωρούμε ότι το θεμελιώδες επίπεδο πλειοδυναμίας αντιστοιχεί στην προεμφυτευτική επιβλάστη. Μετά την εμφύτευση τα κύτταρα της ύστερης επιβλάστης έχουν δεχθεί εκείνα τα σήματα από το περιβάλλον που τα καθιστούν έτοιμα να προχωρήσουν στη γαστριδίωση, μια διαδικασία εξειδίκευσης και διαφοροποίησης.

Τα νέα δεδομένα προτείνουν ότι ο σκληρός πυρήνας του μεταγραφικού κυκλώματος πλειοδυναμίας συγκροτείται από τους SOX2 και OCT4. Όμως αυτός δεν είναι αρκετός

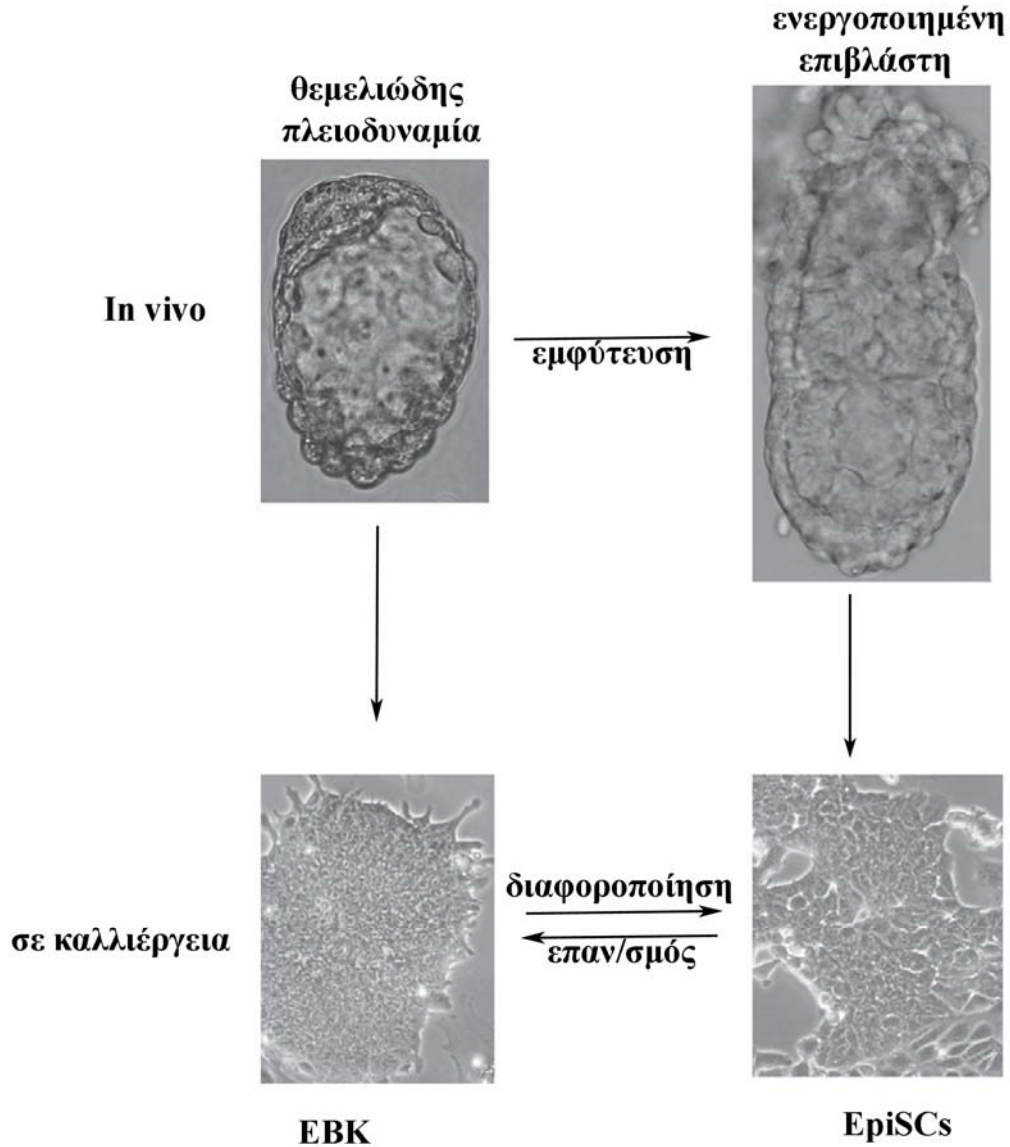
για να καθορίσει την πλειοδυναμία, αν και είναι αναγκαίος. Οι SOX2 και OCT4 καθορίζουν, όπως φαίνεται, μια προτέρα της πλειοδυναμίας κατάσταση, που αποτελεί βέβαια, αναγκαίο βήμα για να φτάσουμε σε αυτήν. Είναι ο πιθανός πρώτος λίθος. Δεν ξεχνούμε ότι και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι μόρια που κληρονομούνται μητρικά και από το ζυγωτικό γονιδίωμα εκφράζονται πολύ πριν από το στάδιο της βλαστοκύστης και καθ' οδόν προς την επιβλάστη και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Έτσι, η παρουσία τους στα ολοδύναμα βλαστομερή ήδη δεν τους συνδέει απαραίτητα με την πλειοδυναμία, που συνιστά όρο αναφερόμενο, τουλάχιστον στον ποντικό, αποκλειστικά στο έμβρυο. Άρα είναι πολύ καλά υποψήφια μόρια για αυτό το ρόλο.

Αντιθέτως, το Nanog ναι μεν εκφράζεται από το στάδιο του μοριδίου, αλλά στη συνέχεια περιορίζεται αποκλειστικά στην EKM και τα κύτταρα της επιβλάστης. Η έκφρασή του στο μορίδιο σχετίζεται με τα κύτταρα που θα δώσουν στην πορεία την εμβρυϊκή πλειοδύναμη επιβλάστη. Η προσθήκη του NANOG στο μεταγραφικό κύκλωμα είναι ο αναγκαίος λίθος για τη συγκρότηση της επιβλάστης, δηλαδή για την απόκτηση του χαρακτήρα και του δυναμικού της πλειοδυναμίας (Ian Chambers¹ and Ken Jones², 2007; Jose Silva and Jason Wray, 2009).

Στα EBK ο ρόλος του Nanog είναι πιο ξεκαθαρισμένος. Οι SOX2 και OCT4 μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν και προάγουν την έκφραση του FGF4, ενός αποσταθεροποιητικού για την πλειοδυναμία σηματοδοτικού μορίου, το οποίο καθιστά το EBK έτοιμο και δεκτικό στα σηματοδοτικά μόρια που ακολουθούν και προάγουν την εξειδίκευση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης. Ο FGF4 συγκεκριμένα ενεργοποιεί το μονοπατι Erk/Fgf, που παίζει τον παραπάνω ρόλο (Jennifer Nichols¹, 2009a; Tilo Kunath¹ and Austin Smith³, 2007). Μάλιστα, θεωρείται πως οι LIF και BMP4 σταματούν την έκφραση γονιδίων διαφοροποίησης καταρροϊκά του Erk. Ειδικότερα για το BMP4, θεωρείται πως εμποδίζει την έκφραση των γονιδίων Id που προάγουν τη διαφοροποίηση, ιδίως τη νευρική. Ενώ αδρανολοποίηση του Erk μέσω στοχευμένων αναστολέων επιτρέπει τη διατήρηση του δυναμικού αυτό-ανανέωσης των EBK ακόμα και σε μεταλλαγμένα στελέχη για το Stat3, το ΜΠ που βρίσκεται καταρροϊκά του LIF. Και επιπλέον, τα μεταλλαγμένα για το Erk στελέχη ποντικού κατορθώνουν να φτιάξουν πλήρη επιβλάστη και καθόλου ΠΕ, συνηγορώντας ότι η δράση του Erk είναι εναντίον της διατήρησης της πλειοδυναμίας (Jose Silva¹ and Austin Smith¹, 2008).

Το Nanog θεωρείται πως αποτελεί το μόριο εκείνο που χρειάζεται το μεταγραφικό κύκλωμα της πλειοδυναμίας, προκειμένου να σταθεροποιήσει το κύκλωμα και να υπερκεράσει την επαγωγική προς τη διαφοροποίηση δράση του Erk μονοπατιού. Είναι το Nanog το μόριο εκείνο που δρα για να διατηρήσει το EBK τα χαρακτηριστικά της πλειοδυναμίας και κυρίως την αυτο-ανανέωση και να μην ενδώσει στις σειρήνες της διαφοροποίησης. Αυτό πιστοποιείται από τα πειράματα στοχευμένης αδρανοποίησης του Nanog σε EBK που δείχνουν ότι τα EBK παραμένουν αδιαφοροποίητα αλλά δείχνουν πολύ ευάλωτα στη δράση των επαγωγικών μορίων που κατευθύνουν τη διαφοροποίηση, ενώ η υπερέκφραση του Nanog είναι αρκετή για να αποτρέψει τη διαφοροποίηση των EBK ακόμα και απόντος του LIF από την καλλιέργεια και μάλιστα ανεξάρτητα από το αν το Erk μονοπάτι είναι ενεργό. Έτσι, πιστεύεται ότι το Nanog είναι γονίδιο που όχι μόνο αλλά δρα αποκλειστικά στην κατάσταση της πλειοδυναμίας, όπως είναι τα EBK σε καλλιέργεια, αλλά επιπλέον είναι αρκετό από μόνο του για να τη διασφαλίσει. Τέλος αυτό που δεν πρέπει να αγνοηθεί είναι ότι αυτό το ρόλο το Nanog τον έχει επιδείξει όχι μόνο στην καλλιέργεια των EBK αλλά επιπλέον και στα πειράματα ελέγχου μετάβασης από το επίπεδο των EpiSCs από τη μια πλευρά και από το επίπεδο ενός υβριδίου EBK-σωματικού κυττάρου στο επίπεδο των EBK και των EPIBK. Αυτό αναδεικνύει και την καθολικότητα της δράσης του Nanog, πέρα από την in vivo δράση του που όπως είδαμε είναι όμοια.

Αυτό που ακόμη δεν έχει εξακριβωθεί είναι ποιος είναι ο ακριβής ρόλος των δύο άλλων μεταγραφικών παραγόντων του μεταγραφικού κυκλώματος της πλειοδυναμίας σχετικά με τη δράση του NANOG. Είναι δυνατόν η υπερέκφραση του ενός ή και των δύο να έχει αντίρροπα αποτελέσματα από τη δράση του Nanog ευνοώντας τη δράση του Erk; Πράγματι, η υπερέκφραση του Oct4 οδηγεί σε διαφοροποίηση σε κύτταρα ΠΕ ή μεσοδέρματος, ενώ υπερέκφραση του Sox2 οδηγεί σε θάνατο τα EBK. Και είναι τα επίπεδα κάποιου από τους άλλους δύο ικανά να προσελκύσουν το NANOG στο κύκλωμα ούτως ώστε να σταθεροποιηθεί το τελευταίο;



Εικόνα A.8: Οι δύο καταστάσεις της πλειοδυναμίας *in vivo* και *σε καλλιέργεια*. Στην *in vivo* κατάσταση η θεμελιώδης αντιστοιχεί σε E4,5 και η ενεργοποιημένη σε έμβρυο E5,5 μετεμφυτευτικά. EBK: Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα. EpiSCs: κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος. Τροποποιημένη από (Jennifer Nichols1, 2009b).

A.5.2. Η ετερογένεια των EBK

Τα EBK αποτελούν το πιο δυναμικό εργαλείο μελέτης της πρώιμης ανάπτυξης του ποντικού και κατ'επέκταση των θηλαστικών. Μελέτες πρόσφατες έχουν συνηγορήσει υπέρ της ετερογένειάς τους. Η ετερογένεια αυτή αναφέρεται και πιθανότατα βασίζεται στη διαφορική έκφραση ΜΠ πλειοδυναμίας. Τέτοιοι έχει δειχθεί μέχρι στιγμής ότι είναι οι Nanog το Stella και το Rex1 (Amar M. Singh, 2007; IYayoi Toyooka1, 2008; Katsuhiko Hayashi, 2008), οι οποίοι εμφανίζουν πρότυπο ετερογενούς έκφρασης μερικώς μόνο αλληλοεπικαλυπτόμενης. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί δεν αντιστοιχούν σε σταθερές καταστάσεις, μιας και η απομόνωση και καλλιέργειά τους οδηγεί εκ νέου στον ετερογενή αρχικό πληθυσμό των EBK. Αυτό δείχνει ότι η θεμελιώδης κατάσταση του πληθυσμού των EBK είναι η ετερογένεια. Η ετερογένεια αυτή έχει δειχθεί πως αντανακλά σε υποπληθυσμούς των EBK με διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό. Αυτό το χαρακτηριστικό των EBK έχει αποτελέσει την αφορμή για να διατυπωθεί η υπόθεση πως ανάλογη ετερογένεια πιθανότατα υπάρχει στον πληθυσμό της EKM της βλαστοκύστης και της προεμφυτευτικής επιβλάστης in vivo, τους δύο πληθυσμούς, από τους οποίους έχουν απομονωθεί τα EBK (Jennifer Nichols1, 2009b). Η επιβεβαίωση της παραπάνω υποθεσης θα μπορούσε πιθανότατα να απαντήσει στο ερώτημα που αφορά ποια είναι τα ερεθίσματα στα στάδια της βλαστοκύστης και της επιβλάστης που καθορίζουν ποια αναπτυξιακή κατεύθυνση θα ακολουθήσει κάθε κύτταρο. Και βεβαίως, η εξιχνίαση του ή των παραγόντων που καθοδηγούν την ετερογένεια των EBK είναι στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος.

A.5.3. Τα πρότυπα μελέτης της επιβλάστης

Μέχρι τώρα λίγα είναι γνωστά για το πώς μεταβαίνουμε από το ένα καθεστώς της πλειοδυναμίας στο άλλο, ή καλύτερα πώς μεταβαίνουμε από την προεμφυτευτική στη μετεμφυτευτική επιβλάστη in vivo. Η ανάγκη για μοντελοποίηση της πρώιμης ανάπτυξης των θηλαστικών είναι αδήριτη. Υπαγορεύεται από τους πολύ ολιγάριθμους κυτταρικούς πληθυσμούς του πρώιμου εμβρύου των θηλαστικών και από την πολύ περιορισμένη δυνατότητα πρόσβασης σε αυτό.

Δύο μελέτες έχουν κατορθώσει να συνεισφέρουν μοντέλα μελέτης του σταδίου του κυλίνδρου. Η πρώτη έχει δημιουργήσει in vitro από EBK κυτταρικούς πληθυσμούς σε προσκόλληση ή σε εναιώρημα που εκφράζουν ομοιογενώς γονίδια-μάρτυρες του πρωτογενούς εξωδέρματος (Fgf5, AΦ), εμφανίζουν μεταγραφικό προφίλ που παραπέμπει σε πρωτογενές εξώδερμα, διαθέτουν πλαστικότητα διαφοροποίησης, αλλά δεν μπορούν να δώσουν χίμαιρες, όταν ενεθούν σε βλαστοκύστες. Τα κύτταρα αυτά, κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EPL ή EBM, έχουν δημιουργηθεί ως αποτέλεσμα κάποιου εξωκρινούς παράγοντα καλλιέργειας ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (Joy Rathjen and Rathjen‡, 1999). Συνιστούν μοντέλο μελέτης των γεγονότων της πρώιμης ανάπτυξης. Εντούτοις, ακόμα δεν είναι γνωστό για το ποιος είναι αυτός ο εξωκρινής παράγοντας και πώς πραγματοποιήθηκε η μετάβαση από τα EBK στα κύτταρα αυτά. Το δεύτερο μοντέλο είναι αυτό της ex vivo μελέτης της προεμφυτευτικής και μετεμφυτευτικής επιβλάστης. Κυτταρικές σειρές πλειοδύναμων βλαστικών κυττάρων έχουν αναπτυχθεί σε καλλιέργεια προερχόμενες από τα παραπάνω στάδια (I. Gabrielle M. Brons¹ et al., 2007; Paul J. Tesar¹ and McKay¹, 2007). Η μελέτη αυτή οδήγησε σε επιβεβαίωση ότι κύτταρα, τα EpiSCs, που προέρχονται από την επιβλάστη του εμβρύου διατηρούνται σε καλλιέργεια επί μακρόν, όπως τα EBK, καλλιεργούνται, όμως, σε συνθήκες που διαφέρουν από αυτές των EBK. Απαιτούν για τη διατήρησή τους τους παράγοντες NODAL και bFGF, όπως και τα ανθρώπινα EBK και όχι τους LIF και BMP4. Το γεγονός ότι μοιάζουν με τα ανθρώπινα EBK καταδεικνύει πόσο σημαντική είναι η μελέτη του πρωτογενούς εξωδέρματος του ποντικού και για την απόκτηση γνώσης για την ανθρώπινη πρώιμη ανάπτυξη. Εμφανίζουν μεταγραφικό και μεταφραστικό προφίλ πρωτογενούς εξωδέρματος, φυσιολογικό καρύοτυπο, ανάλογη πλαστικότητα, δυνατότητα δημιουργίας

τερατωμάτων, όταν ενεθούν σε όργανα ανοσοκατεσταλμένων ζώων και αδυναμία δημιουργίας χίμαιρων, όταν ενεθούν σε βλαστοκύστες, λόγω πιθανότατα έλλειψης συγχρονισμού μεταξύ βλαστοκύστης και επιβλάστης. Η μελέτη αυτή, καθώς και άλλες που ακολούθησαν από την ίδια ομάδα έδωσαν στοιχεία ελέγχου της ταυτότητας των EpiSCs και των ανθρώπινων EBK. Κυρίως δείχθηκε ότι το NODAL είναι αυτό που ελέγχει την έκφραση του Nanog για τη διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων αυτών(Ludovic Vallier et al., 2009). Πρόσφατα μια πρόσφατη μελέτη(Boris Greber and Davood Sabour, 2010) έδειξε ότι τα EpiSCs χρησιμοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι Fgf με διαφορετικό τρόπο από ό,τι τα ανθρώπινα EBK, αφού αδυνατεί στην περίπτωσή τους το μονοπάτι αυτό να συνεργαστεί με το SMAD2/3 σηματοδοτικό βραχίονα του Tgfβ μονοπατιού, σε αντίθεση με τα ανθρώπινα EBK, προχωρώντας ένα βήμα πιο πέρα στην ανάλυση τους. Τέλος, κύτταρα που προσομοιάζουν με κύτταρα επιβλάστης δημιουργήθηκαν από ανθρώπινα EBK μετά από υπερέκφραση του Nanog(Henia Darr, 2006), χωρίς όμως να μελετηθούν επαρκώς. (πίνακας A.2) Παρόλα αυτά καμιά από τις προηγούμενες μελέτες δεν έχει δώσει απάντηση στο ερώτημα για το πως επιτυγχάνεται η μετάβαση από την προεμφυτευτική πλειοδύναμη επιβλάστη στη μετεμφυτευτική.

| | EpiSCs (Vallier-Mckay) | EPL cells (Rathjen) | ανθρώπινα EBK υπερεκφράζοντα το Nanog |
|--|---|--|--|
| μορφολογία | μεγάλες αποικίες μονόστοιβες | δισδιάστατες μονόστοιβες αποικίες | πιο επίπεδες αποικίες όμοιες με αυτές των AEBK |
| προφίλ έκφρασης πρώιμης ανάπτυξης | <i>Sox2 +, Oct4+, Nanog+, Nodal+</i> <i>,Fgf5+, Rex1-, Gbx2-</i> | <i>Sox2 +, Oct4+, Nanog+, Fgf5+</i> <i>Rex1-, Gbx2-</i> | <i>Sox2 +, Oct4+, Nanog+, Fgf5+</i> <i>Rex1-, Gbx2-</i> |
| προφίλ έκφρασης διαφοροποίησης | <i>AFP+, Hnf3β+, β-III Tubulin+, Gata6+</i> | <i>AFP-</i> | ; |
| αλκαλική φωσφατάση | | + | + |
| αποδιαφοροποίηση(+LIF) | όχι | ναι | Όχι |
| δημιουργία τερατωμάτων | ναι | ; | ; |
| Χίμαιρες | όχι | όχι | ; |
| ικανότητα διαφοροποίησης | 3 βλαστικά δέρματα, πρωτογενές ενδόδερμα, τροφοεξώδερμα | μεσόδερμα, νευροεξώδερμα | ; |
| αναγκαίο σηματοδοτικό μονοπάτι | Activin/Nodal-Fgf2 | MEDII | - |
| μεταγραφικό κύκλωμα | πιο κοντά στα ανθρώπινα EBK από ό,τι στα EBK | ; | περισσότερο όμοιο με ΕΣ |
| επιγενετική ρύθμιση | πιο κοντά στα ανθρώπινα EBK από ό,τι στα EBK | ; | ; |

Πίνακας Α.2: Τα διάφορα μοντέλα μελέτης της επιβλάστης. ΕΣ: Εμβρυοειδή Σωματίδια, EBK: Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα

A.5.4. Τα εμβρυοειδή συσσωματώματα ως μοντέλο μελέτης της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης και τα διάφορα πρότοκολλα διαφοροποίησης *in vitro*.

Τα εμβρυοειδή συσσωματώματα-ΕΣ (embryoid bodies) είναι συσσωματώματα που δημιουργούνται αυθόρμητα από ΕΒΚ κατά την καλλιέργειά τους απόντος του LIF και σε εναιώρημα. Πρόκειται για ετερογενείς πληθυσμούς που αναπτύσσονται στο εσωτερικό τους γύρω από ένα στρώμα κυττάρων ΕΣΕ. Παρέχουν πλεονεκτήματα προς την κατεύθυνση της μελέτης της διαφοροποίησης, καθώς μιμούνται την πρώιμη ανάπτυξη (Eleftherios Sachlos, 2008; I Desbaillets, 2000; Katsuhiko Hayashi, 2008; Keller, 1995). Αυτό προκύπτει από τους κυτταρικούς τύπους που εμφανίζονται κατά την καλλιέργεια των ΕΣ και από τη χρονική σειρά που λαμβάνει χώρα αυτό, καθώς κατά την 1^η με 2^η ημέρα της καλλιέργειας το συσσωμάτωμα διέρχεται παροδικά από το στάδιο του πρωτογενούς εξωδέρματος, για να εμφανισθούν στη συνέχεια όλοι οι κυτταρικοί τύποι που γεννώνται κατά τη γαστριδίωση συμπεριλαμβανομένων και εξωεμβρυϊκών, όπως κυττάρων του ΕΣΕ. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα ΕΣ είναι δεκτικά στην δράση ερεθισμάτων που επιφέρουν φαινόμενα πολικότητας. Αυτό τα καθιστά ακόμη πιο δυναμικό σύστημα για τη μελέτη ενός ευρέος φάσματος φαινομένων της πρώιμης ανάπτυξης και της διαφοροποίησης.

Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμεύσει ως βάση για την ανάπτυξη πολλών πρωτοκόλλων κατευθυνόμενης διαφοροποίησης προς τα τρία βλαστικά δέρματα, χρησιμοποιώντας ειδικούς επαγωγείς συγκεκριμένων δερμάτων ή ακόμα και κυτταρικών γενεαλογιών, όπως το ρετινοϊκό οξύ (PO) για το νευριεξώδερμα, το BMP4 και η ακτιβίνη για το μεσόδερμα και το ενδόδερμα (Atsushi Kubo¹ and Savio Woo¹, 2004; Meng Li*, 1998; Nadya Lumelsky and Ivan Velasco, 2001; Stella Pearson, 2008; Valerie Gouon-Evans¹ and Keller¹, 2006)..

B. Στόχοι –Στρατηγική

Η παραγωγή πολυπληθούς και καθαρού-απαλλαγμένου από άλλους κυτταρικούς τύπους-πληθυσμού πολυδύναμων εξωδερμικών κυττάρων είναι ο βασικός στόχος αυτής της εργασίας. Τα εξωδερμικά πολυδύναμα κύτταρα εμφανίζονται για πρώτη φορά κατά την εμβρυογένεση στην εμπρόσθια πλευρά της ύστερης επιβλάστης και του γαστριδίου. Επιπλέον στόχος είναι η διερεύνηση των παραγόντων που διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο κατά τη γένεση αυτών των κυττάρων και τη διατήρηση της ταυτότητάς τους. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται εξωγενείς (extrinsic), τα σηματοδοτικά μόρια, και ενδογενείς (intrinsic), οι γενετικοί παράγοντες, καθώς και οι επιγενετικοί παράγοντες (epigenetic factors), που συντελούν στη γένεση και τη διατήρηση της ταυτότητάς τους.

Η μελέτη των πρώιμων εξωδερμικών κυττάρων του πρώιμου εμβρύου *in vivo* θεωρείται ιδιαίτερος δύσκολη λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων και της χαμηλής προσβασιμότητας των ιστών στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Έτσι επιλέξαμε τη στρατηγική της δημιουργίας πρόδρομων κυττάρων *in vitro* ξεκινώντας από EBK, προσέγγιση πρόσφορη για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα και για την *in vitro* ανασύσταση της *in vivo* μετάβασης από την κατάσταση της πλειοδυναμίας (EKM) σε αυτήν της πολυδυναμίας (ύστερη επιβλάστη-αρχή του γαστριδίου). Η κυρίαρχες μεθοδολογίες μέχρι τώρα αφορούν είτε στη χρήση εξωγενών παραγόντων (συγκεκριμένοι αυξητικοί παράγοντες ή θρεπτικά καλλιέργειας), είτε στη θετική ή/και αρνητική επιλογή που ακολουθεί τη στοχευμένη αδρανοποίηση μεμονωμένων γονιδίων σημαντικών για την πρώιμη νευρογένεση, ή και συνδυασμό τους. Ακόμα χρησιμοποιούνται μεθοδολογίες υπερέκφρασης ή και αποσιώπησης γονιδίων, προκειμένου να καταλήξουμε σε συγκεκριμένα κυτταρικά παράγωγα. Τα κύτταρα καλλιεργούνται είτε προσκολλημένα στην επιφάνεια τρυβλίων κυτταροκαλλιέργειας είτε σε εναιώρημα με τη μεθοδολογία των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων- ΕΣ.

Η δική μας επιλογή συνδυάζει τη θετική επιλογή κατόπιν στοχευμένης αδρανοποίησης με ομόλογο ανασυνδυασμό στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Sox2, χρησιμοποιώντας την κασσέττα βgeo και την καλλιέργεια σε εναιώρημα. Η στρατηγική της γενετικής τροποποίησης και τη θετικής επιλογής είναι σε θέση να υπερκεράσει βασικά προβλήματα στην παραγωγή διαφοροποιημένων πληθυσμών από EBK, που ανακύπτουν στα πρωτόκολλα χρήσης

εξωγενών παραγόντων. Τέτοια προβλήματα είναι η ετερογένεια των παραγόμενων πληθυσμών και η μειωμένη δυνατότητα να εξακριβωθεί ο ρόλος σημαντικών μεμονωμένων μορίων στη δημιουργία και το χαρακτήρα των παραγόμενων κυττάρων. Η καλλιέργεια σε εναιώρημα παρέχει μεγαλύτερους αριθμούς κυττάρων και το τρισδιάστατο μοντέλο των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων-ΕΣ θεωρείται ότι μπορεί να ανασυστήσει *in vitro* τις αναπτυξιακές διαδικασίες, ιδιαίτερα τις πρώιμες. Η επιλογή του Sox2 για τη θετική επιλογή οφείλεται στο ότι πρόκειται για γονίδιο πλειοδυναμίας. Επιπλέον, μπορεί να λειτουργήσει σαν οδηγός για την παραγωγή πρόδρομων εξωδερμικών κυτταρικών πληθυσμών, καθώς η έκφρασή του εξακολουθεί κατά την πρώιμη ανάπτυξη, αλλά περιορίζεται σε εμπρόσθιες νευροεξωδερμικές θέσεις του εμβρύου, ενώ εκφράζεται και σε διάφορους ιστούς του ενήλικου ατόμου σε περιορισμένους πολυδύναμους κυτταρικούς πληθυσμούς νευροεξωδερμικής προέλευσης. Η επιλογή του να μην προχωρήσουμε σε αποσιώπηση ή σε υπερέκφραση του γονιδίου, αλλά σε απλή επιλογή των κυττάρων που το εκφράζουν, οφείλεται στο ότι σκοπός μας είναι να ακολουθήσουμε τα νήματα των κυττάρων που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και όχι να προκαλέσουμε τροποποίηση των επιπέδων έκφρασής του σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό. Η τροποποίηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου δε συνεπάγεται απαραίτητα και την απόκτηση της ταυτότητας του NBK. Αντιθέτως, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των ΕΣ υπάρχουν κύτταρα που εκφράζουν το Sox2 και αυτά υποθέτουμε ότι είναι τα κύτταρα με ταυτότητα NBK. Τα κύτταρα αυτά θέλουμε να απομονώσουμε και να πάρουμε σε καθαρούς πληθυσμούς. Τέλος, ακολουθώντας απλά την *in vitro* ανασύσταση της πρώιμης ανάπτυξης με τους περιορισμούς που υπάρχουν λόγω του θανάτου όλων των περιβαλλόντων κυττάρων που δεν εκφράζουν Sox2, μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες και για τη μετάβαση από το στάδιο των EBK σε αυτό των πολυδύναμων NBK.

