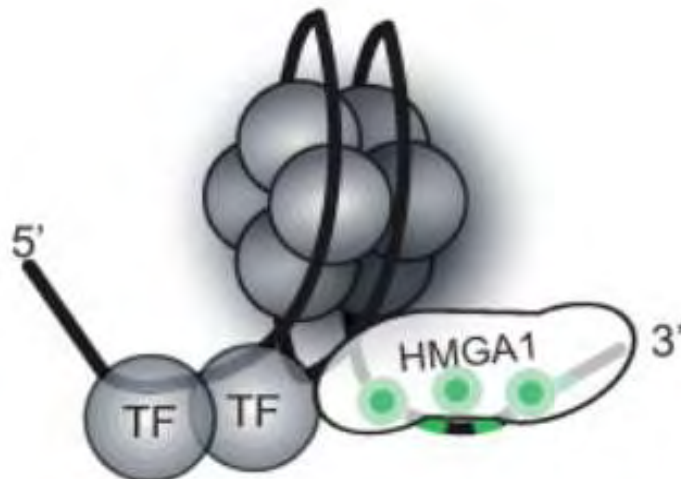




Διπλωματική Εργασία

‘ Η μελέτη του προτύπου έκφρασης της HMGA1 κατά τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού’



Στούμπου Ευγενία

Επιβλέπων καθηγητής: Θάνος Δημήτριος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΙΒΕΑΑ

Αθήνα, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Θάνος Δημήτριος *Ερευνητής Α', Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα
Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ)*

Μπαλατσός Νικόλαος *Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

Λεωνίδας Δημήτριος *Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεισφορά και την καθημερινή τους υποστήριξη ώστε να εκπονήσω επιτυχώς τη διπλωματική μου εργασία.. Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Δημήτρη Θάνο, Ερευνητή Α', για την τιμή που μου έκανε δίνοντάς μου την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που απέκτησα από το εργαστήριο αυτό είναι σπουδαίες και αποτελούν τη σημαντικότερη αφετηρία για τη συνέχεια των σπουδών μου στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας. Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω όμως στον Γιώργο Παναγόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου από την αρχή ως το τέλος μεταδίδοντας μου γνώση, συμβουλές, παιδεία και υλικά αγαθά για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό, Επίκουρο Καθηγητή και τον κ. Δημήτριο Λεωνίδα, Αναπληρωτή Καθηγητή, που δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τα φιλικά μου πρόσωπα που με στηρίζουν σε κάθε προσπάθεια, όνειρο και φιλοδοξία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ABSTRACT	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1. ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΕΜΒΥΙΚΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (ESCs).....	5
2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ.....	6
3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ iPSCs.....	10
4. ΤΡΟΠΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ iPSCs.....	15
5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ iPSCs.....	17
6. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ HMGA1.....	19
7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ HMGA1 ΣΤΟΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟ.....	20
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MEFs KNOCK IN (B6.Rosa26-rtTA).....	25
2. ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ MEFs.....	26
3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ Neubauer.....	28
4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA (RNA isolation).....	29
5. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA.....	30
6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	31
7. RT- PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής).....	32
8. REAL TIME PCR (PCR πραγματικού χρόνου).....	33
9. ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT).....	35
10. ΧΡΩΣΗ ΓΙΑ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ.....	40
11. ΑΝΟΣΟΚΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού αποδεικνύει πως τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα και είναι ικανά να μεταπίπτουν από μια διαφοροποιημένη κατάσταση σε μια πολυδύναμη. Ο επαναπρογραμματισμός διαφοροποιημένων κυττάρων μέσω των OSKM μεταγραφικών παραγόντων (Takahashi and Yamanaka, 2006) οδηγεί στην δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων (iPSCs) με χαρακτηριστικά όμοια των ESCs. Στην παρούσα εργασία αποδεικνύουμε, πως η πρωτεΐνη HMGA1 συμμετέχει στον επαναπρογραμματισμό εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) που έχουν απομονωθεί από το διαγονιδιακό στέλεχος B6.Rosa26-rtTA, κυρίως κατά το χρονικό διάστημα 3^{ης}-6^{ης} ημέρας επαναπρογραμματισμού. Ταυτόχρονα, στο ίδιο χρονικό διάστημα ενισχύεται η έκφραση του βασικότερου παράγοντα επαναπρογραμματισμού Oct4. Η εγκαθίδρυση του προτύπου έκφρασης της HMGA1, συμβάλλει στην βελτίωση της μεθόδου του επαναπρογραμματισμού και ενισχύει τη χρήση των παραγόμενων iPSCs στην αναγεννητική ιατρική, στην πρόληψη και στην θεραπεία ασθενειών.

ABSTRACT

The process of cellular reprogramming proves that cells are characterized from plasticity and are able to switch from a differentiated state to a pluripotent state. The reprogramming of differentiated cells through OSKM transcriptional factors (Takahashi and Yamanaka, 2006) leads to the creation of induced pluripotent cells (iPSCs) that have characteristics similar to the ESCs. In the present paper we prove how the protein HMGA1 participates in the reprogramming of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) which have been isolated from transgenic mouse B6.Rosa26-rtTA, mainly during the time between the 3rd and the 6th day of reprogramming. At the same time the expression of the most basic factor of reprogramming Oct4 is enhanced. The establishment of HMGA1 expression pattern contributes to the improvement of the reprogramming method, and enhances the use of produced iPSCs in regenerative medicine, the prognosis and the treatment of diseases.