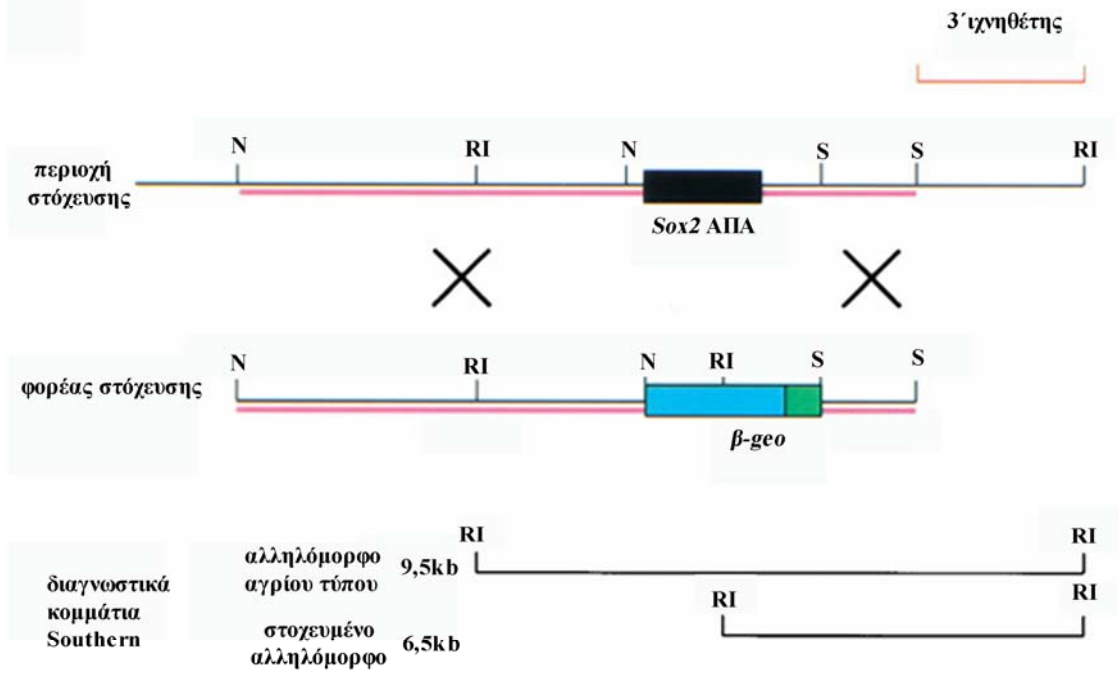
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1. Οι κυτταρικές σειρές

Γ.1.1. Η πατρική κυτταρική σειρά των EBK CCE και η ετερόζυγη κυτταρική σειρά CCE^{Sox2βgeo/+}

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η δημοσιευμένη ετερόζυγη για το Sox2 κυτταρική σειρά CCE^{Sox2βgeo/+}, που δε χρειάζεται την παρουσία υποκείμενου στρώματος ινοβλαστών για να διατηρηθεί σε καλλιέργεια. Αυτή έχει προκύψει από την επίσης γνωστή κυτταρική σειρά αγρίου τύπου CCE, η οποία όμως εξαρτάται από την παρουσία ινοβλαστών για τη διατήρησή της (Keller and Wiles, 1993

; Robertson, 1986). Η σειρά CCE προέρχεται από αρσενικά άτομα του αμιγούς στελέχους ποντικού 129 και συγκεκριμένα από το υποστέλεχος 129/SvEv, που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πειράματα στοχευμένης αδρανοποίησης (knock out) και στόχευσης (knock in) γονιδίων. Στην κυτταρική σειρά CCE έχει δημιουργηθεί ένα μεταλλαγμένο αντίγραφο απώλειας λειτουργίας (loss of function) στο ένα αλληλόμορφο του Sox2. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο δημιουργήθηκε με ομόλογο ανασυνδυασμό και αντικατάσταση της περιοχής του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης-ΑΠΑ (open reading frame-ORF), που αντιστοιχεί στην κωδική περιοχή του Sox2 με την κασέττα που φέρει το διαγονίδιο β-geo (εικόνα Γ.1)(Avilion et al., 2003). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για τη συγχωνευμένη πρωτεΐνη β-geo, που προκύπτει από σύντηξη του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση (β-gal) με το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (neo^r)(Soriano, 1991). Η συγχωνευμένη πρωτεΐνη φέρει τις βιολογικές ενεργότητες και των δύο επιμέρους πρωτεϊνών σε ένα μόριο. Η β-geo κασέττα φέρει και γονίδιο αναφοράς (β-gal) και γονίδιο επιλογής (neo^r), το οποίο την καθιστά πρόσφορη για την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου που φέρει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες, του Sox2, και ταυτόχρονα για την παραγωγή καθαρών πληθυσμών, που αποτελούνται μόνο από κύτταρα που φέρουν το διαγονίδιο. Το β-geo διαγονίδιο έχει ενσωματωθεί καταρροϊκά του υποκινητή του Sox2, και μόνο εκεί. Έτσι η έκφρασή του καθοδηγείται από τον υποκινητή του Sox2, από τη στιγμή που δεν εκφράζεται από μόνο του στα EBK.



Εικόνα Γ.1: Η περιοχή στόχευσης του γονιδίου Sox2 με την κασσέτα β-geo. Απεικονίζονται οι θέσεις δράσης των περιοριστικών ενζύμων στην περιοχή στόχευσης και στον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμεύει για τη στόχευση της περιοχής με ομόλογο ανασυνδυασμό, καθώς και τα μεγέθη των κομματιών που αναμένουμε σε στύπωμα κατά Southern από το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και το στοχευμένο με την κασσέτα. ΑΠΑ:Ανοικτό Πλαίσιο Ανάγνωσης. RI: EcoRI, S:SalI, N:NotI

Γ.1.2. Η κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών SNL

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών SNL για τη διατήρηση των EBK CCE. Η SNL σειρά έχει προκύψει από την επίσης σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών STO μετά από επιμόλυνση της τελευταίας με φορέα που την έχει καταστήσει ανθεκτική σε νεομυκίνη και ταυτόχρονα ικανή να εκφράζει LIF(Friedrich G, 1993). Πρόκειται για σειρά ευρέως χρησιμοποιημένη για την καλλιέργεια EBK.

Γ.2. Κυτταροκαλλιέργειες

Γ.2.1. Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες SNL

Ινοβλάστες SNL κύκλου ανακαλλιέργειας (passage) από P3 μέχρι P6 καλλιεργήθηκαν σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας με ειδική επίστρωση που υποβοηθά την καλλιέργεια κυττάρων σε προσκόλληση (TPP). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια προερχόμενοι από παγωμένα αποθέματα κυττάρων σε υγρό άζωτο.

Πρωτόκολλο ξεπαγώματος SNL ινοβλαστών :

- Σε υδατόλουτρο των 37°C αναδεύουμε το σωληνάκι για να ξεπαγώσει σιγά, σιγά.
- Πριν από την τήξη και του τελευταίου κομματιού πάγου αναμιγνύουμε το εναιώρημα των κυττάρων με μέσο καλλιέργειας ινοβλαστών-MKI σε θερμοκρασία δωματίου-ΘΔ. Η ανάμιξη γίνεται σε αναλογία 1/10, δηλ. 1ml εναιωρήματος κυττάρων/9 ml μέσου καλλιέργειας.
- Το αραιωμένο εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 300g για 5' σε σωληνάκια falcon των 15 ml σε ΘΔ.
- Στη συνέχεια απομακρύνουμε υπό κενό το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το κυτταρικό ίζημα σε 3ml MKI σε ΘΔ μέχρι να προκύψει εναιώρημα μονήρων κυττάρων.
- Το νέο εναιώρημα απλώνεται σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 6cm το οποίο έχει ζελατινοποιηθεί προηγουμένως σε ΘΔ για 30' με 1ml 0,2% αποστειρωμένης με διήθηση από φίλτρο 50µm ζελατίνης διαλυμένης σε

διάλυμα φωσφορικών PBS pH 7.2. Πριν από το στρώσιμο των κυττάρων η ζελατίνη έχει απομακρυνθεί υπό κενό και η επιφάνεια του πιάτου ξεπλύθηκε με PBS pH 7.2.

- Στη συνέχεια το πιάτο τοποθετείται σε επωαστήρα κυτταροκαλλιέργειας των 37°C και 5% CO₂.

Σύσταση υγρού μέσου καλλιέργειας των SNL ινοβλαστών-MKI:

- DMEM (GIBCO)
- 15% ορός μοσχαριού (PANBIO) αποστειρωμένος με διήθηση και έχοντας προηγηθεί ανενεργοποίηση των πρωτεϊνών συμπληρώματος που περιέχει με θέρμανση σε υδατόλουτρο 56°C για 30'.
- 0,1mM β-μερκαπτοαιθανόλη(GIBCO)
- L-Γλουταμίνη 0,2mM (GIBCO)
- Πενικιλίνη 100u/ml (GIBCO)
- Στρεπτομυκίνη 100μg/ml(GIBCO)

Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας ινοβλαστών SNL:

- Οι ινοβλάστες στρώνονται στο πιάτο των 6cm (ημέρα 0).
- Μετά από δύο μέρες (ημέρα 2) η καλλιέργεια είναι κορεσμένη (confluent) και έτοιμη για ανακαλλιέργεια, περιέχοντας 3X10⁶ κύτταρα.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο υπό κενό και ξεπλένουμε με PBS.
- Προσθέτουμε 1ml διαλύματος θρυψίνης 0,05% - αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) 0,02% (GIBCO) και επιάζουμε για 2-3' στον επωαστήρα των 37°C.
- Στη συνέχεια και αφού ταρακουνήσουμε το πιάτο, ούτως ώστε να υποβοηθήσουμε την απώλεια επαφής μεταξύ κυττάρων και επιφάνειας του πιάτου, προσθέτουμε 3ml MKI σε ΘΔ και με τη βοήθεια πιπέτας επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα μετράμε σε αιματοκυτταρόμετρο, αφού αναμιξούμε 50μl του εναιωρήματος με ίσο όγκο διαλύματος χρωστικής Trypan blue 0,4%, η οποία βάφει μπλε τα νεκρά κύτταρα.
- Σε πιάτο που έχει ζελατινοποιηθεί, κατά τα γνωστά (σελ.53), απλώνουμε 1X10⁶ κύτταρα σε 3ml MKI, το οποίο τοποθετείται πάλι στον επωαστήρα

κυτταροκαλλιέργειας και θα είναι έτοιμο για την επόμενη ανακαλλιέργεια μετά από δύο ημέρες.

Πρωτόκολλο για το πάγωμα των ινοβλαστών:

- Κατά τη διάρκεια της ανακαλλιέργειας και μετά το μέτρημα των κυττάρων, λαμβάνουμε όγκο εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε 3×10^6 κύτταρα .
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g για 5' σε σωληνάκια falcon 15ml σε ΘΔ και αφού έχουμε συμπληρώσει με MKI μέχρι τον όγκο των 2ml.
- Επαναιωρούμε σε 1ml διαλύματος κρυσοσυντήρησης που περιλαμβάνει 90% ορό ίδιο με αυτόν που χρησιμοποιούμε για την καλλιέργεια των ινοβλαστών και 10% DMSO.
- Στη συνέχεια ο όγκος αυτός εναιωρήματος κυττάρων μεταφέρεται για 24 ώρες σε συσκευή σταδιακής ψύξης με ισοπροπανόλη στους -80°C , προτού μεταφερθεί τελικά στο υγρό άζωτο.

Πρωτόκολλο για την ανενεργοποίηση των ινοβλαστών:

Προκειμένου να καταστήσουμε τους ινοβλάστες ανενεργούς, ήτοι να σταματήσουμε τον κυτταρικό τους κύκλο, ούτως ώστε να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια των EBK κυττάρων, ακολουθούμε το εξής πρωτόκολλο:

- Αφού έχουμε καλλιεργήσει τα SNL κύτταρα στους αριθμούς που θέλουμε, απομακρύνουμε το υπερκείμενο υπό κενό και στη συνέχεια ξεπλένουμε με PBS pH 7.2.
- Προσθέτουμε 3ml μιτομυκίνη C διαλυμένη σε μέσο καλλιέργειας ινοβλαστών σε συγκέντρωση 10μg/ml και επωάζουμε για 3,5 ώρες.
- Απομακρύνουμε το μέσο με τη μιτομυκίνη και ξεπλένουμε με PBS pH 7.2 δύο φορές.
- Στη συνέχεια τα κύτταρα είναι έτοιμα, είτε για πάγωμα, κατά τα γνωστά, είτε για στρώσιμο από πάνω τους EBK, όπου ακολουθείται η γνωστή διαδικασία, είτε ξεπαγώματος είτε ανακαλλιέργειας (σελ.53-54).

Γ.2.2. Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου CCE και η ετερόζυγη κυτταρική σειρά CCE^{Sox2βgeo/+}

EBK CCE αγρίου τύπου κύκλου ανακαλλιέργειας (passage) P12 και της ετερόζυγης κυτταρικής σειράς CCE^{Sox2βgeo/+} κύκλου ανακαλλιέργειας (passage) P27 καλλιεργήθηκαν σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας όπως και οι ινοβλάστες. Επίσης, οι διαδικασίες παγώματος, ξεπαγώματος, ανακαλλιέργειας και το μέσο καλλιέργειας είναι τα ίδια όπως και στους ινοβλάστες. Οι διαφορές σε σχέση με την καλλιέργεια ινοβλαστών είναι οι εξής:

- Στο μέσο καλλιέργειας προστίθεται απαραίτητως LIF (Chemicon) σε συγκέντρωση 1000u/ml, οπότε πλέον έχουμε το μέσο καλλιέργειας βλαστοκυττάρων-MKB.
- Το μέσο καλλιέργειας αλλάζεται κάθε μέρα κατά τα γνωστά: απομάκρυνση υπό κενό του μέσου καλλιέργειας, ξέπλυμα με PBS pH 7.2 και προσθήκη 3ml MKB σε ΘΔ.
- Τα πιάτα διαμέτρου 6 cm μετά το αρχικό ξεπάγωμα γίνονται κορεσμένα και έτοιμα για ανακαλλιέργεια σε 37-48 ώρες.
- Σε κάθε ανακαλλιέργεια στρώνουμε σε ένα πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 6cm 8X10⁵ κύτταρα, προκειμένου να έχουμε ανακαλλιέργεια κάθε 37-48 ώρες.
- Επειδή τα EBK πολλαπλασιάζονται ταχέως, η τελικός αριθμός κυττάρων στο τέλος κάθε κύκλου καλλιέργειας είναι 6-7X10⁶.
- Στα CCE^{Sox2βgeo/+} προσθέτουμε καθημερινά G418 στο μέσο καλλιέργειας σε συγκέντρωση 250μg/ml.
- Το MKB αλλάζει την ίδια ώρα κάθε μέρα, προκειμένου να αποφευχθεί αλλαγή του pH του μέσου, που οφείλεται σε συσσώρευση τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού.
- Τα CCE στρώνονται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας, όπου ήδη υπάρχουν ανενεργοί ινοβλάστες, οι οποίοι είτε έχουν μόλις ανενεργοποιηθεί, κατά τα γνωστά, είτε έχουν παγωθεί ως ανενεργοί ινοβλάστες και έχουν στρωθεί σε πιάτο 6cm από το προηγούμενο βράδυ. Επίσης, CCE^{Sox2βgeo/+} στρώνονται σε πιάτο με ανενεργούς ινοβλάστες, για να καλλιεργηθούν υπό τις ίδιες συνθήκες με τα CCE και παρουσία του αντιβιοτικού G418, καθώς οι SNL ινοβλάστες είναι ανθεκτικοί στη νεομυκίνη.

Γ.2.3. Εμβρυοειδή Συσσωματώματα-ΕΣ

ΕΒΚ CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 4 ημέρες σε ΜΚΒ έγιναν εναιώρημα μονήρων κυττάρων, με θρυψίνη κατά τα γνωστά (σελ.28), και στρώθηκαν σε πιάτο petri διαμέτρου 6 cm χωρίς επίστρωση, για τη δημιουργία ΕΣ.

Πρωτόκολλο για καλλιέργεια ΕΒΚ σε εναιώρημα ως ΕΣ:

- Το μέσο καλλιέργειας των ΕΣ είναι το ΜΚΒ χωρίς το LIF, ήτοι το ΜΚΙ. .
- Τα ΕΒΚ στρώνονται σε εναιώρημα σε αναλογία 1×10^5 /ml. Σε κάθε πιάτο στρώνουμε 3ml εναιωρήματος. Η ημέρα στρωσίματος των κυττάρων θεωρείται η ημέρα 0.
- Τις πρώτες 48 ώρες το μέσο καλλιέργειας δεν ανανεώνεται, προκειμένου να σχηματισθούν ανεμπόδιστα τα συσσωματώματα, που τις πρώτες ώρες είναι ευαίσθητα σε μηχανικές πιέσεις.
- Το μέσο καλλιέργειας από την ημέρα 2 και έπειτα ανανεώνεται κάθε μέρα ως εξής: με πιπέττα κυτταροκαλλιέργειας μεταφέρουμε το εναιώρημα σε σωληνάκι falcon 15ml, ούτως ώστε να καθιζάνουν τα συσσωματώματα. Αφότου καθιζάνουν, τότε απομακρύνουμε υπό κενό το υπερκείμενο κατά τα 4/5 και στη συνέχεια τον εναπομένειν όγκο μαζί με τα συσσωματώματα το συλλέγουμε και τα στρώνουμε ξανά σε πιάτο petri, όπου ήδη υπάρχει ΜΚΙ σε ΘΔ.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται το ανώτερο για 21 ημέρες.
- Στα μισά πιάτα της καλλιέργειας που προέρχεται από τα κύτταρα CCE^{Sox2βgeo/+} προσθέτουμε καθημερινά G418 σε συγκέντρωση 250μg/ml, προκειμένου να επιλέξουμε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας μόνο για τα κύτταρα που εκφράζουν Sox2.
- Στα ΕΒΚ CCE, αφού τα ξεκολλήσουμε με θρυψίνη από τα πιάτα στα οποία είχαν καλλιεργηθεί και προτού τα στρώσουμε για καλλιέργεια σε εναιώρημα, τα στρώνουμε σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας χωρίς ζελατίνη για 30', προκειμένου να απαλλαγούμε από την παρουσία των ινοβλαστών, οι οποίοι προσκολλώνται στην επιφάνεια του πιάτου ταχύτατα, ενώ τα ΕΒΚ στο ίδιο

διάστημα όχι. Έτσι μετά από 30' απομακρύνουμε το υπερκείμενο που περιέχει τα EBK και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρωσή του και επαναιώρηση σε ίσο όγκο MKI με πριν. Στη συνέχεια μετράμε τα κύτταρα και ακολουθούμε τη διαδικασία που περιγράφηκε ήδη. Την ίδια διαδικασία ακολουθούμε και για CCE^{Sox2βgeo/+} που έχουν καλλιεργηθεί παρουσία ινοβλαστών.

Γ.2.4. Κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2:

Κύτταρα της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2 καλλιεργήθηκαν σε πιάτα με επίστρωση για κυτταρική προσκόλληση, χωρίς να έχει προηγηθεί επίστρωση με ζελατίνη. Η ανακαλλιέργεια, το πάγωμα, το ξεπάγωμα των κυττάρων γίνεται κατά τα γνωστά (σελ.54-55). Το θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων είναι το MKI με τη μόνη διαφορά ότι δεν περιλαμβάνει β-μερκαπτοαιθανόλη. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε καλλιέργεια σε πυκνότητα $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$. Καλλιεργούνται χωρίς αλλαγή θρεπτικού για 4-5 ημέρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους 4°C για διάστημα μέχρι ένα μήνα ή στους -20°C για διάστημα μέχρι 6 μήνες.

Γ.2.5. Κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM

EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+}, που είχαν καλλιεργηθεί κατά τα γνωστά, τοποθετήθηκαν σε πιάτα petri σε πυκνότητα $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ως μονήρη κύτταρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε εναιώρημα για 4 ημέρες. Την ημέρα 2 συλλέχθησαν σε falcon 15ml και ανανεώθηκε το θρεπτικό τους όπως στα ΕΣ, με τη διαφορά ότι επαναιωρήθηκαν σε διπλάσιο όγκο θρεπτικού για τις επόμενες 2 ημέρες. Το θρεπτικό καλλιέργειάς τους είναι το ειδικό θρεπτικό MEDII, του οποίου η σύσταση είναι 50% υπερκείμενο HepG2:50% MKI. Το υπερκείμενο HepG2 που είχε συλλεχθεί κατά τα γνωστά διηθήθηκε από φίλτρο με πόρους 50μm και σε αυτό προστέθηκε β-μερκαπτοαιθανόλη της ίδιας τελικής συγκέντρωσης με το MKI.

Γ.2.6. Διαφοροποίηση προς νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα

EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 4 ημέρες σε MKB, ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418, καθώς και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM που είχαν καλλιεργηθεί για 4 ημέρες, διαφοροποιήθηκαν προς διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα, ήτοι νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα.

Πρωτοκόλλο νευρικής διαφοροποίησης

CCE και CCE^{Sox2βgeo/+}, ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} και EBM από CCE^{Sox2βgeo/+} και CCE

- EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+}, αφού ξεκολλούν από την επιφάνεια γίνονται μονήρη, και τα CCE στρώνονται ξανά για να απαλλαγούμε από τους ινοβλάστες κατά τα γνωστά. Για τα ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} και EBM από CCE^{Sox2βgeo/+} και CCE ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και για τα EBK με τη διαφορά ότι για να γίνουν μονήρη τα αφήνουμε για 5' σε θρυψίνη στους 37°C και στη συνέχεια με επαναλαμβανόμενο πιπετάρισμα στην αρχή στο διάλυμα θρυψίνης και στη συνέχεια σε διάλυμα θρυψίνη:MKI 1:50 μέχρι να δημιουργηθεί εναιώρημα μονήρων κυττάρων.
- Στρώνονται σε πιάτο petri διαμέτρου 6 cm σε αναλογία 1×10^5 /ml σε όγκο 3ml για να σχηματίσουν ΕΣ σε MKI (ημερα 0). Ανανεώνουμε το MKI για πρώτη φορά μετά την ημέρα 2, όπως γίνεται στην ήδη γνωστή καλλιέργεια ΕΣ. Η διαφορά εδώ έγκειται στο ότι ανανεώνουμε το MKI όχι κάθε μέρα, αλλά κάθε δύο ημέρες.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 8 ημέρες.
- Τις 4 τελευταίες ημέρες της καλλιέργειας κάθε φορά που ταίζουμε προσθέτουμε είτε ρετινοϊκό οξύ-ΡΟ σε τελική συγκέντρωση 10^{-3} M, το οποίο είναι διαλυμένο σε 100% αιθανόλη, είτε 100% αιθανόλη ως πείραμα ελέγχου.
- Μετά την όγδοη ημέρα της καλλιέργειας θρυψινοποιούμε τα συσσωματώματα που έχουν δημιουργηθεί:
 - ◆ αφήνουμε τα συσσωματώματα να καθιζάνουν σε σωληνάκι falcon

- ◆ απομακρύνουμε το υπερκείμενο υπό κενό
- ◆ ξεπλένουμε με PBS pH 7.2
- ◆ προσθέτουμε 0,5ml γνωστού διαλύματος θρυψίνης (GIBCO) και πιπετάρουμε επαναλαμβανόμενα για 30-40φορές
- ◆ στη συνέχεια προσθέτουμε ίσο όγκο MKI και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία πιπεταρίσματος μέχρι τη δημιουργία εναιωρήματος μονήρων κυττάρων.
- Μετράμε τα κύτταρα στο αιματοκυτταρόμετρο και συλλέγουμε $1,33 \times 10^4$ κύτταρα για κάθε ένα πηγαδάκι από πολυπιάτο κυτταροκαλλιέργειας 48 θέσεων (Nunc), που χρησιμοποιείται για καλλιέργειες κυτταρικής προσκόλλησης. Σε κάθε πηγαδάκι έχει τοποθετηθεί αποστειρωμένη καλυπτρίδα 10mm. Τα κύτταρα αυτά τα φυγοκεντρούμε στα 300g για 5' και στη συνέχεια τα επαναιωρούμε σε μέσο καλλιέργειας νευρικής διαφοροποίησης - MKND και συγκεκριμένα σε 0,2ml/πηγαδάκι.
- Στρώνουμε τα κύτταρα σε πηγαδάκι που έχει υποστεί κατεργασία προηγουμένως, αρχικά με 0,2ml διαλύματος του D ισομερούς της πολυλυσίνης- PDL (Poly-D-lysine-PDL) (Sigma) συγκέντρωσης 10μg/ml για 2 ώρες σε επωαστήρα των 37°C και στη συνέχεια, αφότου απομακρύνουμε την περισσή PDL προσθέτουμε ακόμα 0,2ml διαλύματος laminin (Sigma) συγκέντρωσης 10μg/ml για 2 ώρες σε επωαστήρα των 37°C. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS pH 7.2, οπότε τα πηγάδακια αφήνονται να στεγνώσουν σε ΘΔ μέχρι να στρωθούν με κύτταρα. Η ημέρα στρωσίματος των κυττάρων λογίζεται ως ημέρα 0 (συνολικά 8^η ημέρα).
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 4 ημέρες στο MKND. Ανανεώνουμε το θρεπτικό την ημέρα 2, απομακρύνοντας το παλιό θρεπτικό υπό κενό και προσθέτοντας 0,2ml/πηγαδάκι.
- Την 4^η ημέρα συνολικά (12^η ημέρα) ανανεώνουμε ξανά το θρεπτικό, αλλά πλέον δεν προσθέτουμε MKND αλλά μέσο καλλιέργειας τελικής νευρικής διαφοροποίησης-MKTND, στο οποίο καλλιεργούνται για άλλες 4 ημέρες με μία ενδιάμεση ανανέωση την ημέρα 2 (συνολικά 14^η).

Σύσταση υγρού μέσου καλλιέργειας νευρικής διαφοροποίησης-MKNA

- DMEM-F12/Hams (GIBCO)
- 0,1mM β-μερκαπτοαιθανόλη (GIBCO)
- L-Γλουταμίνη 0,2mM (GIBCO)
- Πενικιλίνη 100u/ml (GIBCO)
- Στρεπτομυκίνη 100μg/ml(GIBCO)
- Γλυκόζη 0,6%
- Fgf 20ng/ml (R&D)
- Ινσουλίνη 25μg/ml (Sigma)
- Σεληνικό Νάτριο 5,2ng/ml(Sigma)
- Πουτρεσκίνη 9,6ng/ml(Sigma)
- Προγεστερόνη 6,3ng/ml(Sigma)
- Τρανσφερρίνη 100μg/ml(Sigma)

Σύσταση υγρού μέσου καλλιέργειας τελικής νευρικής διαφοροποίησης-MKTNA

- 1 μέρος MKNA χωρίς Fgf
- 1 μέρος Neurobasal(GIBCO) + L-Γλουταμίνη 0,2mM (GIBCO) +B27 1/50(GIBCO)
- Για την παραγωγή ολιγοδενδροκυττάρων προστίθεται επιπλέον 1%ορός μοσχαριού (PANBIO) στην παραπάνω σύσταση

Γ.2.7. Διαφοροποίηση προς διαφοροποιημένα κύτταρα ενδοδέρματος

EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 4 ημέρες σε MKB, ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418 και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM διαφοροποιήθηκαν προς ενδόδεμα.

Πρωτόκολλο ενδοδερμικής διαφοροποίησης

- CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} και ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} καλλιεργημένα για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418, καθώς και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM, γίνονται εναιώρημα μονήρων κυττάρων με θρυψίνη, κατά τα γνωστά (σελ.59), και μετρώνται σε αιματοκυτταρόμετρο.
- Φυγοκεντρώνονται στα 300g για 5'.
- Επαναιωρούνται στο θρεπτικό που θα καλλιεργηθούν, το μέσο καλλιέργειας ενδοδέρματος 1-MKE1.
- Τοποθετούνται σε πιάτο petri 6cm με αναλογία 8×10^4 κύτταρα/ml στο MKE1. Στο θρεπτικό αυτό παραμένουν για 2,5 ημέρες χωρίς ανανέωση του θρεπτικού.
- Μετά από 2,5 ημέρες συλλέγουμε με πιπέττα κυτταροκαλλιέργειας τα συσσωματώματα και, αφού τα μετρήσουμε σε μικροσκόπιο, τα τοποθετούμε σε σωληνάκι falcon και τα αφήνουμε να καθιζάνουν
- Επαναιωρούμε σε μέσο καλλιέργειας ενδοδέρματος 2-MKE2. Και απλώνουμε ξανά σε πιάτο petri 6cm. Εκεί θα παραμείνουν για 3,5 ημέρες χωρίς ενδιάμεση ανανέωση του θρεπτικού. Υπάρχουν 3 διαφορετικές συνθήκες MKE2(A,B και Γ). Έτσι από την 3^η ημέρα και μετά έχουμε 3 διαφορετικές συνθήκες.
- Στη συνέχεια ακολουθώντας τη διαδικασία των δύο προηγούμενων βημάτων, απλώνουμε τα κύτταρα σε μέσο καλλιέργειας ενδοδέρματος 3-MKE3. Εκεί παραμένουν για 4 ημέρες με μία ενδιάμεση ανανέωση θρεπτικού την ημέρα 3 (συνολικά 8^η ημέρα).
- Την 4^η ημέρα του προηγούμενου σταδίου (συνολικά 10^η) τα συσσωματώματα συλλέγονται και επαναιωρούνται σε μέσο καλλιέργειας τελικής ενδοδερμικής διαφοροποίησης-MKTEΔ.
- Όντας στο MKTEΔ, τα συσσωματώματα απλώνονται σε πηγαδάκια από πολυπιάτο κυτταροκαλλιέργειας 48 θέσεων (Nunc), που χρησιμοποιείται

για καλλιέργειες κυτταρικής προσκόλλησης σε αναλογία 10 συσσωματώματα/πηγαδάκι και σε όγκο θρεπτικού 0,2ml/πηγαδάκι. Το πηγαδάκι προηγούμενως έχει υποστεί κατεργασία 2 ωρών στους 37°C με matrigel ή για 30' σε ΘΔ με ζελατίνη 0,2%. Στην περίπτωση της ζελατίνης ξεπλένουμε με PBS pH 7.2, αφότου απομακρύνουμε υπό κενό την περισσή ζελατίνη. Σε κάθε πηγαδάκι έχει τοποθετηθεί αποστειρωμένη καλυπτρίδα 10mm.

- Στο ΜΚΤΕΔ τα συσσωματώματα παραμένουν για 4 ημέρες χωρίς ενδιάμεση ανανέωση του θρεπτικού. Συνολικά το πρωτόκολλο διαρκεί για 14 ημέρες.

Σύσταση ΜΚΕ1

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5Mm (Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15%ορό μοσχαριού (PANBIO)
- Τρανσφερρίνη 200μg/ml(Sigma)

Σύσταση ΜΚΕ2

ΜΚΕ2Α

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15%υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT,GIBCO)

ή

ΜΚΕ2Β

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)
- Α-Ακτιβίνη 10ng/ml (Sigma)

ή

ΜΚΕΓ

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15%ορό μοσχαριού (PANBIO)

Σύσταση ΜΚΕ3

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)

Σύσταση ΜΚΤΕΔ

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% ορός μοσχαριού (PANBIO)
- α-δεξαμεθαζόνη 10^{-7} M(Sigma)

Γ.2.8. Διαφοροποίηση προς διαφοροποιημένα κύτταρα μεσοδέρματος

EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 4 ημέρες σε MKB, ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418, καθώς και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM, διαφοροποιήθηκαν προς μεσόδεσμα. Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή για τη διαφοροποίηση προς ενδόδεσμα με τις εξής διαφορές:

- Τα μονήρη κύτταρα στρώνονται σε πιάτο petri σε αναλογία $2,5 \times 10^4$ κύτταρα/ml.
- Αρχικά στρώνονται σε μέσο καλλιέργειας μεσοδέρματος 1- MKM1 για 2,5 ημέρες χωρίς ενδιάμεση ανανέωση του θρεπτικού σε δύο διαφορετικές συνθήκες του MKM1 (MKM1A και MKM1B).
- Στη συνέχεια επαναιωρούμε τα συσσωματώματα., αφού τα μετρήσουμε σε μικροσκόπιο, σε μέσο καλλιέργειας μεσοδέρματος 2 – MKM2. Δύο διαφορετικές συνθήκες για MKM2 υπάρχουν (MKM2A και MKM2B) για κάθε μία από τις συνθήκες του MKM1. Έτσι από την 3^η ημέρα και μετά έχουμε 4 συνθήκες.
- Στο MKM2 παραμένουν για 3,5 ημέρες χωρίς ενδιάμεση ανανέωση του θρεπτικού.
- Ακολουθεί στρώσιμο των κυττάρων σε πηγαδάκι από 48άρι πιάτο που έχει επιστρωθεί με matrigel σε αναλογία 10 συσσωματώματα/πηγάδι σε μέσο καλλιέργειας τελικής μεσοδερμικής διαφοροποίησης- MKTMD.
- Στο MKTMD παραμένουν για 8 ημέρες με ενδιάμεσες ανανεώσεις του θρεπτικού κάθε 2 ημέρες. Το πρωτόκολλο διαρκεί συνολικά 14 ημέρες.

Σύσταση MKM1

MKM1A

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)
- Τρανσφερίνη 200μg/ml (Sigma)

- Bmp4 4ng/ml (R&D)

MKM1B

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)
- Τρανσφερρίνη 200μg/ml (Sigma)

Σύσταση MKM2

MKM2A

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)
- bFgf 5ng/ml (R&D)
- A-Ακτιβίνη 5ng/ml(Sigma)

MKM2B

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)

Σύσταση ΜΤΜΔ

- IMDM (+L-Γλουταμίνη) (GIBCO)
- Γενταμυκίνη 10μg/ml(GIBCO)
- Ασκορβικό οξύ 0.5mM(Sigma)
- β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM(GIBCO)
- 15% υποκατάστατο ορού μοσχαριού (SERUM-KNOCKOUT, GIBCO)
- bFgf 10ng/ml (R&D)
- VEGF 25ng/ml (Sigma)

Γ.2.9. Αποδιαφοροποίηση των ΕΣ 1,2 και 3 εβδομάδων και των κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος EBM

ΕΣ που καλλιεργήθηκαν για 1,2 και 3 εβδομάδες παρουσία ή απουσία G418 θρυψινοποιήθηκαν, κατά τα γνωστά και στη συνέχεια στρώθηκαν σε πηγαδάκια από 48αρι πιάτο που είχαν καλυφθεί με αποστειρωμένη καλυπτρίδα 10mm και ζελατινοποιηθεί κατά τα γνωστά σε αναλογία $10^4/ \text{cm}^2$. Η καλλιέργεια σε MKB με καθημερινή ανανέωση του θρεπτικού διαρκεί για 6 ημέρες.

Γ.3. Απομόνωση ολικού RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα EBK CCE, CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 4 ημέρες σε MKB, από ΕΣ από CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418, από κύτταρα πωτογενούς εξωδέρματος EBM, καθώς και από έμβρυα 9,5 και 10,5 ημερών (E9,5/10,5). Το RNA απομόνωθηκε με τη γνωστή μέθοδο Trizol.

Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA

- Αφού θρυψινοποιήσουμε τα κύτταρα EBK και τα φυγοκεντρήσουμε στα 300g για 5', ή αφήσουμε να καθιζάνουν τα ΕΣ, απομακρύνουμε το υπερκείμενο υπό κενό.
- Προσθέτουμε 1ml Trizol(Invitrogen) για κάθε 3-10X10⁶ κύτταρα και πιπετάρουμε επαναλαμβανόμενα μέχρι να σχηματισθεί ομοιογενές μίγμα και να μην είναι ορατά κύτταρα στο διάλυμα, δηλαδή να έχουν λυθεί.
- Αφήνουμε για 5' το μίγμα σε ΘΔ.
- Προσθέτουμε για κάθε 1ml Trizol 200μl χλωροφόρμιο και ανακινούμε πολύ δυνατά για 15'.
- Αφήνουμε το σωληνάκι erpenbdorf μέσα στο οποίο βρίσκεται το δείγμα σε ΘΔ για 10'.
- Φυγοκεντρούμε για 15' στις 12,000g στους 4°C.
- Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε άλλο σωληνάκι.
- Προσθέτουμε 0,5ml ισοπροπανόλης για κάθε 1ml Trizol και αφήνουμε σε ΘΔ για 10'.
- Φυγοκεντρούμε για 10' στις 12,000g στους 4°C.
- Απομακρύνουμε υπό κενό το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε 1ml 75% αιθανόλης για κάθε 1ml Trizol και αναμιγνύουμε με vortex.
- Φυγοκεντρούμε για 5' στις 7,500g στους 4°C.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Αφήνουμε το ίζημα RNA να στεγνώσει σε ΘΔ για 15'.
- Επαναδιαλύουμε σε αποστειρωμένο H₂O απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (H₂O for injections) και σε όγκο 50μl.

- Θερμαίνουμε για 10' στους 60°C για να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση του RNA.
- Τα δείγματα φωτομετρώνται σε φασματοφωτόμετρο και υπολογίζεται η καθαρότητά τους μέσω του λόγου 260/280.
- Τρέχουμε τα δείγματα σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 80V για 20' για να διαπιστώσουμε την ποιότητα του υλικού μας.
- Το RNA φυλάσσεται στους -80°C.

Γ.4. Κατεργασία με DNA ριβονουκλεάση, αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση cDNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR reaction)

Τα δείγματα ολικού RNA, που απομονώθηκαν από το προηγούμενο στάδιο, αρχικά υπέστησαν κατεργασία με DNA ριβονουκλεάση, προκειμένου να απαλλαγούμε από την παρουσία του γενωμικού DNA. Στη συνέχεια εκτελέσαμε την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής για να παραχθεί το συμπληρωματικό με το mRNA cDNA. Τα δείγματα με το cDNA χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR reaction).

Πρωτόκολλο κατεργασίας με DNA ριβονουκλεάση (DNAάση)

- Για κάθε 1μg ολικού RNA χρησιμοποιούμε 1μl διαλύματος DNAάσης (Promega) συγκέντρωσης 1u/μg RNA, το 1/10 του όγκου της αντίδρασης από το διάλυμα της αντίδρασης που είναι συγκεντρωμένο 10X και έχει σύσταση 400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO₄ and 10mM CaCl₂ και τον όγκο που περισσεύει με H₂O απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (H₂O for injections). Συνολικά ξεκινάμε από 5-20μg RNA.
- Αναμιγνύουμε καλά και επωάζουμε σε υδατόλουτρο 37°C για 30'.
- Προσθέτουμε 1μl διάλυμα παύσης της αντίδρασης που περιέχει αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) σε συγκέντρωση 20mM (pH 8.0) και επωάζουμε με για 10' σε υδατόλουτρο 65°C.
- Στη συνέχεια καθαρίζουμε το RNA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της καθίζησης με τη βοήθεια καθαρής αιθανόλης. Συγκεκριμένα, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- Αυξάνουμε τον όγκο της αντίδρασης μας και προσθέτουμε 2,5 όγκους παγωμένης καθαρής αιθανόλης και 1/10 του συνολικού όγκου διαλύματος οξικού νατρίου (CH₃COONa) pH5,2. Τοποθετούμε το δείγμα στους -20°C για 1ώρα.
- Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 12,000 g για 15' στους 4°C.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέτα και στη συνέχεια επαναιωρούμε το RNA σε 1ml 70% αιθανόλης.
- Φυγοκεντρούμε στις 7,500g για 5' στους 4°C.
- Επαναδιαλύουμε την πελλέτα του RNA σε 50μl H₂O απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (H₂O for injections).
- Τα δείγματα φωτομετρώνται σε φασματοφωτόμετρο και υπολογίζεται η καθαρότητά τους μέσω του λόγου 260/280.
- Τρέχουμε τα δείγματα σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 80V για 20' για να διαπιστώσουμε την ποιότητα του υλικού μας.
- Το RNA φυλάσσεται στους -80°C.

Πρωτόκολλο αντίστροφης μεταγραφής

Ξεκινώντας από 5μg ολικού RNA εκτελούμε την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής ως εξής:

- Σε σωληνάκι eppendorf προσθέτουμε όγκο από το καθαρισμένο με DNAάση RNA που αντιστοιχεί σε 5μg ολικού RNA
- Προσθέτουμε 1 μl διαλύματος oligομερών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων θυμιδίνης (oligodT) συγκέντρωσης 500ng/μl
- Αναμιγνύουμε καλά και φυγοκεντρούμε για 30'' στις 3,000g σε ΘΔ.
- Επωάζουμε στους 65°C για 5'.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε τα ακόλουθα:

- Διάλυμα αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής συγκεντρωμένο 5X σε όγκο ίσο με το 1/5 του συνολικού όγκου
- Διάλυμα 1,4 διθειοθρεϊτόλης (DTT) συγκέντρωσης 100mM σε όγκο ίσο με το 1/10 του συνολικού όγκου
- Διάλυμα αλβουμίνης ορού (BSA) συγκέντρωσης 100mg/ml σε όγκο ίσο με το 1/10 του τελικού όγκου
- Διάλυμα μίγματος δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) συγκέντρωσης για το καθένα από τα 4 (dATP, Dttp, dGTP, dCTP) 2,5mM σε όγκο ίσο με το 1/10 του τελικού
- Προσθέτουμε H₂O απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (H₂O for injections) αν χρειάζεται.
- Αναμιγνύουμε καλά και φυγοκεντρούμε για 30'' στις 3,000g σε ΘΔ.
- Επωάζουμε στους 37°C για 1'.
- Προσθέτουμε διάλυμα ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV συγκέντρωσης 1u/μl σε όγκο 2μl.
- Αναμιγνύουμε καλά και φυγοκεντρούμε για 30'' στις 3,000g σε ΘΔ.
- Επωάζουμε στους 37°C για 1 ώρα, προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και να παραχθεί το μονόκλωνο cDNA.
- Προσθέτουμε όγκο H₂O απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (H₂O for injections), αν χρειάζεται, προκειμένου να έχουμε τελική συγκέντρωση ολικού αρχικού RNA ίση με 50ng/μl.
- Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C.

Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR reaction)

Τα δείγματα με το cDNA χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης- AM-AAΠ (PCR reaction), χρησιμοποιώντας εκκινητές για μια σειρά από γονίδια, που αναφέρονται μαζί με τις αλληλουχίες των εκκινητών και τη θερμοκρασία υβριδισμού για κάθε εκκινητή στον πίνακα Γ.1.

Το γενικό πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-ΑΑΠ είναι το εξής:

- 94°C για 2'
- 94°C για 30''
- Θερμοκρασία υβριδισμού για 30''
- 72°C για 40''
- 72°C για 10'
- Τέλος της αντίδρασης

Γ.5. In situ RNA υβριδισμός

Γ.5.1. Μονιμοποίηση των κυττάρων

- ΕΣ από CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} που είχαν καλλιεργηθεί για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418 και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM μονιμοποιήθηκαν πριν να προχωρήσουμε στο πρωτόκολλο του υβριδισμού.

Πρωτόκολλο μονιμοποίησης

- Τα κύτταρα μονιμοποιούνται για 90' σε διάλυμα παγωμένης παραφορμαλδεΐδης 4% σε διάλυμα PB 0,12M, μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού καλλιέργειας.
- Στη συνέχεια τα συσσωματώματα ξεπλένονται με διάλυμα PBS_{DEPC}H₂O 0,1% Tween 2x από 10' στον πάγο.
- Έπειτα προχωρούμε σε σταδιακή αφυδάτωση με κατά σειρά διαδοχικά διαλύματα 25%, 50%, 75% και 100% παγωμένης μεθανόλης: PBS από μία φορά διάρκειας 10' το καθένα. Στη συνέχεια, τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στο τελευταίο αφυδατικό μέσο, το διάλυμα 100% μεθανόλης, στους -30°C.

Γ.5.2. Πρωτόκολλο In situ RNA υβριδισμού

Ημέρα 1^η:

- Επανεπιδάτωση των συσσωματωμάτων σε κατά σειρά διαδοχικά διαλύματα 75%, 50%, 25% μεθανόλης: PBS διάρκειας 5' η κάθε μια σε ΘΔ.
- Ξέπλυμα 2x με διάλυμα PBT από 5' σε ΘΔ.
- Λεύκανση (bleaching) με H₂O₂ 6% για 1 ώρα σε ΘΔ.
- Ξέπλυμα 3x με PBT από 5' σε ΘΔ.
- Επώαση με διάλυμα 10μg/ml προτεΐνάση K σε διάλυμα PBT σε ΘΔ για 3'.
- Επώαση με γλυκίνη 2mg/ml σε διάλυμα PBT σε ΘΔ για 5'.
- Ξέπλυμα 2x με διάλυμα PBT από 5' σε ΘΔ.
- Εκ νέου μονιμοποίηση με 0,2% γλουταραλδεΐδη/4% παραφορμαλδεΐδη σε διάλυμα PBT σε ΘΔ για 20'.
- Ξέπλυμα 2 φορές με διάλυμα PBT από 5' σε ΘΔ.
- Προυβριδισμός σε διάλυμα προυβριδισμού στους 70°C για 1ώρα. Το διάλυμα προυβριδισμού έχει ήδη προθερμανθεί στους 70°C πριν από τη χρήση.

- Υβριδισμός με τους κατάλληλους ιχνηθέτες O/N στους 70°C. Το διάλυμα υβριδισμού έχει ήδη προθερμανθεί στους 70°C πριν από τη χρήση. Οι ιχνηθέτες αποδιατάσσονται για 10' στους 80°C.

Ημέρα 2^η :

- Ξέπλυμα 2x με διάλυμα I από 30' στους 70°C.
- Ξέπλυμα 1x με διάλυμα I:διάλυμα II 1:1 από 10' στους 70°C.
- Ξέπλυμα 3x με διάλυμα II από 5' σε ΘΔ.
- Επώαση 2x με RNA ριβονουκλεάση (RNAάση) συγκέντρωσης 100μg/ml με διάλυμα II από 30' στους 37°C.
- Ξέπλυμα 1x με διάλυμα II, μετά με διάλυμα III από 5' σε ΘΔ.
- Ξέπλυμα 2x με διάλυμα II από 30' στους 65°C.
- Ξέπλυμα 3x με TBST για 5' σε ΘΔ.
- Μπλοκάρισμα σε 10% ορό προβάτου σε TBST για 21/2 ώρες.
- Επώαση με anti-DIG FAB (1/2000) σε ορό προβάτου 1% σε TBST O/N στους 4°C με συνεχή ανακίνηση.

Ημέρα 3^η

- Ξέπλυμα 6x με TBST για 1 ώρα σε ΘΔ με το τελευταίο ξέπλυμα να διαρκεί O/N στους 4°C με συνεχή ανακίνηση.

Ημέρα 4^η

- Ξέπλυμα 3x με διάλυμα NTMT από 10' σε ΘΔ.
- Επώαση σε 4.5μl NBT, 3.5μl BCIP/ml NTMT στο σκοτάδι σε ΘΔ.
- Σταμάτημα της αντίδρασης με ξέπλυμα 2x σε NTMT και μετά με PBT pH 5,5.

Διαλύματα του πρωτοκόλλου

Ημέρα 1^η

Όλα τα διαλύματα είναι φρέσκα, παρασκευάζονται την ίδια μέρα.

- H₂O₂: 1ml 30% και 4ml PBT
- προτεΐνάση K: 2,5μl (20mg/ml) σε 5ml RBT
- γλυκίνη: 2mg/ml σε PBT
- γλουταραλδεϋδη/παραφορμαλδεϋδη: 40μl 25%: 5ml/PBT
- διάλυμα προϋβριδισμού:

| | |
|------------------|------------|
| φορμαμίδιο | 6 ml |
| 20x SSC | 3ml |
| H ₂ O | 2,98ml |
| Tween 20 | 12μl |
| Ηπαρίνη 100mg/ml | <u>6μl</u> |
| | 12ml |
- διάλυμα υβριδισμού: 10μl tRNA (10mg/ml)

| |
|--------------------------------------|
| 10μl DNA από σπέρμα ρέγγας (10mg/ml) |
| Αποδιαταγμένο ιχνηθέτη 1:100 |
| 1ml διάλυμα προϋβριδισμού |

Ημέρα 2^η

- διάλυμα I:

| | |
|------------------|------------|
| φορμαμίδιο | 10ml |
| 20x SSC pH 4,5 | 4ml |
| 10% SDS | 2ml |
| H ₂ O | <u>4ml</u> |
| | 20ml |

Πριν να χρησιμοποιηθεί, προθερμαίνεται.

- διάλυμα II: 5M NaCl 20ml

| | |
|------------------|----------------|
| 2M Tris pH7,5 | 2ml |
| Tween 20 | 200μl |
| H ₂ O | <u>177,8ml</u> |
| | 200ml |

- διάλυμα III:

| | |
|------------------|------------|
| φορμαμίδιο | 10ml |
| 20x SSC pH 4,5 | 2ml |
| H ₂ O | <u>8ml</u> |
| | 20ml |

Πριν να χρησιμοποιηθεί, προθερμαίνεται.

- ορός προβάτου ο οποίος έχει ανενεργοποιηθεί για 30' στους 55°C και έχει φυλαχθεί στους -20°C.

Ημέρες 3-4

- 10x TBST:

| | |
|------------------|-----------------------|
| NaCl | 40g |
| KCl | 1g |
| 1M Tris pH7,5 | 125ml |
| H ₂ O | για τελικό όγκο 500ml |

Πριν από τη χρήση, προσθέτουμε Tween 20 σε αναλογία 1/1000.

- NTMT:

| | |
|----------------------|-----------------|
| 5M NaCl | 3ml |
| 1M Tris Ph9,5 | 15ml |
| Tween 20 | 150μl |
| 1M MgCl ₂ | 7,5 ml |
| H ₂ O | <u>124,35ml</u> |
| | 150ml |

Γ.6. Ανοσοφθορισμός

- ◆ Για τα EBK CCE και τα CCE^{Sox2βgeo/+}, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε πολυπιάτα των 48 πηγαδιών πάνω σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες των 10mm, ακολουθήθηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο.
 - Μονιμοποιούμε τα κύτταρα σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδη σε PB 0,12M για 15' στον πάγο, αφού έχουμε απομακρύνει υπό κενό το θρεπτικό καλλιέργειας.
 - Στη συνέχεια μπλοκάρουμε με διάλυμα μπλοκαρίσματος για 1 ώρα σε ΘΔ.
 - Επωάζουμε O/N με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι αραιωμένο σε διάλυμα μπλοκαρίσματος.
 - Την επόμενη μέρα ξεπλένουμε με PBT 3x από 10' σε ΘΔ με συνεχή ανακίνηση.
 - Επωάζουμε με δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε ΘΔ. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι αραιωμένο σε διάλυμα μπλοκαρίσματος. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι.
 - Ξεπλένουμε με PBT 3x από 10' σε ΘΔ με συνεχή ανακίνηση.
 - Επωάζουμε με DAPI, τη φθορίζουσα χρωστική 4',6'-διαμιδινό-φαινυλινδόλη που προσδέεται στο DNA και διεγείρεται στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο υπεριώδες.
 - Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρο ανοσοϊστοχημείας και, αφού στεγνώσουν, φυλάσσονται στους -20 °C.

Διαλύματα:

 - Διάλυμα μπλοκαρίσματος:
0,12M PB
0,15% γλυκίνη
0,1% TritonX
2mg/ml BSA

Το διάλυμα διηθείται πριν από τη χρήση με φίλτρο 0,22μm.

 - PBT: PBS 1M, 0,1% TritonX
- ◆ Για τα ΕΣ από CCE και τα CCE^{Sox2βgeo/+} που έχουν καλλιεργηθεί έως 21 ημέρες απουσία ή παρουσία G418 καθώς και για τα κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος

EBM ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με τη διαφορά ότι η αρχική μονιμοποίηση έγινε για 90'.

Γ.7. Ενζυμική αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης

Σε EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} καθώς και σε αποδιαφοροποιημένα κύτταρα από ΕΣ και από κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM εκτελέσαμε πρωτόκολλο ανίχνευσης ενζύμου αλκαλικής φωσφατάσης.

Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

- Μονιμοποιούμε τα κύτταρα για 2-3' σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδη σε PB 0,12M στον πάγο αφού έχουμε απομακρύνει το υπερκείμενο θρεπτικό.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με TBST(20Mm Tris-HCl, pH 7,4, 0,15M NaCl, 0.05%Tween-20).
- Επώαση με διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης από το KIT της Millipore: Fast Red Violet 0,8g/L : Ναφθόλη:H₂O σε αναλογία 2:1:1. Η επώαση γίνεται για 15' στο σκοτάδι σε ΘΔ.
- Απομακρύνουμε το ενζυμικό διάλυμα και ξεπλένουμε με PBS.

Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε και σε μονήρη κύτταρα από ΕΣ και από EBM με τον ίδιο τρόπο με τη μονη διαφορά ότι τα συσσωματώματα θρυψινοποιήθηκαν σε μονήρη κύτταρα κατά τα γνωστά και απλώθηκαν σε ζελατινοποιημένα πιάτα σε αναλογία 10⁴ κύτταρα/cm².

Γ.8. Αντίδραση ανίχνευσης β-γαλακτοσιδάσης

Σε EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} καθώς και σε ΕΣ και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM εκτελούμε πρωτόκολλο ανίχνευσης β-γαλακτοσιδάσης.

Πρωτόκολλο:

- Απομακρύνουμε το θρεπτικό καλλιέργειας.
- Πλένουμε με PBS σε ΘΔ
- Μονιμοποιούμε σε παγωμένο διάλυμα μονιμοποίησης για 5'.
- Ξεπλένουμε 3x από 5' με διάλυμα L
- Βαφουμε με φρέσκο της στιγμής διάλυμα αντίδρασης O/N σε ΘΔ.
- Την επόμενη μέρα ξεπλένουμε με PBS.

Διαλύματα:

- Διάλυμα μονιμοποίησης: 0,2% γλουταραλδεϋδη
2% φορμαλδεϋδη
σε διάλυμα L₀
- Διάλυμα αντίδρασης: Xgal διάλυμα 1mg/ml
K₃ Fe(CN)₆ 5mM
K₄ Fe (CN)₆ 5mM
σε διάλυμα L
- Διάλυμα L₀: MgCl₂ 2mM
EGTA 2mM
σε 100mM PB Ph7,2
- Διάλυμα L: MgCl₂ 2mM
EGTA 5mM
NP40 0,02%
Δεοξυχολικό Na 0,01%
σε 100mM PB pH7,2

Γ.9. Μεταμοσχεύσεις στη νεφρική κάψα ανοσοκατεσταλμένων ζώων

- Κύτταρα ΕΣ που είχαν καλλιεργηθεί για 21 ημέρες παρουσία ή απουσία G418, EBK, καθώς και κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος EBM, έγιναν εναιώρημα μονήρων κυττάρων με τη γνωστή μέθοδο που ακολουθήσαμε και παραπάνω με θρυψίνη.
- Από τα κύτταρα αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο υπό κενό και επαναιωρήσαμε σε PBS 2x και μετά σε όγκο 10-15μl από DMEM. Ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήσαμε ήταν 10^5 κύτταρα.
- Τα κύτταρα αυτά ενιέθηκαν σε νεφρική κάψα ανοσοκατεσταλμένου ζώου Rag⁻ σε γενετικό υπόβαθρο C57/BL6. Όλα τα ζώα ήταν του ίδιου γένους, στην περίπτωσή μας αρσενικά και ηλικίας 10-12 εβδομάδων.
- Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με αναισθητικό Κεταμίνης.
- Τα κύτταρα αφέθηκαν στη συνέχεια μέσα στο σώμα του ζώου για διάστημα 2 μηνών.
- Στη συνέχεια τα ζώα θυσιάστηκαν με ρήξη σπονδυλικής στήλης στην αυχενική χώρα..

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1. Χαρακτηρισμός κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$.

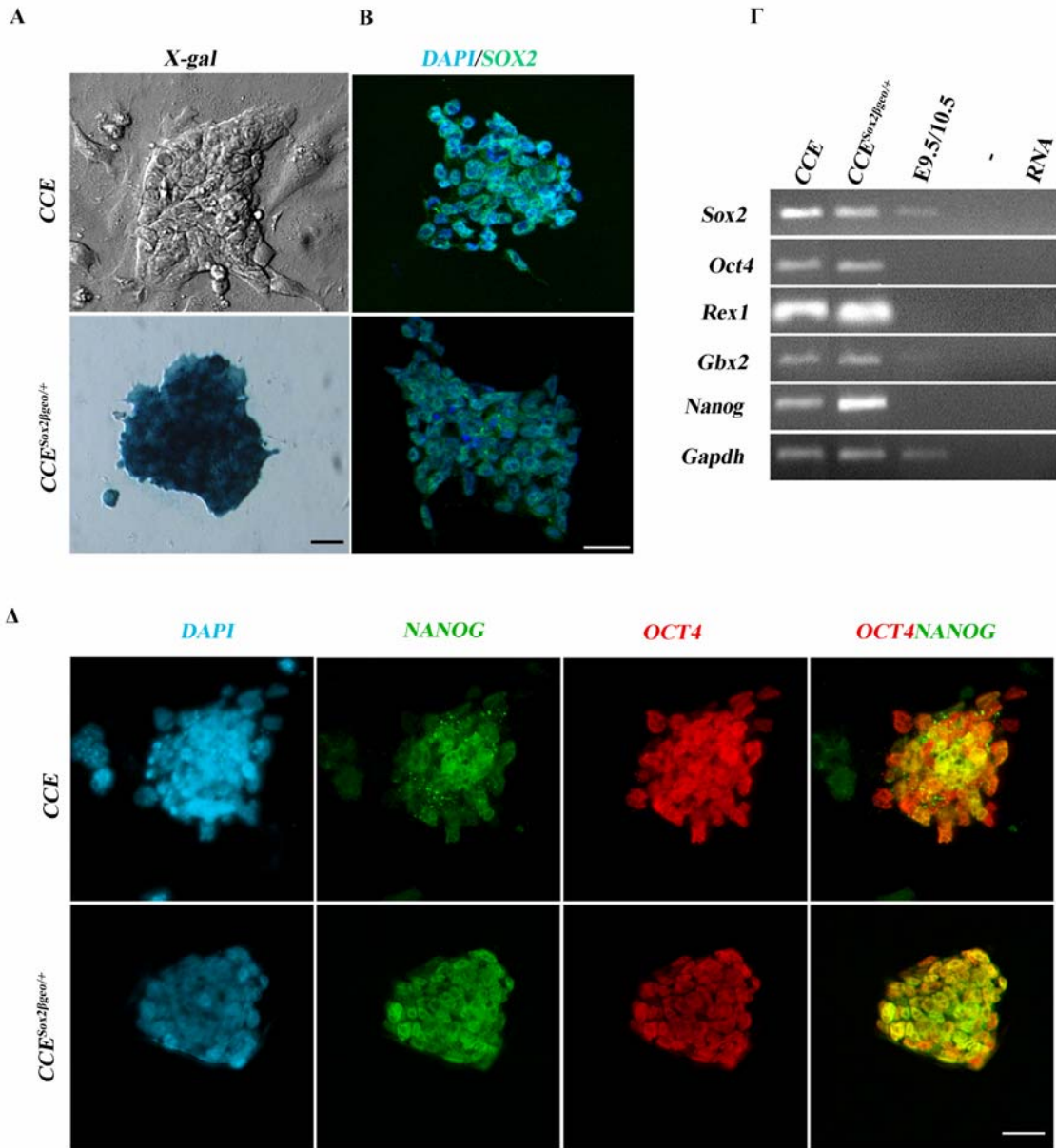
Δ.1.1. Τα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$ αντιπροσωπεύουν έναν υποπληθυσμό εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν ομοιογενώς Nanog.

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού της ήδη δημοσιευμένης κυτταροσειράς CCE που εκφράζουν το αλληλόμορφο $Sox2^{\beta geo}$ ($CCE^{Sox2\beta geo/+}$) καλλιεργήθηκαν όντας προσκολλημένα στην επιφάνεια τρυβλίων κυτταροκαλλιέργειας (adherent cells in TC dishes), επεξεργασμένων με επικάλυψη ζωϊκής ζελατίνης, παρουσία ορού εμβρύου βοδιού (FCS). Τα κύτταρα σχημάτισαν χαρακτηριστικές τρισδιάστατες αποικίες (ESC colonies) παρόντων των LIF και G418. Ο αυξητικός παράγοντας LIF κράτησε τα κύτταρα αδιαφοροποίητα, ενώ το αντιβιοτικό G418 (gentamycin) επέτρεψε την επιλογή μόνο των κυττάρων εκείνων που εκφράζουν το Sox2. Παράλληλα καλλιεργήθηκαν και κύτταρα CCE, που είναι αγρίου τύπου και δε φέρουν την κασσέτα βgeo , παρουσία LIF αλλά όχι G418. Και στους δύο πληθυσμούς πραγματοποιήθηκε χρώση για την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία χρωματίζει κυανά όλα τα κύτταρα που φέρουν την κασσέτα βgeo . Πράγματι επιβεβαιώθηκε ότι όλα τα κύτταρα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$ φέρουν την κασσέτα, σε αντίθεση με τα CCE αγρίου τύπου που δε βάφονται κυανά (Εικόνα Δ1.A).

Στη συνέχεια απομονώθηκε ολικό RNA από τους δύο πληθυσμούς για να συγκριθούν ως προς την έκφραση σημαντικών γονιδίων πλειοδυναμίας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθείται από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-AM-AAΠ (RT-PCR). Έτσι, διαπιστώθηκε ότι και οι δύο πληθυσμοί εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα βασικούς πλειοειδικούς παράγοντες, όπως τους Oct4, Rex1, Gbx2, Sox2. Το πιο σημαντικό εύρημα της ανάλυσης αυτής αφορά την παρατήρηση ότι τα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$ εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του πλειοειδικού παράγοντα Nanog σε σχέση με τα ούτως ή άλλως υψηλά της σειράς CCE (Εικόνα Δ1.B). Η παρατήρηση αυτή συνδυάστηκε και με πρωτεϊνική ανάλυση με ανοσοφθορισμό. Η πρωτεΐνη NANOG εκφράζεται ομοιογενώς στα κύτταρα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$ σε αντίθεση με τα ανομοιογενή ως προς το Nanog CCE (Εικόνα Δ.1.Γ). Αντιθέτως, τόσο η πρωτεΐνη SOX2 (Εικόνα Δ.1.A) όσο και η πρωτεΐνη Oct4 (Εικόνα Δ.1.Γ) εκφράζονται

ομοιογενώς τόσο στα CCE όσο και στα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$. Η ομοιογενής παρουσία της πρωτεΐνης SOX2 και στους δύο πληθυσμούς, CCE όσο και στα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$, συνδυασμό με το αποτέλεσμα της AM-AAΠ και της β-γαλακτοσιδάσης, δείχνουν ότι στα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$ λειτουργούν και τα δύο αλληλόμορφα του Sox2.

Η σημαντικότητα του ευρήματος για την ομοιογένεια του Nanog στα $CCE^{Sox2\beta geo/+}$ έγκειται στο γεγονός ότι με βάση πρόσφατα δεδομένα οι πληθυσμοί EBK είναι ετερογενείς ως προς την έκφραση βασικών παραγόντων πλειοδυναμίας, όπως του Nanog (Amar M. Singh, 2007). Η ετερογένειά τους αυτή αντανακλά διαφορετικά αναπτυξιακά δυναμικά μεταξύ των επιμέρους υποπληθυσμών. Έτσι ο υποπληθυσμός με υψηλή έκφραση Nanog υπό συνθήκες διαφοροποίησης δίνει διαφοροποιημένα παράγωγα που προέρχονται από τα τρία βλαστικά δέρματα, ενώ εκείνος με χαμηλή έκφραση εκφράζει παράγοντες ΠΕ και διαφοροποιείται προς τα αντίστοιχα παράγωγα. Υπό το πρίσμα αυτών των δεδομένων, ένας κυτταρικός υποπληθυσμός των EBK, που προορίζεται να δώσει διαφοροποιημένα παράγωγα από όλα τα βλαστικά δέρματα, συνιστά χρήσιμο εργαλείο για την παραγωγή πρόδρομων εξωδερμικών κυττάρων *in vitro*, που έχουν χαρακτήρα πολύ κοντά σε αυτόν της επιβλάστης, του πρόδρομου όλων των εμβρυϊκών βλαστικών δερμάτων.

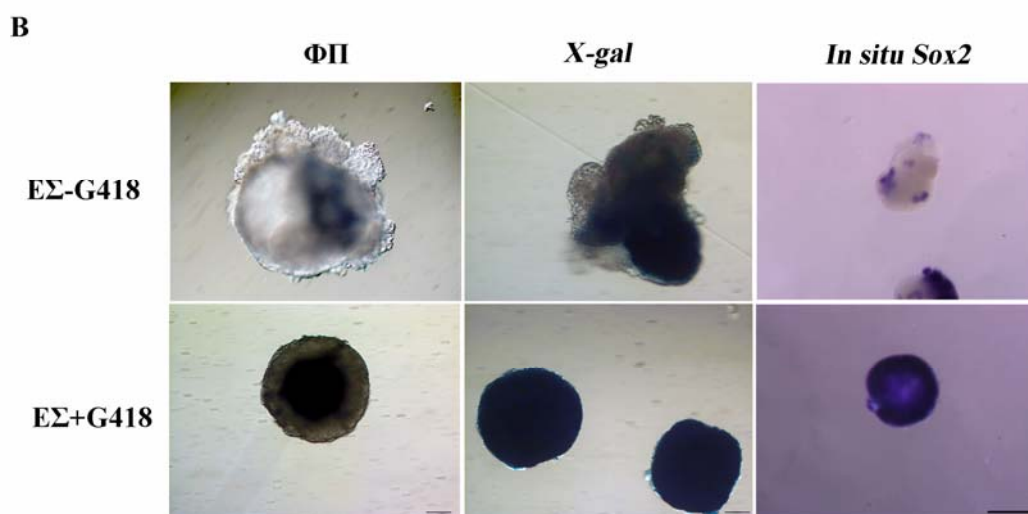
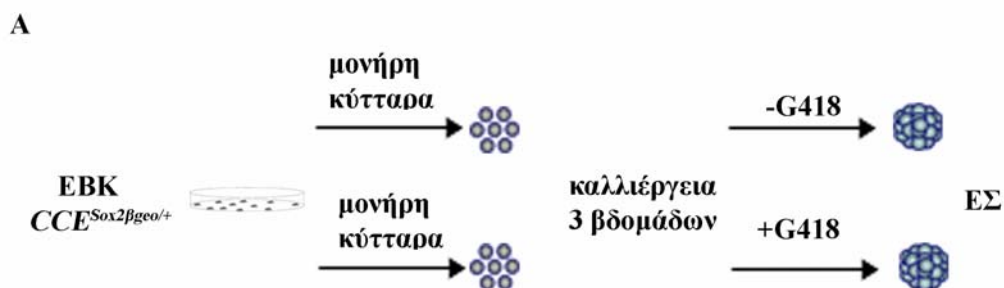


Εικόνα Δ.1: Χαρακτηρισμός των EBK CCE^{Sox2βgeo/+} .A. Χρώση X-gal για EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} . Μόνο τα CCE^{Sox2βgeo/+} χρωματίζονται κυανά με χρώση X-gal. B. Ανοσοφθορισμός για την πρωτεΐνη SOX2 των EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} . Και οι δύο πληθυσμοί εκφράζουν SOX2 Γ. Ανάλυση του προτύπου έκφρασης των EBK CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} με ΑΑΠΑΜ. Το Nanog εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα CCE^{Sox2βgeo/+} από ό,τι στα CCE. (-):αρνητικό, απουσία DNA. Δ. Ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες NANOG και OCT4 στα CCE και CCE^{Sox2βgeo/+} . Η πρωτεΐνη NANOG εκφράζεται ομοιογενώς στα CCE^{Sox2βgeo/+} σε σύγκριση με την ανομοιογενή έκφραση στα CCE. DAPI:4,6 διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη, φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται ισχυρά στο DNA. κλίμακα: 25μm για το δεξί μέρος του 1A και για το 1Γ και 50μm για το αριστερό μέρος της 1A.

Δ.1.2. Παραγωγή συσσωματωμάτων με επιλογή για την συνεχή έκφραση του πλειοδύναμου παράγοντα Sox2.

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα CCE^{Sox2βgeo/+} καλλιεργημένα υπό τις παραπάνω συνθήκες τοποθετήθηκαν ως μονήρη σε πιάτα petri για να καλλιεργηθούν σε εναιώρημα για 3 εβδομάδες σε μέσο καλλιέργειας που περιείχε ορό αλλά απουσίαζε το LIF παροντός του G418, προκειμένου να επιλέξουμε μόνο για τα κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο Sox2 κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Έτσι σχηματίστηκαν ομοιογενή ως προς την έκφραση του Sox2 συσσωματώματα σε εναιώρημα. Ως πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήσαμε εναιώρημα κυττάρων επίσης για 3 εβδομάδες στο ίδιο μέσο καλλιέργειας, αλλά απόντος του G418. (Εικόνα Δ.2.A).

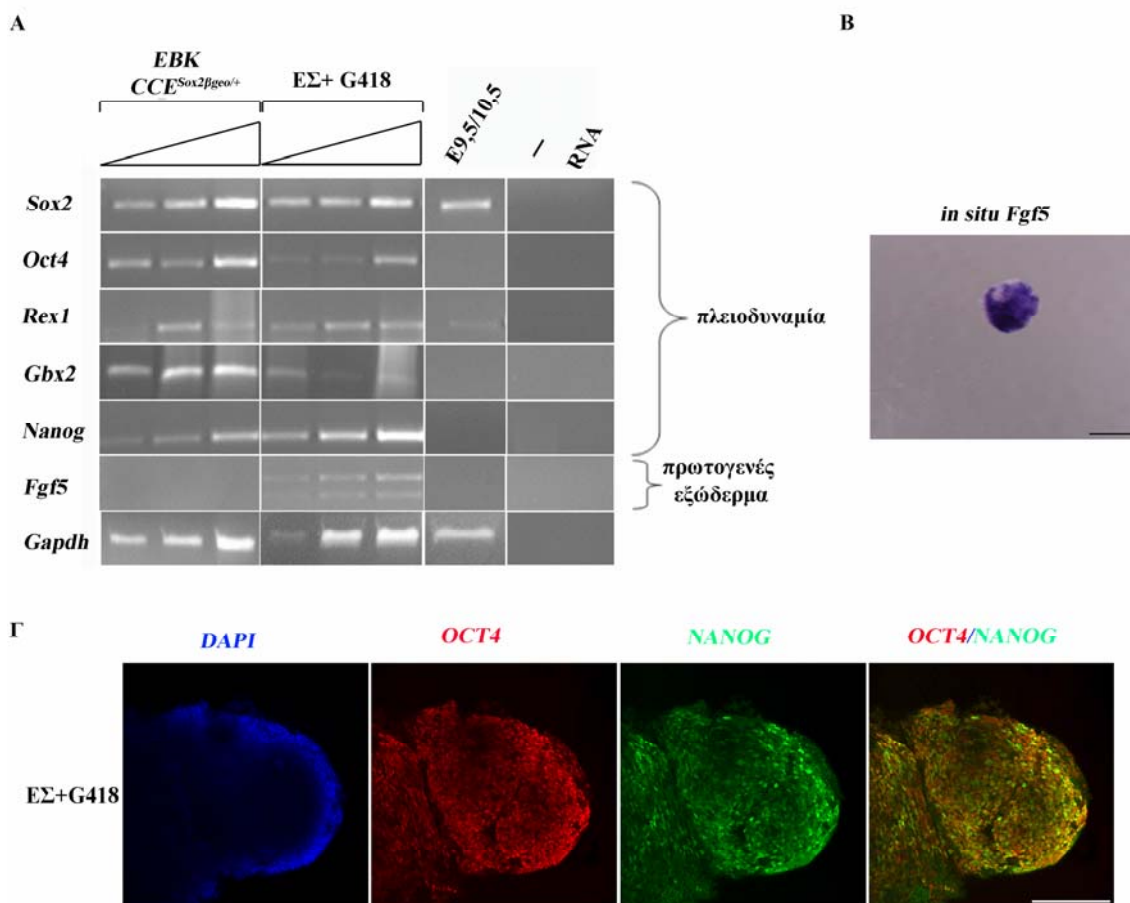
Τα ΕΣ που σχηματίστηκαν παρουσία του αντιβιοτικού παρουσιάζουν σφαιροειδή μορφή με ένα κυτταρικό επιθηλιακό στρώμα εξωτερικά, όμοιο στην όψη με αυτό της επιβλάστης του εμβρύου και των δημοσιευμένων κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος EBM. Αντιθέτως, τα ΕΣ απουσία του αντιβιοτικού παρουσιάζουν την τυπική μορφή ΕΣ με τα πολλά αδιάτακτα και αποδιοργανωμένα κυτταρικά στρώματα (Εικόνα Δ.2.B ΦΠ:φωτεινό πεδίο). Χρώση β-γαλακτοσιδάσης για τα ΕΣ που καλλιεργήσαμε απόντος και παρόντος του G418 έδειξε ότι όλα τα κύτταρα των συσσωματωμάτων που καλλιεργούνται παρόντος του G418 χρωματίζονται κυανά, ενώ αυτά που καλλιεργούνται απόντος του G418 βάφουν κυανά μόνο μικρές περιοχές τους, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία του υποκινητή του στοχευμένου αλληλόμορφου στις καλλιέργειες ΕΣ απουσία του G418 περιορίζεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σε συγκεκριμένες θέσεις που αντιστοιχούν με βάση τη βιβλιογραφία σε παράγωγα εξωδερμικής προέλευσης (Εικόνα Δ.2.B-X-gal). In situ υβριδισμός για το Sox2 σε ΕΣ παρουσία και απουσία του αντιβιοτικού έδωσε το ίδιο πρότυπο με τη χρώση X-gal, υποδεικνύοντας ότι και το μη στοχευμένο αλληλόμορφο του Sox2 λειτουργεί κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου.



Εικόνα Δ.2: Η μέθοδος καλλιέργειας, η μορφή των συσσωματωμάτων και η έκφραση του Sox2 σε αυτά. **A.** Η μέθοδος καλλιέργειας των συσσωματωμάτων. **B.** ΦΠ: Φωτεινό πεδίο, χρώση X-gal και in situ υβριδισμός για το Sox2 των συσσωματωμάτων παρουσία και απουσία G418, όπου φαίνεται η διαφορά στην έκφραση του Sox2 και στη μορφολογία. ΕΣ: Εμβρυοειδή Συσσωματώματα. Για ΦΠ και X-gal κλίμακα 125μm και για τον υβριδισμό in situ 500μm.

Δ.1.3. Τα ΕΣ με επιλογή για την έκφραση του Sox2 παρουσιάζουν μεταγραφικό προφίλ και μεταφραστικό προφίλ που προσιδιάζει στα κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος.

Από τον κυτταρικό πληθυσμό των ΕΣ που έχουν καλλιιεργηθεί παρουσία G418, όπως και από τα CCE^{Sox2βgeo/+}, απομονώθηκε ολικό RNA με τη μέθοδο Trizol. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αντίστροφης μεταγραφής που ακολουθείται από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-AM-ΑΑΠ (RT-PCR) συγκρίναμε ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς την έκφραση για μια σειρά από πλειοειδικούς παράγοντες (βλαστοκύστη) και το σηματοδοτικό μόριο Fgf5, που αποτελεί γνωστό μάρτυρα για το στάδιο του πρωτογενούς εξωδέρματος στην πρώιμη ανάπτυξη (εικόνα Δ.3.Α). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και στους 2 πληθυσμούς εκφράζονται και τα τρία πλειοειδικά γονίδια Sox2, Oct4, και Rex1, αν και στα συσσωματώματα έχουμε χαμηλότερα επίπεδα. Ωστόσο, το ενδιαφέρον εστιάζεται στη σημαντική πτώση των επιπέδων του Gbx2 και άνοδο των επιπέδων του Nanog στα συσσωματώματα των τριών εβδομάδων σε σύγκριση με τα EBK, κάτι το οποίο συνάδει με τις υπάρχουσες αναφορές για τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών στο πρωτογενές εξώδερμα. Μάλιστα εκφράζουν και τις πρωτεΐνες OCT4 και NANOG σε υψηλά επίπεδα και ομοιογενώς (εικόνα.Δ.3.Γ). Επίσης στους κυτταρικούς πληθυσμούς που παράγουμε παρατηρούμε την έκφραση του γονιδίου Fgf5, σε αντίθεση με τα EBK. Υβριδισμός in situ για το γονίδιο Fgf5 έδειξε την ομοιογενή του έκφραση στα ΕΣ που καλλιιεργήσαμε (εικόνα Δ.3.Β). Έτσι, η ανάλυσή μας έδειξε ότι προκειται για κύτταρα με προφίλ όμοιο με του πρωτογενούς εξωδέρματος. Για αυτό και ονομάσαμε τα κύτταρα αυτά **ΚΠΕ**.



Εικόνα Δ.3: Α. Το μεταγραφικό και μεταφραστικό προφίλ των ΚΠΕ. Α. Τα συσσωματώματα που καλλιεργούμε (κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος-ΚΠΕ) εκφράζουν σε επίπεδο mRNA όλους τους σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες πλειοδυναμίας και επιπλέον το σηματοδοτικό μόριο Fgf5, που είναι μάρτυρας του πρωτογενούς εξωδέρματος. Β. In situ υβριδισμός για το Fgf5, που εκφράζεται στα ΚΠΕ ομοιογενώς. Γ. Ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες OCT4 και NANOG, που εκφράζονται ομοιογενώς στα ΚΠΕ. Κλίμακα 500μm για το Β και 250μm για το Γ.

Δ.1.4. Ανάλυση του χαρακτήρα της πλειοδυναμίας των ΚΠΕ.

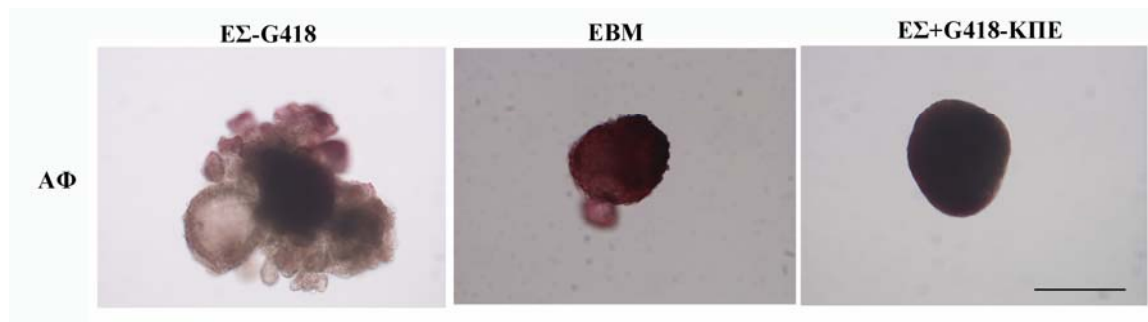
Το πρωτογενές εξώδερμα συνεπάγεται διατήρηση της πλειοδυναμίας. Ελέγξαμε την πλειοδυναμία των ΚΠΕ με χρώση αλκαλικής φωσφατάσης-ΑΦ, που είναι μάρτυρας για πλειοδύναμα κύτταρα. Αρχικά κάναμε χρώση σε ολόκληρα συσσωματώματα από ΚΠΕ και ΕΣ τριών εβδομάδων και ΕΒΜ (εικόνα Δ.4). Τα ΕΣ βάφουν σε μεμονωμένες περιοχές, ενώ τα ΚΠΕ και ΕΒΜ βάφουν ολόκληρα.

Στη συνέχεια και προκειμένου να διαπιστώσουμε για τα ΕΣ και ΚΠΕ, κατά πόσο το ποσοστό των θετικών σε αλκαλική φωσφατάση κυττάρων μεταβάλλεται συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας, προβήκαμε σε διάλυση συσσωματωμάτων από τρία συγκεκριμένα χρονικά σημεία της καλλιέργειας, την 1^η, τη 2^η και την 3^η εβδομάδα και μετρήσαμε μονήρη κύτταρα βαμμένα με αλκαλική φωσφατάση και β-γαλακτοσιδάση, προκειμένου να δούμε κατά πόσο ο αριθμός των θετικών στην αλκαλική φωσφατάση ανταποκρίνεται και στον αριθμό των θετικών στη χρώση β-γαλακτοσιδάση (εικόνα Δ.5.Α και Δ.5.Β). Διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των θετικών στην αλκαλική φωσφατάση κυττάρων των ΚΠΕ ανέρχεται κατά την εξέλιξη της καλλιέργειας και φτάνει στις 3 εβδομάδες σε ποσοστά (90%), πολύ κοντινά με αυτά των ΕΒΚ, σε αντίθεση με το λιγότερο του 1% στο ίδιο διάστημα στα ΕΣ χωρίς την επιλογή για το Sox2. Με χρώση για την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης διαπιστώσαμε ακόμα ότι ο αριθμός των θετικών στην αλκαλική φωσφατάση κυττάρων είναι πολύ κοντά σε αυτόν των κυττάρων που εκφράζουν Sox2 στο ίδιο διάστημα, όπως και αναμενόταν. Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι ο χαρακτήρας του πληθυσμού των κυττάρων ΚΠΕ αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ως αποτέλεσμα αυτής, ήτοι δεν υπήρχε εξαρχής.

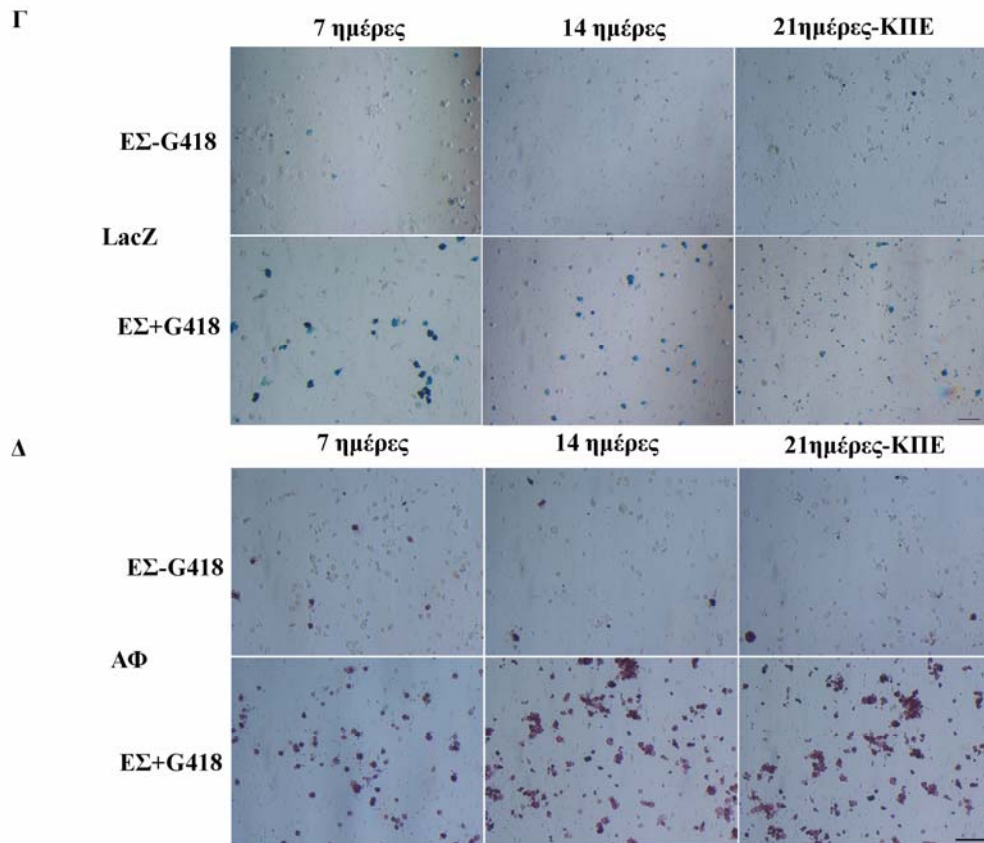
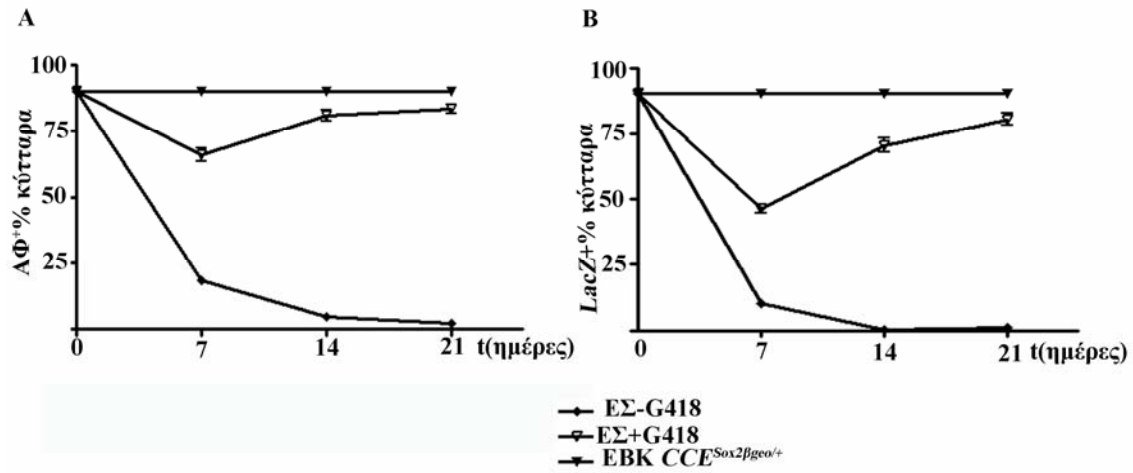
Ταυτόχρονα, εξετάσαμε, αν τα ΚΠΕ μπορούν να καλλιεργηθούν σε συνθήκες καλλιέργειας ΕΒΚ, όπως θεωρείται ότι μπορούν να το κάνουν κύτταρα που βρίσκονται εντός της πλειοδυναμίας. Ελέγξαμε τη δυνατότητα των ΚΠΕ να δημιουργούν υπό συνθήκες καλλιέργειας ΕΒΚ αποικίες μορφολογίας ΕΒΚ, που είναι θετικές στην αλκαλική φωσφατάση και τα συγκρίναμε με τα ΕΣ και τα ΕΒΜ. Πράγματι αυτή η ιδιότητα των ΚΠΕ επιβεβαιώθηκε, όπως και για τα ΕΒΜ (εικόνα Δ.6.Β). Αμφότερα, όπως και τα ΕΒΚ, μπορούν να καλλιεργηθούν υπό αυτές τις συνθήκες και να δώσουν αποικίες που στη μεγάλη τους πλειονότητα είναι όμοιες με αυτές των ΕΒΚ. Αυτό δείχνει

ότι τα ΚΠΕ ,όπως και τα EBM, έχουν διατηρήσει στοιχεία των EBK από τα οποία προέρχονται. Αντιθέτως τα ΕΣ δεν δύνανται να καλλιεργηθούν υπό αυτές τις συνθήκες, καθώς πρόκειται για ανάμικτο πληθυσμό από διαφοροποιημένα κύτταρα. Για αυτό και παρουσία του LIF δίνουν μόνο διαφοροποιημένες αποικίες. Απουσία του LIF κανείς απύς τρεις πληθυσμούς, ούτε τα EBK, δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε αποικίες που στην πλειονότητά τους είναι σαν αυτές των EBK.

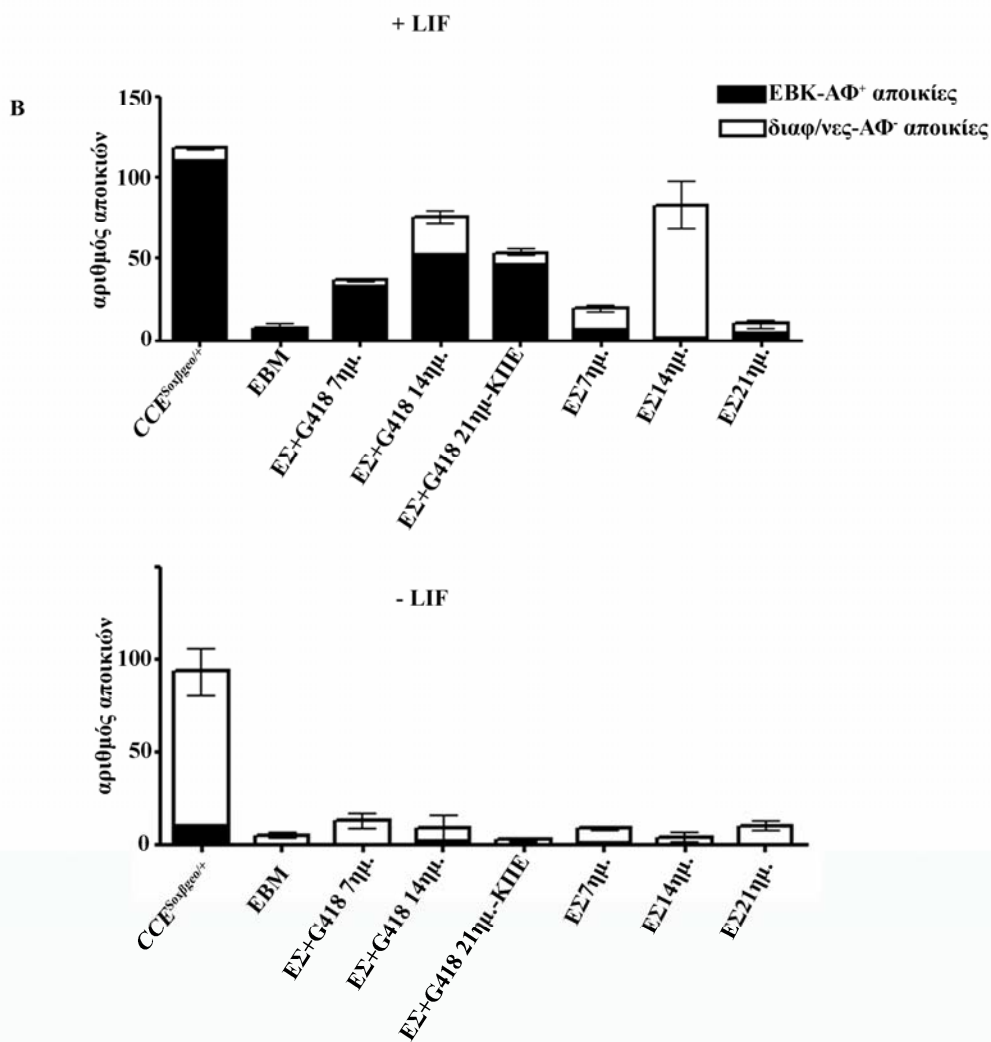
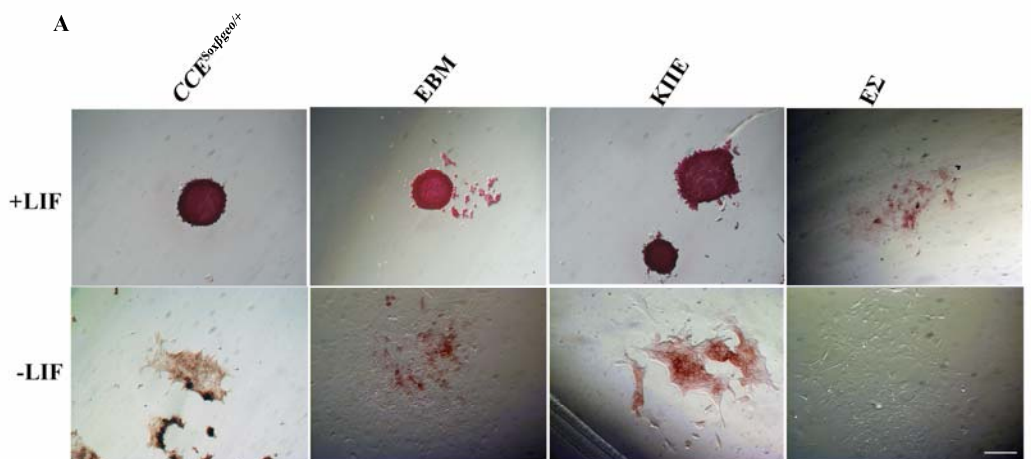
Ακόμα, εξετάσαμε τη δυνατότητα των ΚΠΕ να δίνουν δευτερογενή συσσωματώματα (εικόνα Δ.7). Πράγματι τα ΕΣ που καλλιεργούνται παρουσία του αντιβιοτικού, διατηρούν δηλαδή μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν Sox2, μετά από 3 βδομάδες καλλιέργειας, όπου πια μιλάμε για ΚΠΕ, δίνουν αριθμό δευτερογενών συσσωματωμάτων όμοιο με αυτό των EBM, σαφώς μεγαλύτερο από αυτό των ΕΣ χωρίς την επιλογή αλλά και των ΕΣ με επιλογή μέχρι και 2 βδομάδες. Το τελευταίο αυτό υποδεικνύει ότι ο χαρακτήρας των ΚΠΕ δεν υπήρχε από την αρχή της καλλιέργειας αλλά αποκτήθηκε συν τω χρόνω. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της εικόνας Δ.5 (Α και Β), όπου παρατηρήσαμε αύξηση των θετικών στην αλκαλική φωσφατάση και τη β-γαλακτοσιδάση κυττάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ακόμα, τα ΚΠΕ μπορούν να δώσουν τον ίδιο αριθμό συσσωματωμάτων και μετά από 10 ανακαλλιέργειες των συσσωματωμάτων τους (P10), κάτι το οποίο παραπέμπει σε αδιαφοροποίητα κύτταρα. Βεβαίως, τα ΚΠΕ, όπως και τα EBM, μπορούν να δώσουν μόνο ένα μέρος των συσσωματωμάτων που μπορούν τα EBK, υποδεικνύοντας έτσι και το διακριτό τους στάδιο.



Εικόνα Δ.4: Χρώση αλκαλικής φωσφατάσης σε ολόκληρα συσσωματώματα ΕΣ, ΕΒΜ και ΚΠΕ. Σε αντίθεση με τα ΕΣ που βάφουν σε μεμονωμένες μόνο περιοχές τους μάλιστα πολύ αγνά, τα ΕΒΜ και ΚΠΕ χρωματίζονται ολόκληρα κοκκίνα. Κλίμακα 125μm. ΕΣ: Εμβρυοειδή Σωματίδια, ΕΒΜ: κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος ΕΒΜ, ΚΠΕ:Κύτταρα Πρωτογενούς Εξωδέρματος

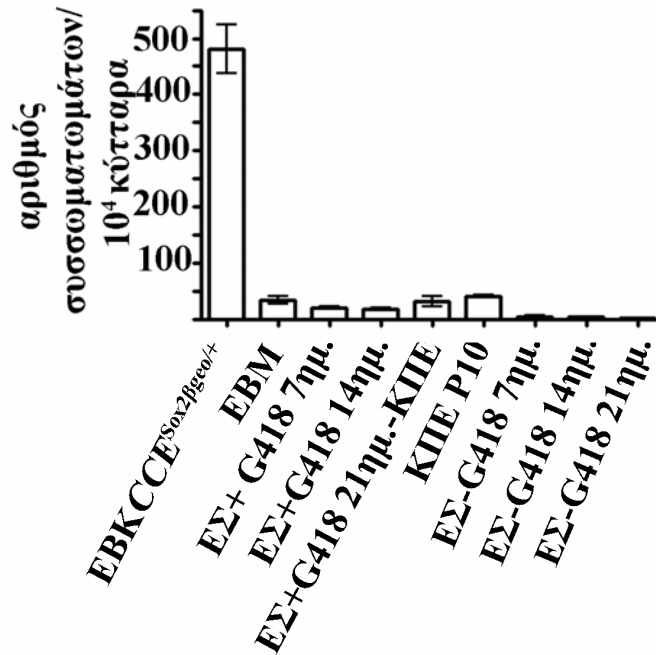


Εικόνα Δ.5: Μέτρηση του ποσοστού των θετικών κυττάρων στην αλκαλική φωσφατάση και στη β-γαλακτοσιδάση κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τριών εβδομάδων σε χρονικά σημεία 1, 2 και 3 εβδομάδων. Α. Ποσοστό των θετικών στην αλκαλική φωσφατάση κυττάρων από ΕΣ και από ΚΠΕ. Β. Ποσοστό των θετικών στη β-γαλακτοσιδάση κυττάρων από ΕΣ και από ΚΠΕ. Γ-Δ: Φωτογραφίες των αντίστοιχων κυττάρων και χρονικών σημείων της καλλιέργειας των Α και Β. ΕΣ:Εμβρυοειδή Συσσωματώματα, ΚΠΕ:Κύτταρα Πρωτογενούς Εξωδερματος, ΕΒΚ: Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα.. Κλίμακα 125μm



Εικονα Δ.6: Τα ΚΠΕ όπως και τα ΕΒΜ μπορούν να καλλιεργηθούν και να δώσουν αποικίες ΕΒΚ, αν καλλιεργηθούν παρουσία LIF. Α. Αποικίες από ΕΒΚ, ΚΠΕ και ΕΒΜ καλλιέργηθηκαν παρουσία ή απουσία LIF. Μόνο παρουσία της κυτοκίνης και μόνο

τα ΕΒΚ, ΚΠΕ και ΕΒΜ μπορούν να καλλιεργηθούν, δίδοντας ΕΒΚ αποικίες θετικές στην αλκαλική φωσφατάση. Β.Τα ποσοστά των θετικών και αρνητικών αποικιών μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας. ΚΠΕ: Κύτταρα Πρωτογενούς Εξωδέρματος, ΕΣ: Εμβρυοειδή Συσσωματώματα, ΕΒΚ: Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα, Κλίμακα 125μm.



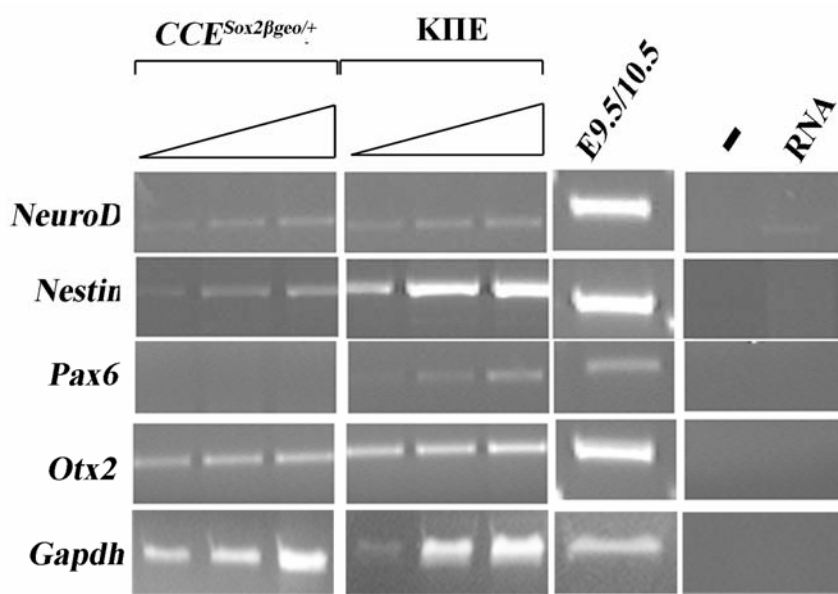
Εικόνα Δ.7: Ικανότητα των ΚΠΕ, όπως και των ΕΒΜ να δίνουν δευτερογενή συσσωματώματα. Σε αντίθεση με τα ΕΣ χωρίς επιλογή για το Sox2 και τα ΕΣ με επιλογή για μόνο 2 εβδομάδες, τα ΚΠΕ και τα ΕΒΜ μπορούν να δώσουν μόνο, αλλά μόνο ένα ποσοστό των συσσωματωμάτων που μπορούν να δώσουν τα ΕΒΚ. Παρόλα αυτό τον αριθμό μπορούν να το δώσουν και μετά από 10 ανακαλλιέργειες.

Δ.2. Διαφοροποίηση των ΚΠΕ

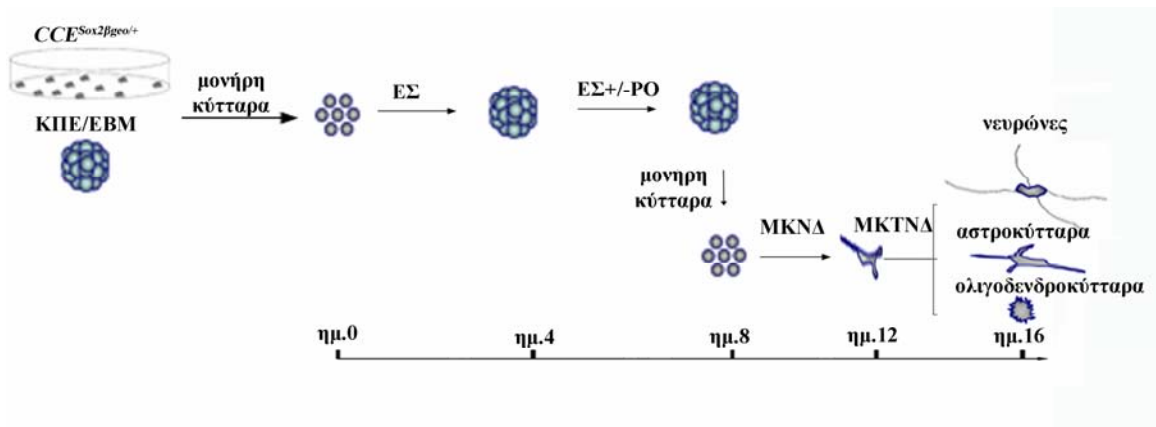
Δ.2.1. Διαφοροποίηση των ΚΠΕ σε διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα.

Στα ΚΠΕ παρατηρούμε αυξημένη έκφραση των νευροεξωδερμικών παραγόντων Nestin, Nkx2.2, Pax6, Otx2 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο AM-ΑΑΠ (Εικόνα Δ.8.Α). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν την παραγωγή κυττάρων αρχέγονου εξωδέρματος με νευροεξωδερμικό χαρακτήρα.. Ο νευροεξωδερμικός χαρακτήρας των ΚΠΕ δηλώνει δυναμικό διαφοροποίησης προς νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα.. Εφαρμόσαμε πρωτόκολλο γνωστό απο τη βιβλιογραφία(Meng Li*, 1998), για την παραγωγή καθαρών πληθυσμών νευρώνων, ασκροκυττάρων και ολιγοδενδροκυττάρων (εικόνα Δ.8.Β). Αυτό επιβεβαιώθηκε, επάγοντας νευρική διαφοροποίηση κυττάρων ΚΠΕ με γνωστό πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί ρετινοϊκό οξύ και το νευρογενή αυξητικό παράγοντα Fgf, σε επίσης νευρογενή υποστρώματα d-πολυλυσίνης και λαμινίνης. Το αποτέλεσμα είναι κύτταρα που εκφράζουν την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη TUJ1, που είναι μάρτυρας για νευρώνες, σε ποσοστά πολύ κοντά σε αυτά των EBK και των EBM (εικόνα Δ.9.Α και Β). Αντιθέτως, δεν πήραμε κύτταρα που εκφράζουν GFAP (αστροκύτταρα) ενώ ελάχιστα είναι αυτά που εκφράζουν O4 (ολιγοδενδροκύτταρα) Το ρετινοϊκό οξύ επιβεβαίωσε την ικανότητά του ως νευρογενής παράγοντας, αφού με την προσθήκη αυτού δημιουργούνται πολλοί περισσότεροι νευρώνες από ό,τι με αιθανόλη, που είναι το πείραμα ελέγχου (Δ.9.Β). Παρουσία ορού 1%, συνθήκη γνωστή για γένεση ολιγοδενδροκυττάρων, η κατεύθυνση διαφοροποίησης αλλάζει, οπότε δημιουργούνται κύτταρα που εκφράζουν O4 σε ποσοστά ανάλογα με αυτά που είχαμε απουσία ορού για τους νευρώνες (εικόνα Δ.10. Α. και Β.). Το ρετινοϊκό οξύ και πάλι αυξάνει δραματικά το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν O4, κάτι το οποίο δείχνει ότι επάγει και άλλες γενεαλογίες εκτός από τη νευρωνική. Η απουσία αστροκυττάρων ίσως έχει να κάνει με τεχνικό πρόβλημα του αντισώματος.

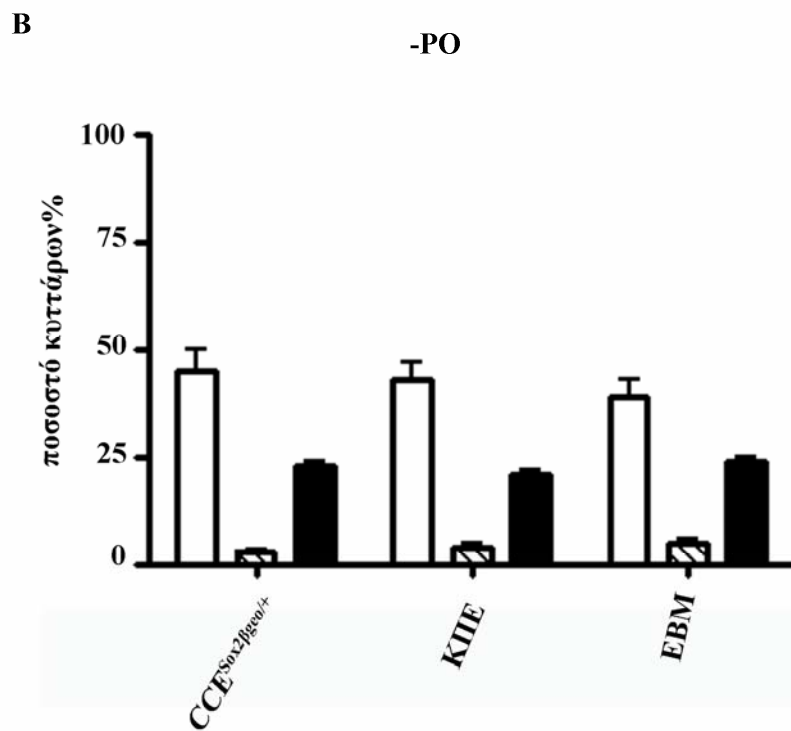
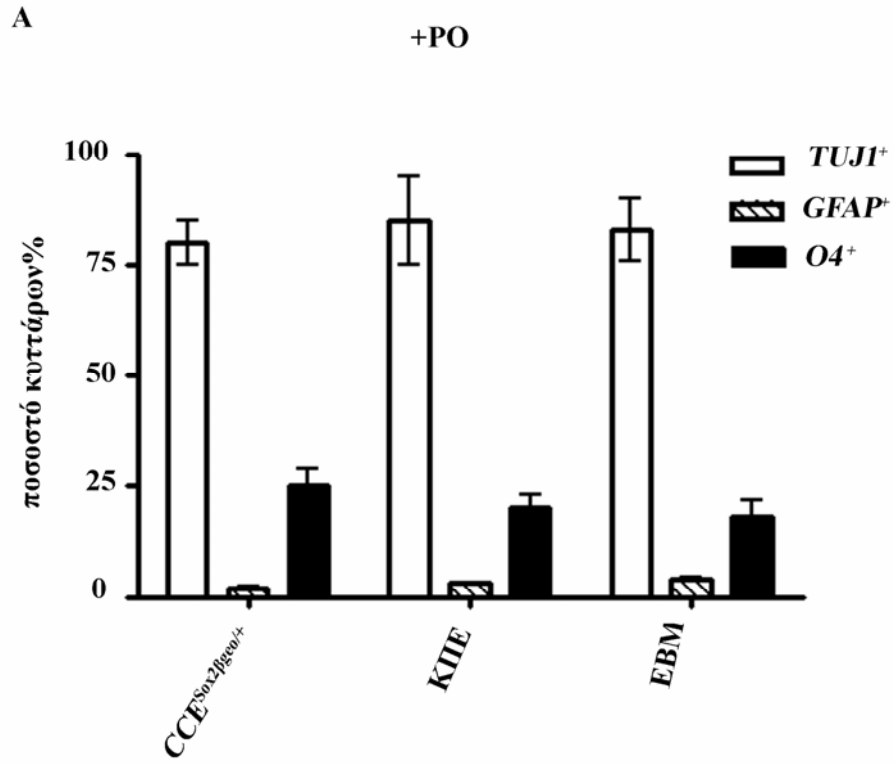
A



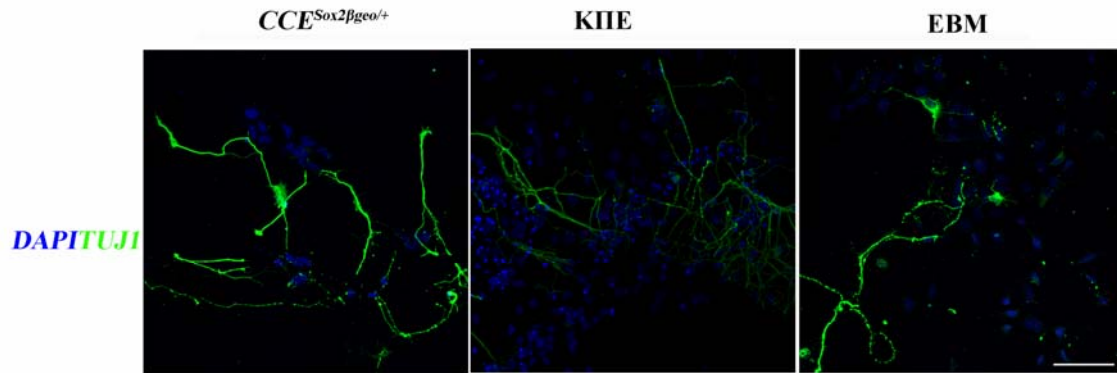
B



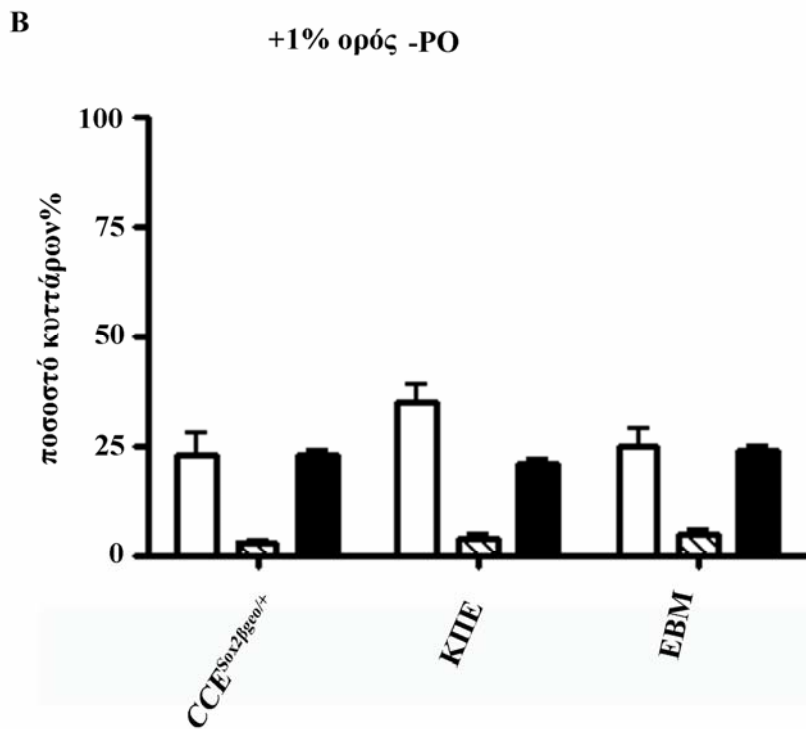
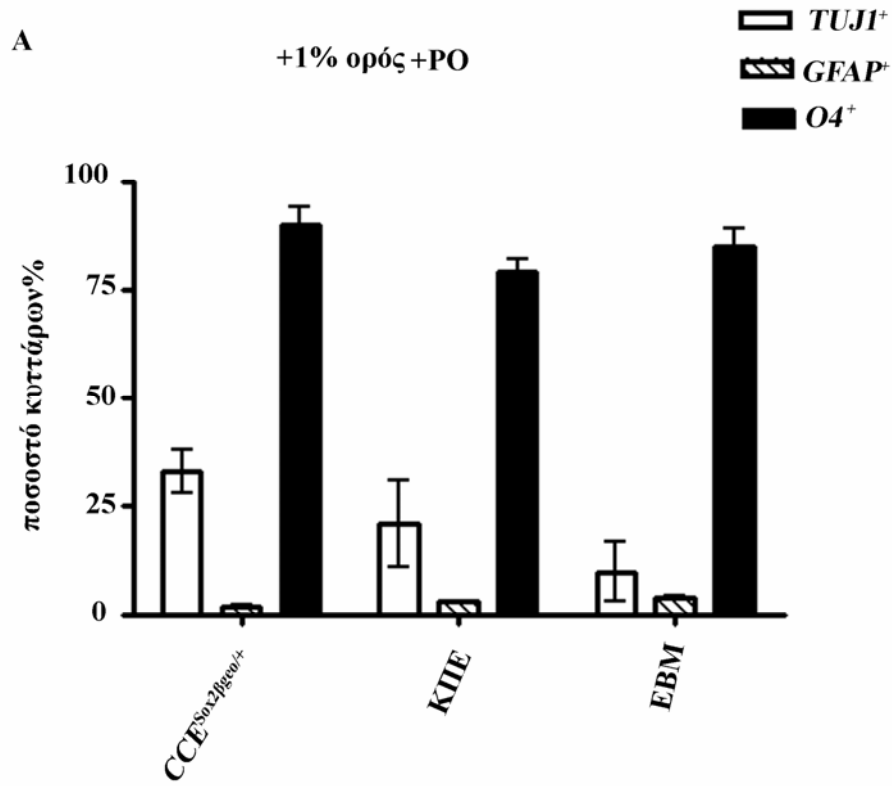
Εικόνα Δ.8: Ο νευροεξωδερμικός χαρακτήρας των ΚΠΕ και το πρωτόκολλο διαφοροποίησης. Α. Τα ΚΠΕ εκφράζουν σε επίπεδο mRNA σημαντικούς νευροεξωδερμικούς παράγοντες. Β. Σε πρωτόκολλο διαφοροποίησης διάρκειας 14 ημερών τα ΚΠΕ μαζί με τα EBM και τα EBK διαφοροποιούνται προς νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Λεπτομέρειες για το πρωτόκολλο στο μέρος Γ

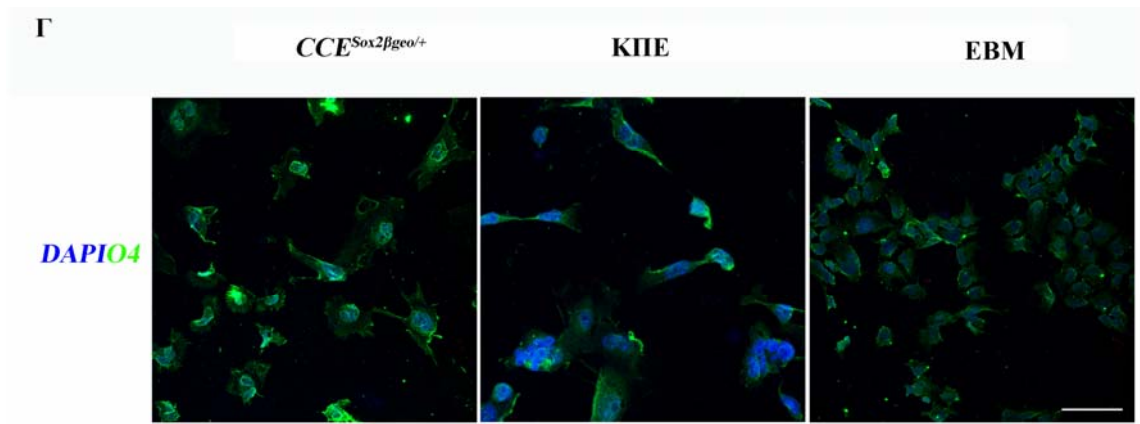


Γ



Εικόνα Δ.9: Νευρωνική διαφοροποίηση των ΚΠΕ, ΕΒΜ και ΕΒΚ. Α-Β. Το ρετινοϊκό οξύ έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ περισσότερων νευρώνων (Α) από ό, τι απουσία του (Β). Αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα δε δημιουργούνται υπό αυτές τις συνθήκες. Γ. Εικόνες νευρώνων. Κλίμακα 250μm.



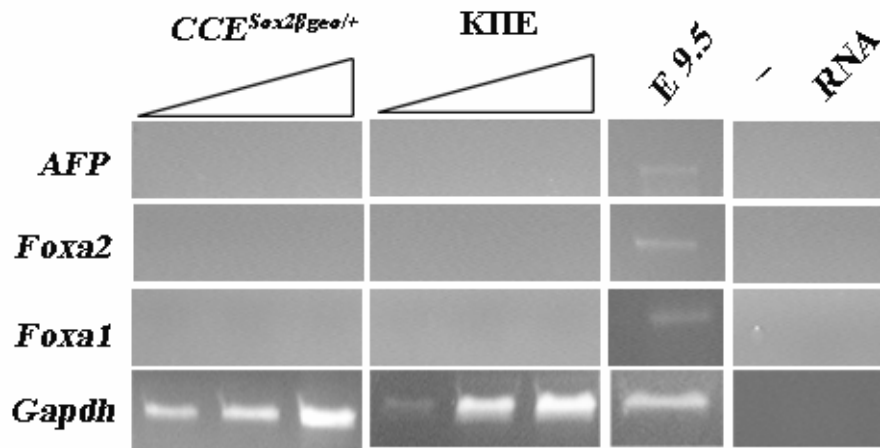


Εικόνα Δ.10: Επαγωγή διαφοροποίησης προς ολιγοδενδροκύτταρα. Α.Με προσθήκη ρετινοϊκού οξέος και 1% ορού παίρνουμε υψηλά ποσοστά θετικών κυττάρων. Β. Απουσία του ΡΟ, οι αριθμοί μειώνονται σημαντικά. Γ. Εικόνα από το αντίσωμα Ο4. Κλίμακα 250μm.

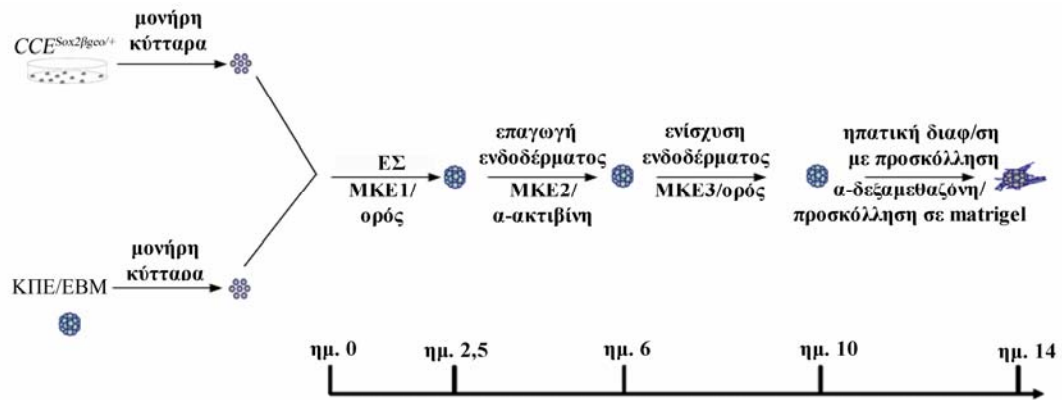
Δ.2.2. Δυναμικό κατευθυνόμενης διαφοροποίησης των ΚΠΕ σε κύτταρα του ενδοδέρματος.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επιπλέον το γεγονός της απουσίας έκφρασης των ενδοδερμικών παραγόντων Foxa2, Foxa1, Ahr στα ΚΠΕ, όπως και στα ΕΒΚ (εικόνα Δ.11.Α). Υπό την επίδραση όμως συγκεκριμένων και ειδικών συνθηκών ενδοδερμικής διαφοροποίησης, χρησιμοποιώντας αντίστοιχους παράγοντες, τα ΚΠΕ μπορούν να διαφοροποιηθούν ομοιογενώς προς ενδοδερμικά διαφοροποιημένα παράγωγα (Atsushi Kubo1 and Savio Woo1, 2004) (εικόνα Δ.11.Β). Το πρωτόκολλο χρησιμοποιεί α-ακτιβίνη και d-δεξαμεθαζόνη απουσία ορού και ως πειράματα ελέγχου χρησιμοποιεί ορό ή απουσία ορού και α-ακτιβίνης. Παράγονται κύτταρα που εκφράζουν τον ηπατικό παράγοντα FOXA2 αλλά και σε μικρότερα ποσοστά τους μεσοδερμικό παράγοντα FLK-1, κάτι το οποίο συνάδει με το ότι το μεσόδερμα και το ενδόδερμα προέρχονται από κοινό προγεννήτορα.. Δεδομένου ότι τα ΕΒΚ δίνουν μόνο FOXA2⁺ αποικίες και όχι FLK-1, μας κάνει να υποθέσουμε ότι τα ΚΠΕ έχουν χάσει ένα μέρος της πλαστικότητάς τους (εικόνα Δ.12.Α. και Β.). Εντούτοις εμφανίζονται πιο δυναμικά από τα ΕΒΜ, τα οποία διαφοροποιούνται σε χαμηλά ποσοστά.

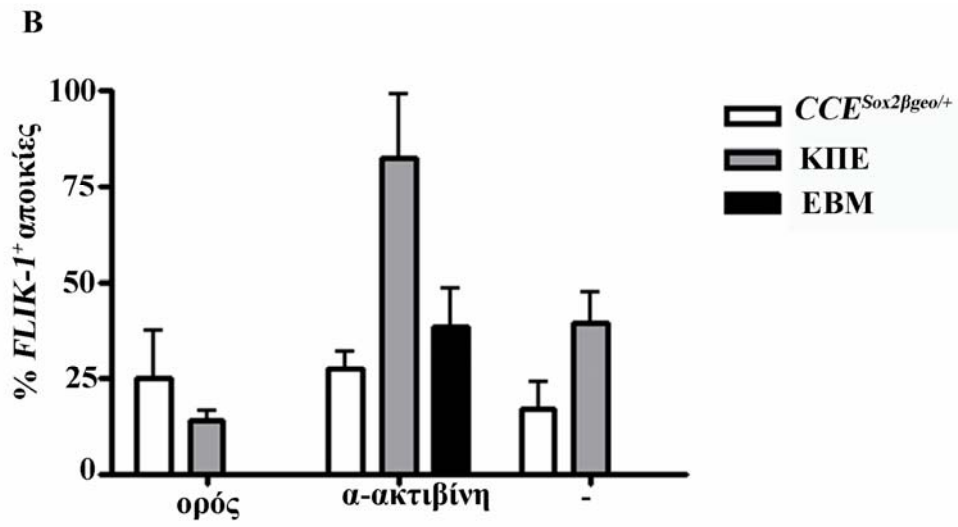
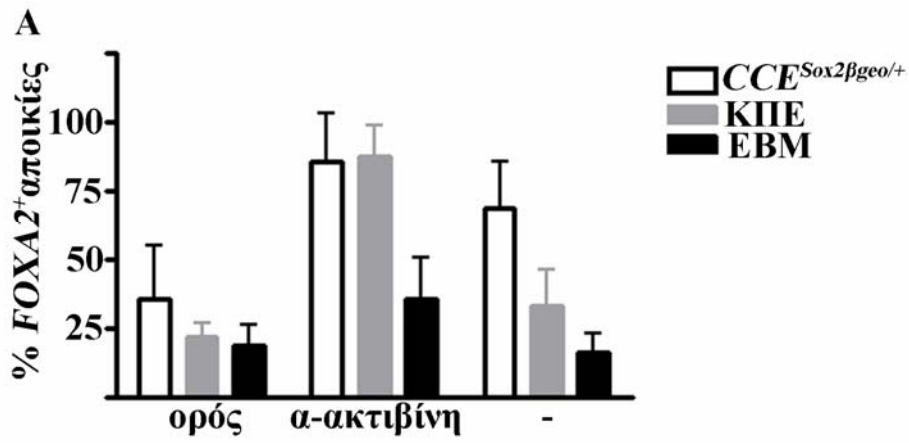
A



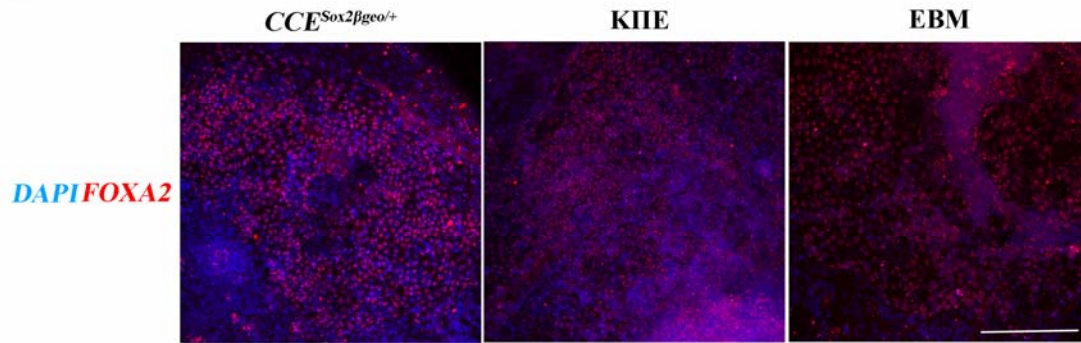
B



Εικόνα Δ.11: Έκφραση ενδοδερμικών παραγόντων και πρωτόκολλο διαφοροποίησης των ΚΠΕ, ΕΒΚ και ΕΒΜ. Α.ΤΑ ΚΠΕ και τα ΕΒΚ δεν εκφράζουν ενδοδερμικούς παράγοντες. Β. Το πρωτόκολλο για τη διαφοροποίηση. Λεπτομέρειες στο μέρος Γ.



Γ

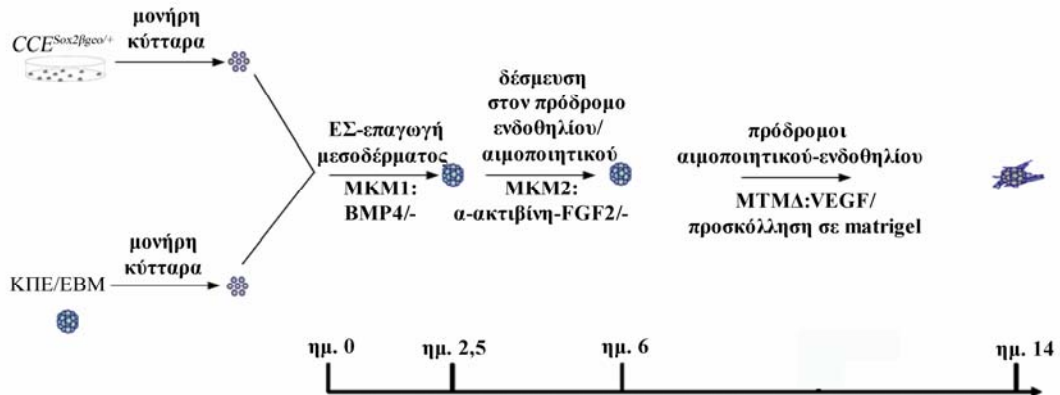
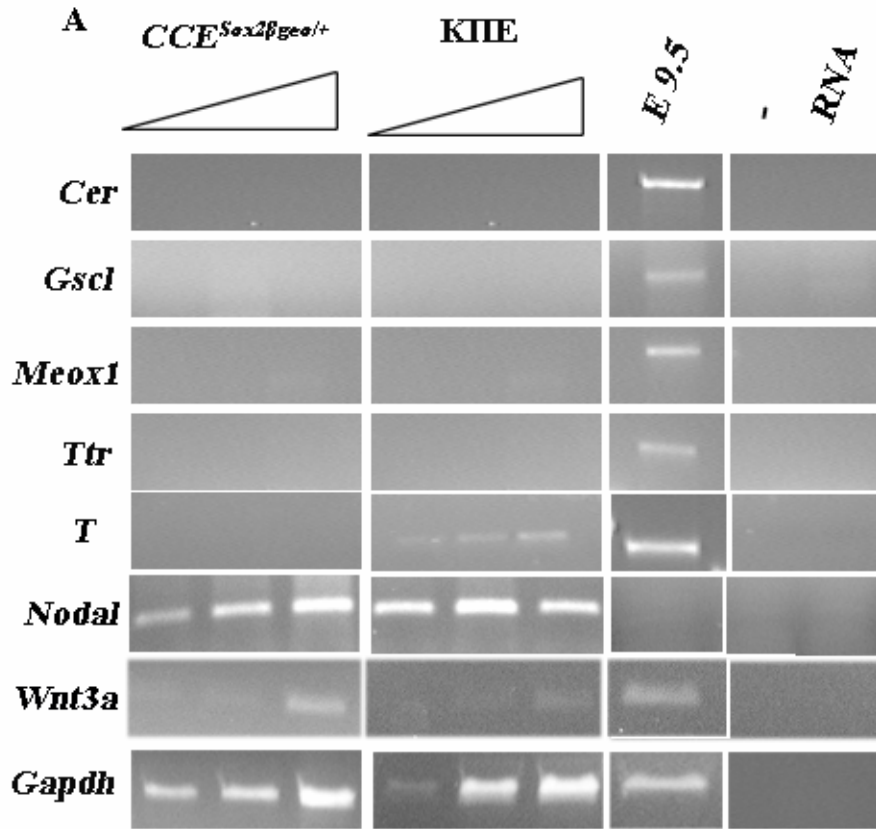


Εικόνα Δ.12: Διαφοροποίηση προς ενδόδερμα σε μεγάλα ποσοστά, με ομοιογένεια. Α. Τα ΚΠΕ διαφοροποιούνται ομοιογενώς ενώ τα ΕΒΜ σε μικρά ποσοστά. Όλες σχεδόν οι αποικίες είναι θετικές για το FOXA2. Β. Η παρουσία του FLK1 σε υψηλά ποσοστά στα ΚΠΕ, υποδηλώνει ότι δυσκολεύονται να διαχωρισουν τα μηνύματα ανάμεσα στο μεσόδερμα και το ενδόδερμα, που έχουν κοινό πρόγονο ούτως ή άλλως. Γ. Κλίμακα 250μm.

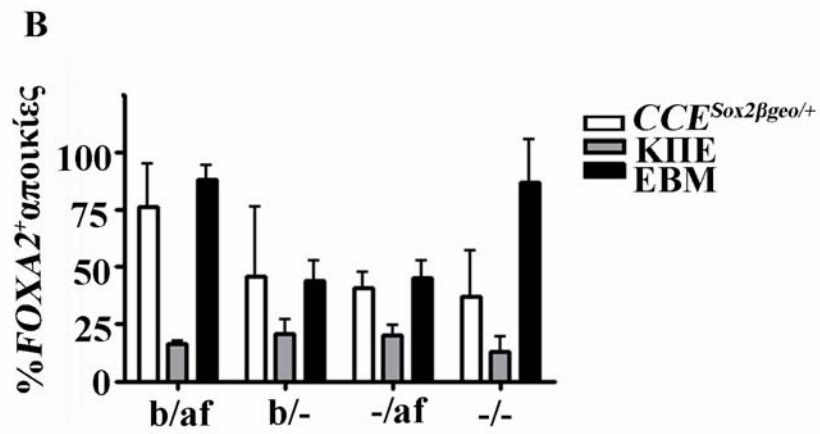
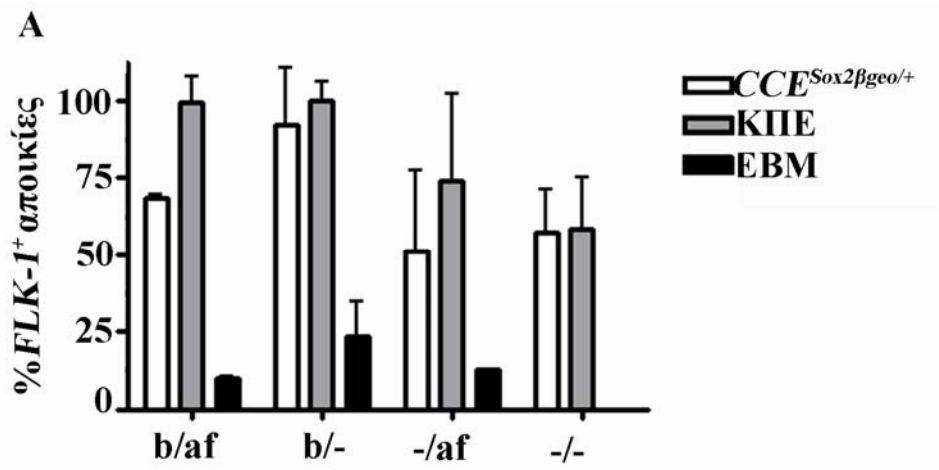
Δ.2.3. Δυναμικό των ΚΠΕ να διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένα μεσοδερμικά διαφοροποιημένα παράγωγα

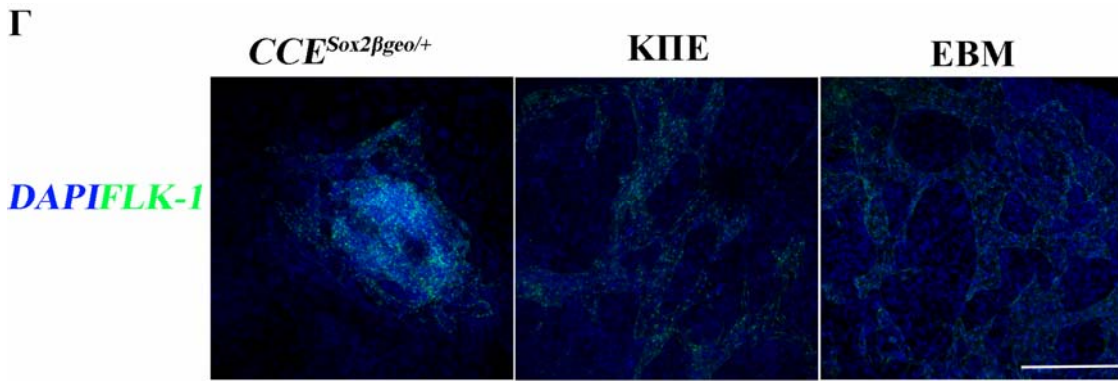
Επιπλέον ανάλυση του μεταγραφώματος των ΚΠΕ έδειξε την παρουσία του γονιδίου T, που είναι ειδικό για την οπίσθια επιβλάστη, σε ίχνη (εικόνα Δ.13.A). Επιπλέον, παρατηρούμε πτώση των επιπέδων του γονιδίου του σηματοδοτικού μορίου Wnt3a, που είναι υπεύθυνο για το μεσοδερμικό καθορισμό. Η πτώση των επιπέδων του Wnt3a θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική, καθώς υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων Sox (Sox17) στην οποία ανήκει το Sox2, προσδένονται σε υποκινητές γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-catenin, ρυθμίζοντας την έκφρασή τους. Πιθανός ανάλογος ρόλος του παράγοντα SOX2 και η απευθείας πρόσδεσή του στον υποκινητή του Wnt3a είναι υπό διερεύνηση. Η απουσία έκφρασης μεσοδερμικών παραγόντων Meox1, Gsc1, Cer, Ttr στα ΚΠΕ, αλλά και T και Wnt3a ενώ το Nodal, σηματοδοτικό μόριο της οπίσθιας επιβλάστης, εκφράζεται, δείχνει τον αδιαφοροποίητο χαρακτήρα τω ΚΠΕ ,δεδομένου ότι το Nodal εκφράζεται και στην προεμφυτευτική επιβλάστη.

Παρόλα αυτά τα ΚΠΕ δύνανται να διαφοροποιηθούν προς μεσοδερμικά διαφοροποιημένα παράγωγα υπό την επίδραση συγκεκριμένων, ειδικών παραγόντων (Bmp4, VEGF, transferrin, A-Activin, bFgf)(Stella Pearson, 2008) (εικόνα Δ.13.B). Συγκεκριμένα, παράγονται σε υψηλά ποσοστά πρόγονοι κοινοί του ενδοθηλίου και της αιμοποίησης,, κύτταρα που εκφράζουν FLK-1(εικόνα Δ.14.A. και B.) παρουσία BMP4, ενώ δεν εκφράζουν FOXA2 , όπως και τα EBK. Αυτό σημαίνει ότι σε σχέση με το μεσόδερμα διατηρούν πλαστικότητα ίδια με των EBK. Τα EBM διαφοροποιούνται σε μικρότερα ποσοστά και άρα όχι τόσο επαρκώς. Η προσθήκη BMP4 έχει ως αποτέλεσμα οι μισές αποικίες των EBK να εμφανίζουν μυϊκές συσπάσεις, ενώ των ΚΠΕ και EBM όχι (εικόνα Δ.14.Δ). Η μυϊκή γενεαλογία αποτελεί ξεχωριστό κομμάτι του μεσοδέρματος από ενδοθήλιο και αιμοποίηση με ξεχωριστό πρόγονο.

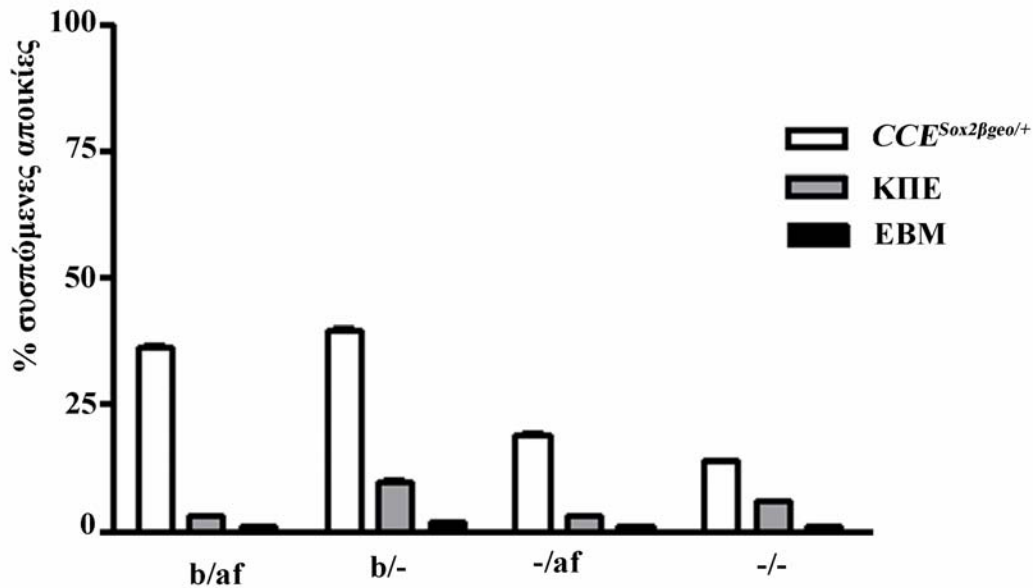


Εικονα Δ.13: Το πρότυπο έκφρασης του μεσοδερμικών παραγόντων και το πρωτόκολλο διαφοροποίησης. Α. Μόνο το *Nodal* εκφράζεται σε αξιόλογες ποσότητες, κάτι το οποίο υποδεικνύει το αδιαφοροποίητο των ΚΠΕ. Β.Το πρωτόκολλο διαφοροποίησης.





Δ



Εικόνα Δ.14: Τα ΚΠΕ αποκρίνονται σε BMP4 και δίνουν πρόγονο ενδοθηλίου και αιμοποίησης, ενώ δε δίνουν μυϊκή γενεαλογία, σε αντίθεση με τα ΕΒΚ. Α. Το BMP4 είναι αυτό που κατευθύνει τη διαφοροποίηση προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση. Β. Και τα δύο, ΕΒΚ και ΚΠΕ δίνουν λίγα ενδοδεμικά παράγωγα, ενώ τα ΕΒΜ δείχνουν πιο έντονη τάση. Γ. Ανοσοϊστοχημεία για το μεσοδερμικό παράγοντα FLK1. Κλίμακα 250μm. Δ. Τα ΕΒΚ συγχέουν τις διάφορες γενεαλογίες του μεσοδέρματος.

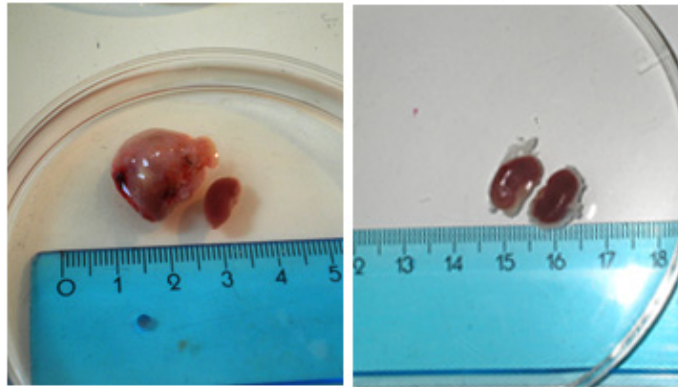
Δ.3. Σε αντίθεση με τα EBK τα ΚΠΕ δε δημιουργούν τερατώματα κατά τη μεταμόσχευσή τους στη νεφρική κάψα.

Τα ΚΠΕ, ως κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος, που θεωρούνται από τη βιβλιογραφία ως πλειοδύναμα, θα ανέμενε κανείς ότι είναι ικανά να δημιουργήσουν τερατώματα κατά τη μεταμόσχευσή τους σε ενήλικο ανοσοκατεσταλμένο ζώο, όπως άλλωστε συμβαίνει με τα EBK. ΚΠΕ, όπως και EBK και ΕΣ ως θετικό και αρνητικό πείραμα ελέγχου αντίστοιχα, ενιέθησαν στη νεφρική κάψα αρσενικών ποντικών του ανοσοκατεσταλμένου στελέχους C57/BL6 Rag^{-/-}. Για κάθε κυτταρικό πληθυσμό χρησιμοποιήσαμε 5 ποντίκια. Το αποτέλεσμα είναι η απουσία δημιουργίας τερατωμάτων από τα ΚΠΕ και ΕΣ σε αντίθεση με τα EBK CCE^{Sox2βgeo/+} (Εικόνα Δ.15). Αυτό υποδηλώνει τον περιορισμό του αναπτυξιακού δυναμικού ΚΠΕ σε σχέση με τα EBK.

A

CCE^{Sox2βgeo/+}

ΚΠΕ

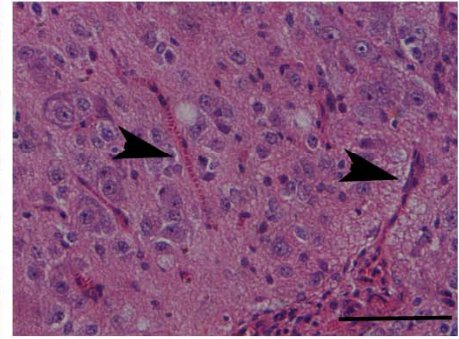
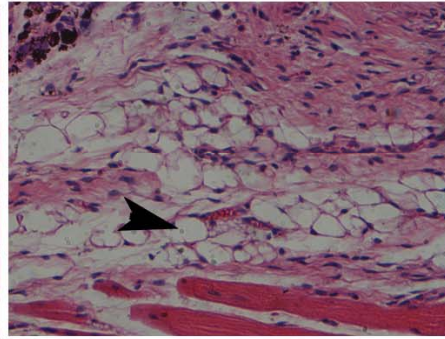
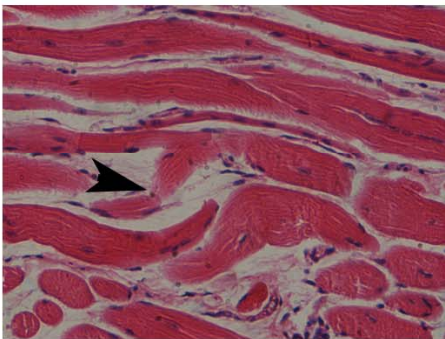


B

κύτταρα λείου μυός

λιποκύτταρα

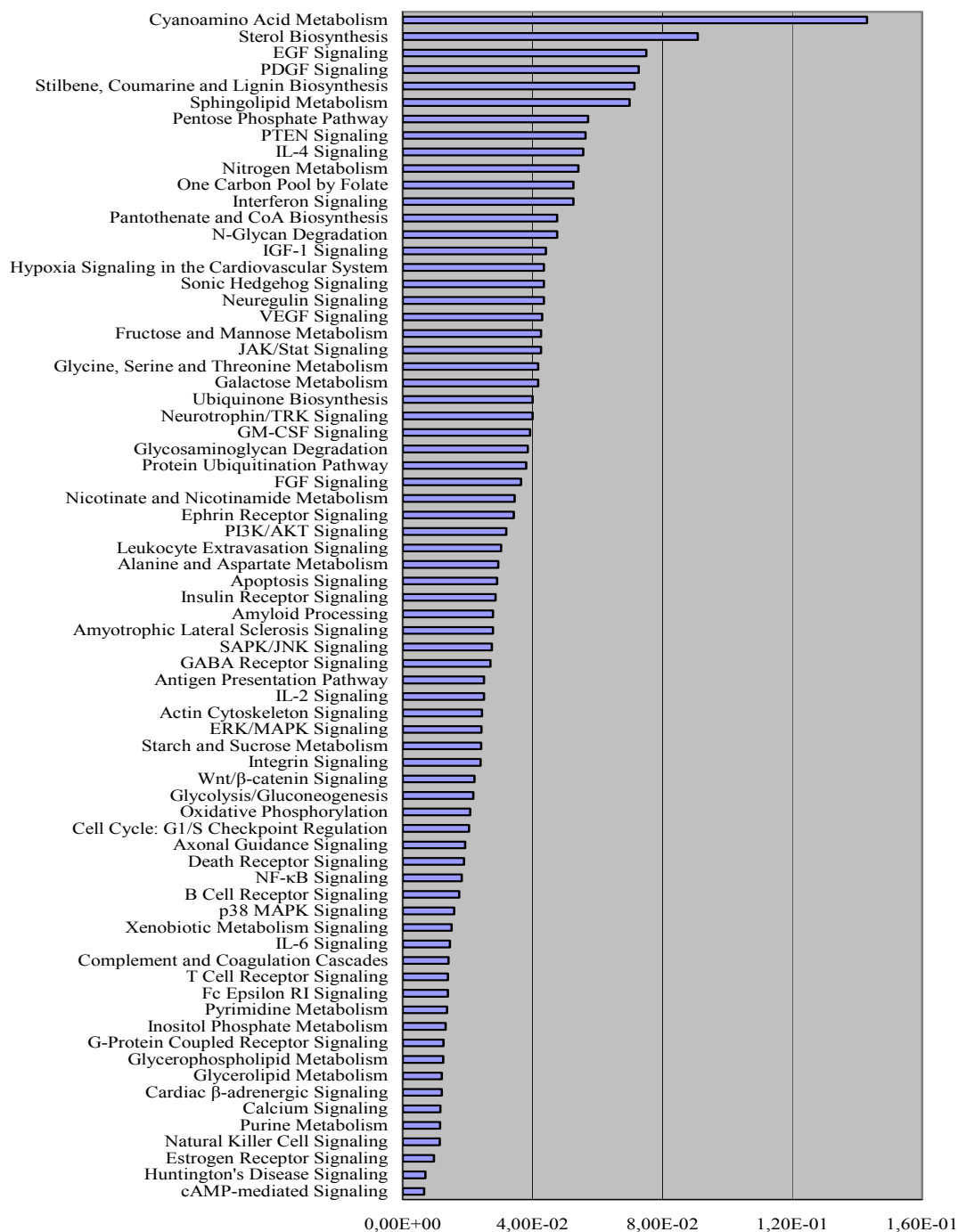
νευροεπιθηλιακά



Εικόνα Δ.15: Τα EBK δημιουργούν τερατώματα αλλά τα ΚΠΕ όχι. Κλίμακα 50μm .
 A. Η διαφορά στο μέγεθος ανάμεσα σε ένα εμβολιασμένο και ένα μη εμβολιασμένο νεφρό. B. Το εμβολιασμένο νεφρό εμφανίζει κύτταρα που προέρχονται και από τα τρία βλαστικά δέρματα μεσόδερμα, ενδόδερμα και εξώδερμα από αριστερά προς τα δεξιά.

Δ.4. Ανάλυση του ευρύτερου μεταγραφώματος και ανίχνευση νέων καθοριστών του αναπτυξιακού σταδίου του πρωτογενούς εξωδέρματος με τη χρήση μικροσυστοιχιών cDNA (cDNA microarrays) για τα ΚΠΕ.

Μετά το χαρακτηρισμό των ΚΠΕ, που περιλαμβάνει την ανάλυση του βασικού τους μεταγραφικού προφίλ, τη μελέτη του χαρακτήρα της πλειοδυναμίας τους καθώς και τη μελέτη του αναπτυξιακού τους δυναμικού και του δυναμικού τους διαφοροποίησης, το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στην ανάλυση του ευρύτερου μεταγραφικού προφίλ των κυττάρων μας. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών cDNA με έμμεση αμινο-αλλυλική σήμανση του RNA (indirect amino-allyl labelling of RNA) με χρωστικές Cy3 και Cy5 αναλύσαμε το ευρύτερο μεταγραφικό προφίλ των ΚΠΕ και το συγκρίναμε με αυτό των EBK. Μετά την εξαγωγή και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, το φιλτράρισμα, την κανονικοποίηση, τον έλεγχο της ποιότητας των πειραμάτων και τη στατιστική επιλογή οδηγηθήκαμε σε έναν κατάλογο από 1205 γονίδια με μειορρύθμιση και 805 γονίδια με αυξορρύθμιση στα ΚΠΕ σε σχέση με τα EBK. Αυτά υποβλήθηκαν σε ανάλυση των μεταβολικών και σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν και των κυτταρικών λειτουργιών τους (Gene Ontology ανάλυση). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν συμμετοχή στη μετάβαση από τα EBK στα ΚΠΕ του μεταβολισμού (27/72 μονοπάτια), των σηματοδοτικών μονοπατιών (45/72) και ιδιαίτερα των σχετιζόμενων με την πρόϊμη ανάπτυξη (Jak/Stat, Erk/Mapk, Wnt-β catenin, Fgf), την ουβικιτινίωση των πρωτεϊνών, την απόκριση σε κυτοκίνες και τη νευρική διαφοροποίηση. Στις λειτουργίες εξέχοντα ρόλο διαδραματίζουν η μεταγραφή και οι λειτουργίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την απορρύθμισή του. Τελικά επιλέξαμε έναν περιορισμένο αριθμό γονιδίων με σημαντική αυξο-μειορύθμιση βάσει αυστηρών στατιστικών κριτηρίων και συμμετοχής τους σε μονοπάτια και λειτουργίες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον.



Διάγραμμα Δ.1: Τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται κατά τη μετάβαση από τα EBK προς τα ΚΠΕ. Ο οριζόντιος άξονας απεικονίζει τη στατιστική σημαντικότητα του κάθε μονοπατιού, δηλαδή το ποσοστό των μελών του που έχουν υβριδοποιηθεί επιτυχώς και εμφανίζουν διαφορική έκφραση. Όσο πιο κοντά στο 0, τόσο πιο σημαντικό το μονοπάτι.

Τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

| pvalue | Περιγραφή γονιδίου | Όνομα γονιδίου | Φορές μειορίθμισης | Μονοπάτι μεταβολικό/σηματοδοτικό | Πρόβλεψη για microRNA |
|------------|---|----------------|--------------------|---|-----------------------|
| 0,00760251 | RIKEN cDNA 8430410A17 gene,protein codingERp29c: | Wdr82 | -52 | | |
| 0,0389343 | uridine phosphorylase 1 | Upp1 | -32 | Pyrimidine metabolism | |
| 0,0453648 | Ligatin | Lgtn | -26 | | |
| 0,0204255 | Terf1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2 | Tinf2 | -26 | | |
| 0,0205164 | Brcal associated protein 1 | Bap1 | -18 | Protein ubiquitination | |
| 0,0464304 | ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1 | ATP5a1 | -17 | Oxydative phosphorylation | |
| 0,0464742 | cyclin E1 | Ccne1 | -13 | Cell cycle check point G1/S regulation | |
| 0,0416975 | phosphoserine aminotransferase 1 | Psat1 | -12 | Glycine, Serine,Threonine metabolism | |
| 0,0295606 | vaccinia related kinase 1 | Vrk1 | -11 | | |
| 0,0418837 | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11 | Psm11 | -10 | Protein ubiquitination | |
| 0,00875754 | growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1 | Gadd45gip1 | -10 | | |
| 0,0366659 | thyroid hormone receptor interactor 12 | Trip12 | -10 | | |

Πίνακας Δ.1. Γονίδια που καταστέλλονται κατά τη μετάβαση από EBK CCE^{Sox2βgeo/+} σε ΚΠΕ. Με πράσινο τα γονίδια ιδιαίτερου ενδιαφέροντος.

| pvalue | Περιγραφή γονιδίου | Όνομα γονιδίου | Φορές αυξορρόθμισης | Μονοπάτι μεταβολικό/σηματοδοτικό | Πρόβλεψη για microRNA |
|------------|---|----------------------------|---------------------|---|-----------------------|
| 0,0397279 | Mus musculus blastocyst blastocyst cDNA, RIKEN full-length enriched librarykeratin complex 1, acidic, gene 18 | Krt18 | 116 | | Ναι |
| 0,0496657 | leucine rich repeat (in FLil) interacting protein 2 | Flil interacting protein 2 | 6 | | Ναι |
| 0.045 | GPI-anchored membrane protein | GPIAP1 | 4 | | |
| 0.040 | TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1 | Trafip1 | 3 | | |
| 0.005 | v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian) | Crk | 2 | Axonal Guidance , ERK/MAPK , Actin Cytoskeleton, SAPK/JNK, Insulin Receptor, Leukocyte Extravasation, Ephrin Receptor, FGF , Neuregulin , PDGF | |
| 0.031 | fibroblast growth factor 1 (acidic) | Fgf1 | 2 | Actin Cytoskeleton, Ephrin Receptor, FGF | |
| 0.016 | ubiquitin specific peptidase 39 | Usp39 | 2 | Protein ubiquitination | |
| 0.042 | B-cell CLL/lymphoma 2 | Bcl2 | 2 | Death Receptor, Amyotrophic Lateral Sclerosis , Apoptosis, PI3K/AKT, VEGF , PTEN | |
| 0.034 | ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast) | Ube4A | 2 | Protein ubiquitination | |
| 0.039 | retinoic acid receptor, beta | Rarb | 2 | Wnt/β-catenin | |
| 0,0223063 | unknown | unknown | 5 | | |
| 0,00825188 | cDNA sequence BC008163 (coding for protein similar to hypothetical protein LOC230789) unigene cluster EST K04F10.7.p [Caenorhabditis elegans] | unknown | 3 | | |

Πίνακας Δ.2. Γονίδια που ενεργοποιούνται κατά τη μετάβαση από EBK CCE^{Sox2βgeo/+} σε ΚΠΕ. Με κόκκινο τα γονίδια ιδιαίτερου ενδιαφέροντος

| | EpiSCs (Vallier-Mckay) | EPL cells (Rathjen) | hESCs υπερεκφράζοντα το Nanog | ΚΠΕ |
|--|---|--|---|---|
| μορφολογία | μεγάλες αποικίες μονόστοιβες | δισδιάστατες μονόστοιβες αποικίες | πιο επίπεδες αποικίες όμοιες με αυτές των ΑΕΒΚ | Συσσωματώματα |
| προφίλ έκφρασης πρώιμης ανάπτυξης | <i>Sox2 +, Oct4+, Nanog+, Nodal+, Fgf5+, Rex1-, Gbx2-</i> | <i>Sox2 +, Oct4+, (Nanog+), Fgf5+ Rex1-, Gbx2-</i> | <i>Sox2 +, Oct4+, Nanog++, Fgf5+ Rex1-, Gbx2-</i> | <i>Sox2 +, Oct4+, Nanog++, Fgf5+, Gbx2</i> |
| προφίλ έκφρασης διαφοροποίησης | <i>AFP+, Hnf3β+, β-III Tubulin+, Gata6+</i> | <i>AFP-</i> | ; | μεσόδερμα- ενδόδερμα- νευροεξώδερμα + |
| αλκαλική φωσφατάση | - | + | + | + |
| αποδιαφοροποίηση(+LIF) | όχι | ναι | όχι | Ναι |
| δημιουργία τερατωμάτων | ναι | ; | ; | Όχι |
| Χίμαιρες | όχι | όχι | ; | ; |
| ικανότητα διαφοροποίησης | 3 βλαστικά δέρματα, πρωτογενές ενδόδερμα, τροφοεξώδερμα | μεσόδερμα, νευροεξώδερμα | ; | 3 βλαστικά δέρματα |
| αναγκαίο σηματοδοτικό μονοπάτι | Activin/Nodal-Fgf2 | MEDII | - | ; |
| μεταγραφικό κύκλωμα | πιο κοντά στα ΑΕΒΚ από ό,τι στα ΕΒΚ | ; | περισσότερο όμοιο με ΕΣ | ; |
| επιγενετική ρύθμιση | πιο κοντά στα ΑΕΒΚ από ό,τι στα ΕΒΚ | ; | ; | ; |

Πίνακας Δ.3: Τα διάφορα μοντέλα πρωτογενούς εξωδέρματος και η σύγκριση με τα ΚΠΕ

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

E. 1. Η ετερογένεια των EBK και η ομοιογένεια των Sox2 επιλεγμένων EBK.

Τα κύτταρα EBK που έχουν επιλεγεί για Sox2 εμφανίζουν περισσότερο Nanog από ό,τι τα αγρίου τύπου. Επιπλέον τα EBK με επιλογή για το Sox2 εμφανίζουν ομοιόμορφη έκφραση της πρωτεΐνης NANOG σε αντιθεση με τα αγρίου τύπου που εμφανίζουν ετερογένεια ως προς το NANOG. Τα EBK αποτελούν το πιο δυναμικό εργαλείο μελέτης της πρώιμης ανάπτυξης του ποντικού και κατ'έκταση των θηλαστικών. Μελέτες πρόσφατες έχουν συνηγορήσει υπέρ της ετερογένειάς τους (Amar M. Singh, 2007; Katsuhiko Hayashi, 2008; Yagoi Toyooka, 2008). Η ετερογένεια αυτή αναφέρεται και πιθανότατα βασίζεται στη διαφορική έκφραση μεταγραφικών παραγόντων πλειοδυναμίας. Τέτοιοι έχειδειχθεί μέχρι στιγμής ότι είναι οι Nanog, Rex1 και Stella, οι οποίοι εμφανίζουν πρότυπο ετερογενούς έκφρασης mRNA μερικώς μόνο αλληλοεπικαλυπτόμενης. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί δεν αντιστοιχούν σε σταθερές καταστάσεις, μιας και η απομόνωση και καλλιέργειά τους οδηγεί εκ νέου στον ετερογενή αρχικό πληθυσμό των EBK. Αυτό δείχνει ότι η θεμελιώδης κατάσταση του πληθυσμού των EBK είναι η ετερογένεια (Cells and Thomas Graf1, 2008). Η ετερογένεια αυτή έχειδειχθεί πως αντανάκλα σε υποπληθυσμούς των EBK με διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό. Αυτό το χαρακτηριστικό των EBK έχει αποτελέσει την αφορμή για να διατυπωθεί η υπόθεση πως ανάλογη ετερογένεια πιθανότατα υπάρχει στον πληθυσμό της EKM της βλαστοκύστης και της προεμφυτευτικής επιβλάστης in vivo, τους δύο πληθυσμούς, από τους οποίους έχουν απομονωθεί τα EBK. Η επιβεβαίωση της παραπάνω υποθέσης θα μπορούσε πιθανότατα να απαντήσει στο ερώτημα που αφορά ποια είναι τα ερεθίσματα στα στάδια της βλαστοκύστης και της επιβλάστης που καθορίζουν ποια αναπτυξιακή κατεύθυνση θα ακολουθήσει κάθε κύτταρο. Και βεβαίως, η εξιχνίαση του ή των παραγόντων που καθοδηγούν την ετερογένεια των EBK είναι στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος.

Το Sox2 έχειδειχθεί ότι εκφράζεται ομοιογενώς στα EBK. Το ίδιο επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη, όπου διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη SOX2 εκφράζεται ομοιογενώς στα αγρίου τύπου και στα επιλεγμένα με αντιβιοτικό ετερόζυγα μεταλλαγμένα για το Sox2 EBK. Με ιδιαίτερο ενδιαφέρον διαπιστώθηκε ότι στα

ετερόζυγα μεταλλαγμένα και επιλεγμένα για το Sox2 EBK παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα μεταγράφων του Nanog και την κατανομή της πρωτεΐνης ομοιογενή στον πληθυσμό των EBK. Με άλλα λόγια, η επιλογή για το Sox2 μπορεί να καθοδηγεί τη μετάβαση από τον ένα υποπληθυσμό Nanog των EBK στον άλλο. Η πιθανή αυτή δράση του Sox2 συνάδει με τα μέχρι τώρα δεδομένα που δείχνουν ότι η SOX2 πρωτεΐνη προσδένεται πάνω σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του Nanog και ρυθμίζει την έκφρασή του (Yuin-Han Loh et al., 2006), ενώ συμμετέχει μαζί με την πρωτεΐνη NANOG σε μεταγραφικά σύμπλοκα που ενεργοποιούν γονίδια πλειοδυναμίας ή καταστέλλουν γονίδια διαφοροποίησης.

E.2. Η επιλογή για το Sox2 δημιουργεί κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος, με κοινά αλλά και ιδιαίτερα σημεία με άλλα κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος.

Η επιλογή για Sox2 σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη διαφοροποίηση, σε εμβρυοειδή συσσωματώματα, απουσία του LIF, δημιουργεί κύτταρα μετά από εκτεταμένη καλλιέργεια που έχουν μεταγραφικό και μεταφραστικό προφίλ του πρωτογενούς εξωδέρματος. Ενώ το Sox2 εκφράζεται σε διαφοροποιημένα κύτταρα εξωδερμικής προέλευσης, εντούτοις η επιλογή για την έκφρασή του δεν αφήνει τα κύτταρα να προχωρήσουν πέρα από το όριο του πρωτογενούς εξωδέρματος. Όπως, δε, υποδηλώνουν τα πειράματα με αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση, ακόμα και κάποια κύτταρα που κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τείνουν να απομακρυνθούν από αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, σταδιακά με την επιλογή για Sox2 επιστρέφουν σε αυτό το χαρακτήρα. μέχρι τις 3 εβδομάδες.

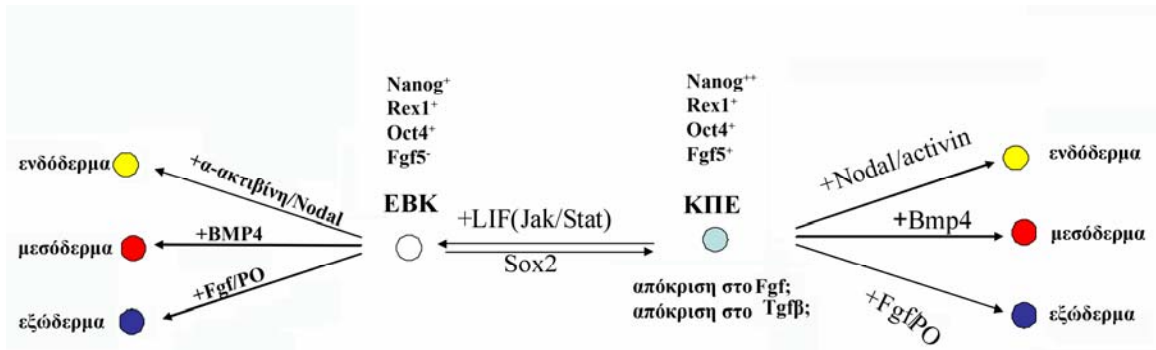
Βασικό χαρακτηριστικό του μεταγραφικού και μεταφραστικού προφίλ των ΚΠΕ είναι η ύπαρξη υψηλών επιπέδων μεταγράφων και πρωτεΐνης του Nanog. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι πλέον τελευταία δεδομένα προτείνουν ότι η πλειοδυναμία συνιστά γεγονός πολυεπίπεδο σταδιακής ολοκλήρωσης (Jennifer Nichols¹, 2009b; Jose Silva and Jason Wray, 2009). Υπάρχουν δύο βασικά επίπεδα πλειοδυναμίας: το θεμελιώδες επίπεδο (ground state of pluripotency ή naïve pluripotency) που αντιστοιχεί in vivo στο στάδιο της προεμφυτευτικής επιβλάστης και in vitro στα EBK και τα ΕΠΒΚ και το επίπεδο της προχωρημένης ή ενεργοποιημένης πλειοδυναμίας (primed pluripotency) το οποίο αντιστοιχεί in vivo στη μετεμφυτευτική επιβλάστη και in vitro στα EpiSCs. Δεν πρέπει να διαφεύγει της προσοχής μας ότι τα EBK έχουν απομονωθεί από βλαστοκύστες σε διάπαυση, οι οποίες, όταν απομονώνουμε τα EBK, έχουν προχωρήσει και βρίσκονται στην E4,5, ήτοι στο στάδιο της προεμφυτευτικής επιβλάστης. Για αυτό θεωρούμε ότι το θεμελιώδες επίπεδο πλειοδυναμίας αντιστοιχεί στην προεμφυτευτική επιβλάστη. Μετά την εμφύτευση τα κύτταρα της ύστερης επιβλάστης έχουν δεχθεί εκείνα τα σήματα από το περιβάλλον που τα καθιστούν έτοιμα να προχωρήσουν στη γαστριδίωση, μια διαδικασία εξειδίκευσης και διαφοροποίησης.

Τα νέα δεδομένα προτείνουν ότι ο σκληρός πυρήνας του μεταγραφικού κυκλώματος πλειοδυναμίας συγκροτείται από τους SOX2 και OCT4. Όμως αυτός δεν είναι αρκετός για να καθορίσει την πλειοδυναμία, αν και είναι αναγκαίος. Οι SOX2 και

OCT4 καθορίζουν, όπως φαίνεται, μια προτέρα της πλειοδυναμίας κατάσταση, που αποτελεί, βέβαια, αναγκαίο βήμα για να φτάσουμε σε αυτήν. Είναι ο πιθανός πρώτος λίθος. Δεν ξεχνούμε ότι και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι μόρια που κληρονομούνται μητρικά και από το ζυγωτικό γονιδίωμα εκφράζονται πολύ πριν από το στάδιο της βλαστοκύστης και καθ'οδόν προς την επιβλάστη και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Έτσι, η παρουσία τους στα ολοδύναμα βλαστομερή ήδη δεν τους συνδέει απαραίτητα με την πλειοδυναμία, που συνιστά όρο αναφερόμενο, τουλάχιστον στον ποντικό, αποκλειστικά στο έμβρυο. Άρα είναι πολύ καλά υποψήφια μόρια για αυτό το ρόλο.

Αντιθέτως, το Nanog ναι μεν εκφράζεται από το στάδιο του μοριδίου, αλλά στη συνέχεια περιορίζεται αποκλειστικά στην EKM και τα κύτταρα της επιβλάστης. Η έκφρασή του στο μορίδιο σχετίζεται με τα κύτταρα που θα δώσουν στην πορεία την εμβρυϊκή πλειοδύναμη επιβλάστη. Η προσθήκη του NANOG στο μεταγραφικό σύμπλοκο είναι ο αναγκαίος λίθος για τη συγκρότηση της επιβλάστης, δηλαδή για την απόκτηση του χαρακτήρα και του δυναμικού της πλειοδυναμίας.

Υψηλότερα ποσά Nanog σημαίνει πλέον για τη βιβλιογραφία πληθυσμό πιο κοντά στη θεμελιώδη πλειοδυναμία. Αυτό συνεπάγεται όμως απουσία Fgf5, το οποίο στη δική μας περίπτωση είναι παρόν. Εκτός από το Nanog, τα ΚΠΕ διατηρούν ακέραιη την ικανότητά τους να καλλιεργούνται παρουσία του LIF, χαρακτηριστικό των EBK και όχι των κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος που καλλιεργούνται παρουσία του Tgfβ και του Fgf μονοπατιού. Η ενεργοποίηση το Fgf5 και των άλλων μελών του fgf μονοπατιού θεωρείται ότι δίνει το έναυσμα για να περάσει το κύτταρο στη φάση της κυτταρικής δέσμευσης κατά τη γαστριδίωση (Tilo Kunath and Smith, 2007). Αυτό μπορεί να ξεπεραστεί μόνο μετά από συνεχή έκφραση του Nanog. Το δικό μας μοντέλο που διατηρεί υψηλά επίπεδα του Nanog μπορεί να κατορθώνει να συνδυάζει ιδιότητες και των δύο καταστάσεων πλειοδυναμίας πιθανότατα λόγω των υψηλών επιπέδων του Nanog. Επιπλέον, τα ΚΠΕ για να διαφοροποιηθούν προς συγκεκριμένες γενεαλογίες, χρειάζονται απαραίτητα την ύπαρξη παραγόντων, όπως Wnts, a-activin, Bmps, Fgfs. Δε διαφοροποιούνται όμως με μεγαλύτερη άνεση από τα EBK, όπως θα ταιριαζε σε μια κατάσταση ενεργοποιημένης πλειοδυναμίας. Αυτό μας φέρνει πιο κοντά στην ιδέα ότι τα ΚΠΕ που καλλιεργούμε συνιστούν μοντέλο που προσιδιάζει με τη θεμελιώδη πλειοδυναμία (εικόνα E.1).



Εικόνα Ε.1: Το προτεινόμενο μοντέλο για τη θέση των ΚΠΕ σε σχέση με τα ΕΒΚ.

Μέχρι τώρα, κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος έχουν μελετηθεί με διάφορα μοντέλα (πίνακας Δ.1). Κανένα από αυτά όμως δεν έχει μελετήσει τη μετάβαση από το στάδιο των ΕΒΚ στο στάδιο της επιβλάστης. Ένα μεγάλο ερώτημα για τους αναπτυξιακούς βιολόγους αφορά τη σχέση των τριών μελών του βασικού μεταγραφικού συμπλόκου με τα μόρια που δημιουργούν την πολικότητα στο έμβρυο, που καθορίζουν τα επόμενα βήματα του.

Στο δικό μας μοντέλο έχουμε απουσία έκφρασης οπίσθιων παραγόντων της επιβλάστης, όπως είναι ο Wnt3a, το T, αλλά και έκφραση του Nodal που είναι και αυτό της οπίσθιας επιβλάστης. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες θα ενεργοποιούν ή θα καταστέλλουν συγκεκριμένα γονίδια στην πορεία προς την επιβλάστη και μετά προς τη γαστριδίωση. Έτσι το δικό μας μοντέλο μας δίνει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε το μηχανισμό της μετάβασης από το στάδιο των ΕΒΚ στο στάδιο του πρωτογενούς εξωδέρματος.

Τέλος, αυτό το οποίο χρήζει διερεύνησης είναι το αν τα διαφορετικά επίπεδα στην έκφραση του Sox2 ανάμεσα στα ΕΒΚ και ΚΠΕ είναι ικανά από μόνα τους να οδηγήσουν τη μετάβαση αυτή. Μέχρι τώρα ξέρουμε ότι το Sox2 είναι απαραίτητο για να φτάσουμε στο στάδιο της επιβλάστης (Ariel A. Avilion, 2003). Τώρα είναι η πρώτη φορά που υποδεικνύεται ότι ίσως είναι και ικανό από μόνο του να οδηγήσει σε αυτό το στάδιο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της ανάπτυξης του ποντικού, πλειοδύναμα κύτταρα εντοπίζονται στην προεμφυτευτική, πρώιμη επιβλάστη, αναμένοντας μετεμφυτευτικά (όψιμη επιβλάστη-πρωτογενές εξώδερμα) την ενεργοποίησή τους από σηματοδοτικά μόρια, για να δώσουν τα τρία βλαστικά δέρματα κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης. Η σημασία της *in vitro* δημιουργίας κυττάρων που προσομοιάζουν με την επιβλάστη από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και της απομόνωσης και καλλιέργειας κυττάρων της μετεμφυτευτικής επιβλάστης έγκειται στη διαπίστωση πως τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν ομοιότητες με τα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Οι μηχανισμοί δημιουργίας της όψιμης, ενεργοποιημένης επιβλάστης, όμως, δεν είναι γνωστοί. Το γονίδιο Sox2 κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα που περιέχει την περιοχή HMG-box, ο οποίος είναι απαραίτητος για την πλειοδυναμία των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και για τη δημιουργία της επιβλάστης. Κατά την πρώιμη ανάπτυξη, το γονίδιο Sox2 εκφράζεται στο μορίδιο, την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης και αργότερα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης εκφράζεται στις αισθητικές πλάκες, το αρχέντερο και το νευρικό σύστημα. Τα έμβρυα, στα οποία έχει απαλειφεί το γονίδιο Sox2, πεθαίνουν στο στάδιο της εμφύτευσης απουσία επιβλάστη, αποδεικνύοντας πως το Sox2 είναι αναγκαίο για τη δημιουργία της επιβλάστης *in vivo*.

Σε αυτήν την εργασία, χρησιμοποιώντας εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που μας επιτρέπουν να ελέγχουμε τη συνεχή έκφραση του γονιδίου Sox2, δημιουργήσαμε κύτταρα πρωτογενούς εξωδέρματος, τα ΚΠΕ, με χαρακτήρα ενεργοποιημένης - όψιμης επιβλάστης, αποδεικνύοντας πως η συνεχής έκφραση του Sox2 είναι ικανή να δημιουργήσει επιβλάστη από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα *in vitro*.

Η μετάβαση αυτή συνοδεύεται, σε συμφωνία και με ό,τι έχει παρατηρηθεί μέχρι τώρα σε άλλες εργασίες, από την ισχυρή παρουσία των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου Oct4 και την αύξηση των επιπέδων του Nanog, δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για παράγοντες πλειοδυναμίας, καθώς και από την ομοιόμορφη και ισχυρή παρουσία των πρωτεϊνικών μορίων που αυτά κωδικοποιούν. Ταυτόχρονα, παρατηρείται άνοδος των

μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *Fgf5* και *Nodal*, φαινόμενο το οποίο συνδέεται στενά με τη δημιουργία της επιβλάστης. Ο κυτταρικός πληθυσμός των ΚΠΕ παρουσιάζει ίχνη μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων του μεταγραφικού παράγοντα *T* και του σηματοδοτικού μορίου *Wnt3a*, μόρια υπεύθυνα για τη δημιουργία του οπίσθιου άκρου της επιβλάστης, που θα δώσει το μεσόδερμα κατά τη γαστριδίωση. Τα ΚΠΕ δεν εκφράζουν άλλα μεσοδερμικά γονίδια, όπως τα *Cer*, *Gsc1*, *Meox1* και *Ttr*. Παρόλα αυτά, διατηρούν την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται ομοιογενώς σε διαφοροποιημένα κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, και συγκεκριμένα σε κοινούς προδρόμους των ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων, αποκρινόμενα στη δράση του σηματοδοτικού μορίου *BMP4*. Ακόμα, η απουσία των πρώιμων ενδοδερμικών παραγόντων *AFP*, *Foxa1* και *Foxa2* στα ΚΠΕ δεν εμποδίζει τη δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μεσενεδοδερμικής προέλευσης, που εκφράζουν τον ηπατικό παράγοντα *FOXA2*, κάτω από την επίδραση του σηματοδοτικού μορίου *Activin*. Σε πλήρη συμφωνία με τον εξωδερμικό χαρακτήρα των κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος, τα ΚΠΕ εκφράζουν εξωδερμικά γονίδια, όπως η *Nestin* και το *Pax6* και διαφοροποιούνται κάτω από την επίδραση του ρετινοϊκού οξέος σε νευρώνες και ολιγοδενδροκύτταρα. Η πλαστικότητα που επιδεικνύουν τα ΚΠΕ δε συνοδεύεται από την ικανότητα γένεσης τερατωμάτων, χαρακτηριστική ιδιότητα των πλειοδύναμων κυττάρων, όπως είναι τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και οι κυτταρικές σειρές που απομονώνονται από τη μετεμφυτευτική επιβλάστη. Αυτό αποδίδεται στο ότι έχουν ενεργοποιηθεί από άγνωστα μέχρι στιγμής σηματοδοτικά μόρια, με αποτέλεσμα να έχουν απωλέσει μέρος του αναπτυξιακού δυναμικού της πλειοδύναμης πρώιμης επιβλάστης. Επιπλέον, τα ΚΠΕ έχουν τη δυνατότητα να μεταπίπτουν σε ΕΒΚ, όταν καλλιεργηθούν υπό συνθήκες ανάλογες, κάτι το οποίο είναι χαρακτηριστικό των κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα εργασία δημιουργήθηκαν αρχέγονα κύτταρα που αντιπροσωπεύουν την ενεργοποιημένη πλειοδύναμη κατάσταση της επιβλάστης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη των αρχικών σταδίων της ανάπτυξης και για βιοιατρικές εφαρμογές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

**EPIGENETIC REGULATION OF GENERATION AND
MAINTENANCE OF NEURAL STEM CELL IDENTITY**

PH.D THESIS

KARNAVAS THEODOROS

SUMMARY

A central issue in the tissue regeneration field lies in the generation of large populations of pluripotent and multipotent cell populations. The formation and differentiation of pluripotent cells is important for mammalian development. During early mouse development, pluripotent cells exist in the naïve epiblast (primitive ectoderm) in waiting to get primed for the generation of the three germ layers during gastrulation. The importance of mouse Embryonic Stem Cell (ESC)-derived Primitive Ectoderm like cells (EPL) and Epiblast Stem Cells (EpiSCs) lies with the discovery that they could resemble human ESCs. However, the mechanism of primitive ectoderm induction and maintenance is still unclear. Here, we present a SOX2-instructed conversion of ESC to large numbers of primitive ectoderm bodies (Epispheres) by lineage selection. The ESC to Epispheres transition is accompanied by down-regulation of Oct4 and the up-regulation of Fgf5 and Nanog involved in primitive ectoderm formation. Although, Epispheres express Nodal and low levels of T and Wnt3a, they do not express any other early mesodermal genes such as Cer1, Gscl, Meox1 and Ttr, but yet they retain their ability to respond to BMP4, an extrinsic signal guiding the formation of mesendodermal derivatives. In the absence of early endodermal gene expression, Afp, Foxa1 and Foxa2, Epispheres appear to maintain the ability to respond to extrinsic signals such as Activin-A guiding the formation of endodermal derivatives. Consistent with the ectodermal character acquired over time, depicted by the induction of neuroectodermal genes Nestin and Pax6, respond to all-trans retinoic acid to generate RC2-positive radial glia cells that in turn differentiate into neurons, glia and oligodendrocytes. Once injected to kidney capsules of

immunocompromised $RAG^{-/-}$ mice, Epispheres fail to generate tumours when compared to the parental ESC line. Lastly, Epispheres respond to LIF and revert into an ESC state, maintain their phenotype for successive passages in culture and regain their ability to generate tumours in $RAG^{-/-}$ mice. Thus, Epispheres provide for a novel, safe and efficient study model for the exploitation of early development and biomedical applications.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. al., B.e. (2003). A study of regional gut endoderm potency by analysis of Cdx2 null mutant chimeric mice. . Dev Biol 255, 399-406 (2003).
2. al., B.e. (2005). A study of regional gut endoderm potency by analysis of Cdx2 null mutant chimeric mice. . Dev Biol 255, 399-406 (20003).
3. Amar M. Singh, T.H., Katherine et al (2007). A Heterogeneous Expression Pattern for Nanog in Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2007; 25;2534-2542; originally published online Jul 5, 2007.
4. Ariel A. Avilion, S.K.N., Larisa H. Pevny² et al (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev 2003 17: 126-140.
5. Atsushi Kubo¹, Katsunori Shinozaki¹, John M. Shannon² et al (2004). Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture Development 131, 1651-1662.
6. Barlow P, O.D., Graham CF (1972). DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. J Embryol Exp Morphol 27:431-445.
7. Beddington RSP, R.E. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. Cell 1999, 96:195-209.
8. Bischoff, M., Parfitt, D.E., and Zernicka-Goetz, M. (2008). Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. Development (Cambridge, England) 135, 953-962.
9. BOHELER, A.M.W.A.K.R. (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy Physiol Rev 85: 635–678, 2005.
10. Boris Greber, G.W., 1 Christof Bernemann, 1 Jin Young Joo et al (2010). Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells, Cell Stem Cell 6, 215–226, March 5, 2010.
11. Boyer LA, Cole MF, Johnstone SE et al (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005 Sep 23;122(6):947-56
12. Brennan J, L.C., Norris DP, Rodriguez TA et al (2001). Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. Nature 2001.

13. Burdon, T., Smith, A. & Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12, 432-438 (2002).
14. Camus A, Billiards S, Khoo P et al (2000). The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo. *Development* 2000, 127:1799-1813
15. Cells, H.o.E.a.A.S., and Thomas Graf¹, a.M.S., 3 (2008). Heterogeneity of Embryonic and Adult Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, November 6, 2008.
16. Chambers, I.e.a.C., 643–655 (2003). (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655 (2003)
17. Charles E. Murry¹ and Gordon Keller (2008). Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development *Cell* 132, 661–680, February 22, 2008.
18. Ciemerych, M.A., Mesnard, D., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Animal and vegetal poles of the mouse egg predict the polarity of the embryonic axis, yet are nonessential for development. *Development (Cambridge, England)* 127, 3467-3474.
19. Dyce, J., George, M., Goodall, H., and Fleming, T.P. (1987). Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development (Cambridge, England)* 100, 685-698.
20. Eleftherios Sachlos, D.T.A. (2008). Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: A strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials* 29 (2008) 4471–4480.
21. Elling, U., Klasen, C., Eisenberger, T., Anlag, K. & Treier, M. (2006). Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 16319–16324 (2006)
22. Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
23. Fleming, T.P. (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Developmental biology* 119, 520-531.
24. Friedrich G, S.P. (1993). Insertional mutagenesis by retroviruses and promoter traps in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 1993;225:6.
25. Gardner (1997a). The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* 1997, 124:289-301.
26. Gardner (1997b). The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* 1997;124:289–301.

27. Henia Darr, Y.M.a.N.B. (2006). Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133, 1193-1201 (2006) doi:101242/dev02286.
28. Holm Zaehres¹ and Hans R. Schöler¹ (2007). Induction of Pluripotency: From Mouse to Human, *Cell* 131, November 30, 2007.
29. Hyslop L, S.M., Armstrong L, Walter T, et al (2005). Downregulation of Nanog induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 2005, 23:1035-1043.
30. I Desbaillets, U.Z., P Groscurth and M Gassmann (2000). Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000;85;645-651.
31. I. Gabrielle M., Brons¹, L.E.S., Matthew W. B. Trotter² et al (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*.
32. Ian Chambers¹, J.S., 3, Douglas Colby¹, Jennifer Nichols^{2,4} et al (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development, *NATURE* | Vol 450 | 20/27 December 2007 LETTERS.
33. I Jean M. H., Mitchell G., Otjvia H. et al (1990). Isolation of cDNAs Encoding Four Mouse FGF Family Members and Characterization of Their Expression Patterns during Embryogenesis. *Developmental Biology* 138,454-463 (1990)
34. Irene Ginis, a.Y.L., a Takumi Miura et al (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 269 (2004) 360–380.
35. IYayoi Toyooka¹, *, Daisuke Shimosato^{1,3}, Kazuhiro Murakami¹ et al (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* 135, 909-918 (2008) doi:101242/dev017400.
36. Jennifer Nichols¹, *, †, Jose Silva^{1,3,*}, Mila Roode^{1,2} and Austin Smith^{1,3} (2009a). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo *Development* 136, 3215-3222 (2009).
37. Jennifer Nichols¹, a.A.S., 3,* (2009b). Naive and Primed Pluripotent States *Cell Stem Cell* 4, June 5, 2009.
38. Jennifer Nichols, B.Z., *§, Konstantinos Anastassiadis, H.N., et al (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell*, Vol 95, 379–391, October 30, 1998.
39. Johnson MH, Z.C. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24:71–80. *Cell* 24:71–80

40. Joon-Lin Chew, 2† Yuin-Han Loh,1, 2† Wensheng Zhang et al (2005). Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells. *Molecular And Cellular Biology*, July 2005, p 6031–6046 Vol 25, No 14.
41. Jose Silva and Austin Smith¹ (2008). Capturing Pluripotency. *Cell* 132, February 22, 2008.
42. Jose Silva, 2,6,* Jennifer Nichols,1,3,6 Thorold W. Theunissen et al (2009). Nanog is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* 138, 722–737, August 21, 2009.
43. Joy Rathjen, J.-A.L., Michael D. Bettess, Jenny M. Washington et al (1999). Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *Journal of Cell Science* 112, 601-612 (1999).
44. Katsuhiko Hayashi, 2 Susana M. Chuva de Sousa Lopes,1,2,3 Fuchou Tang et al (2008). Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States. *Cell Stem Cell* 3, 391–401, October 9, 2008.
45. Kaufman, M.H. (1992). *The atlas of mouse development*. London: Academic Press.
46. Keller, G. (2008). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Dev* 2005 19: 1129-1155.
47. Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. et al (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cells differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13: 473-486.
48. Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells *Current Opinion in Cell Biology* 1995, 7:862-869.
49. Lawson KA, D.N., Roelen BA, Zeinstra LM, et al (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999, 13:424-436.
50. Lawson KA, P.R. (1987). Cell fate, morphogenetic movement and population kinetics of embryonic endoderm at the time of germ layer formation in the mouse. *Development* ,1987 101:627-652.
51. Leder, M.M.S.A.P. (1992). Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 89, pp 8240-8244, September 1992.
52. LEI XIAO, X.Y., SAUL J. SHARKIS (2006). Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 2006;24:1476–1486.
53. Lewis, S.L., and Tam, P.P. (2006). Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn* 235, 2315-2329.

54. Loebel DA, W.C., De Young RA, Tam PP. (2003). Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* Dec 1;264(1):1-14
55. Loh, Y.H.e.a. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet* 38, 431-440 (2006).
56. Lu, C.C., Brennan, J., and Robertson, E.J. (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Current opinion in genetics & development* 11, 384-392.
57. Ludovic Vallier¹, Sasha Mendjan¹, Stephanie Brown¹ et al (2009). Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 136, 1339-1349 (2009) doi:101242/dev033951.
58. Ludovic Vallier*, M.A.a.R.A.P. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* 118, 4495-4509.
59. Martinez Barbera JP, C.M., Thomas P et al (2000). The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 2000, 127:2433-2445.
60. Masui, S.e.a. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biol* 9, 625–635 (2007)
61. Matsuda, T.e.a. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18, 4261-4269 (1999).
62. Meng Li*, L.P., Robin Lovell-Badge† and Austin Smith* (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Current Biology* 1998, 8:971–974.
63. Meshorer, E., and Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature reviews* 7, 540-546.
64. Mitsui K, T.Y., Itoh H, Segawa K et al (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003, 113:631-642.
65. Mitsui, K.e.a. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642 (2003).
66. Nadya Lumelsky, O.B., 1,3 Pascal Laeng et al (2001). Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *SCIENCE* VOL 292 18 MAY 2001.
66. Nichols J, Z.B., Anastassiadis K, Niwa H et al (1998). Formation of pluripotent stem

cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998, 95:379-391.

67. Niwa H, M.J., Smith AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000, 24:372-376

68. Palmieri SL, P.W., Hess H, Scholer HR. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994, 166:259-267.

69. Paul J. Tesar¹, Josh G. Chenoweth¹ et al (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*.

70. Pedersen, R.A., Wu, K., and Balakier, H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Developmental biology* 117, 581-595.

71. Qi-Long Ying¹, J.W., Jennifer Nichols² et al (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *NATURE* | Vol 453 | 22 May 2008.

72. Ralston, A., and Rossant, J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clinical genetics* 68, 106-112.

73. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-448.

74. Russ, A.P.e.a.N., 95–99 (2000). (2000). Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404, 95–99 (2000)

75. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis L. et al (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Med* 10, 55-63 (2004)

76. Sharov, A.A.e.a. (2008). Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC. Genomics* 9, 269 (2008).

77. Soriano, G.F.a.P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify, and mutate developmental genes in mice. *GENES & DEVELOPMENT* 5:1513-1523.

78. Stella Pearson, P.S., Georges Lacaud and Valerie Kouskoff* (2008). The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF *Development* 135, 1525-1535 (2008) doi:101242/dev011767.

79. Strumpf, D.e.a. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093-2102 (2005)
80. Takahashi K, T.K., Ohnuki M, Narita M et al (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 Nov 30;131(5):861-72
81. Takashi Hamazaki¹, M.O., Shinya Yamanaka² and Naohiro Terada^{1,*} (2004). Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *Journal of Cell Science* 117, 5681-5686.
82. Tam, P.P., and Behringer, R.R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of development* 68, 3-25.
83. Tam PP, B.R. (1992). Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo. . *Ciba Found Symp* 1992, 165:27-41; discussion 42-49.
84. Tarkowski, A.K. (1959). Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. *Nature* 184, 1286-1287.
85. Thomas P, B.R.C.B., 6:1487-1496. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* 1996, 6:1487-1496
86. Thomas PQ, B.A., Beddington RS, and Development 1998, -. (1998). Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 1998, 125:85-94
87. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro et al (1998). *Science* 282,1145-1147(1998)
88. Tilo Kunath¹, Marc K. Saba-El-Leil² et al (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134, 2895-2902 (2007).
89. Tilo Kunath, M.K.S.-E.-L., Marwa Almousailleakh, Jason W et al (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134, 2895-2902, 2007.
90. V´eronique Lefebvre *, B.D., Alfredo Penzo-M´endez,, and Yu Han, B.P. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 2195–2214.
91. Valerie Gouon-Evans¹, L.B., Paul Gadue¹ et al (2006). BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *VOLUME 24 NUMBER 11 NOVEMBER 2006 NATURE BIOTECHNOLOGY*.

92. Voss AK, T.T., Petrou P, Anastassiadis K, et al (2000). Taube nuss is a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos. *Development* 2000, 127:5449-5461.
93. Waldrip WR, B.E., Hoodless PA et al (1998). Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 1998, 92:797-808.
94. Wasserman, P.M., Jovine, L. & Litscher, E.S. (2001)). A Profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* 3, E59-E64.
95. Weber, R.J., Pedersen, R.A., Wianny, F., et al (1999). Polarity of the mouse embryo is anticipated before implantation. *Development (Cambridge, England)* 126, 5591-5598.
96. Wernig M., Meissner, A., Foreman, R., et al (2007). *Nature* 448, 318-324.
97. Winnier G, B.M., Labosky PA, Hogan BLM (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995, 9:2105-2116.
98. Yamaguchi (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* 2001 Sep 4;11(17):R713-24.
99. Yayoi Toyooka, D.S., Kazuhiro Murakami et al (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* 135, 909-918, 2008
100. Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I. et al (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292 (2003)
101. Yu J, V.M., Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J et al (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007 Dec 21;318(5858):1917-20 Epub 2007 Nov 20
102. Yuhki Nakatake, N.F., 1,2,3 Yuko Iwamatsu et al (2006). Klf4 Cooperates with Oct3/4 and Sox2 To Activate the Lefty1 Core Promoter in Embryonic Stem Cells. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Oct 2006.
103. Yui-Han Loh^{1, 7}, Qiang Wu^{1,7}, Joon-Lin Chew^{1,2,7} et al (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *NATURE GENETICS VOLUME 38 [NUMBER 4 [APRIL 2006.*
104. Zernicka-Goetz, M. (2004). First cell fate decisions and spatial patterning in the early mouse embryo. *Seminars in cell & developmental biology* 15, 563-572.

105. Zernicka-Goetz, M. (2005). Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nature reviews* 6, 919-928.
106. Zernicka-Goetz, M., Morris, S.A., and Bruce, A.W. (2009). Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nature reviews* 10, 467-477.
107. Zhang, J.e.a.N.C.B., and 8 (2006). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nature Cell Biol* 8, 1114–1123 (2006)
108. Zheng-Xu Wang‡§, C.H.-L.T., Jacqueline L. L. Kueh‡ et al (2007). Oct4 and Sox2 Directly Regulate Expression of Another Pluripotency Transcription Factor, Zfp206, in Embryonic Stem Cells*□. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*VOLUME 282•NUMBER 17•APRIL 27, 2007.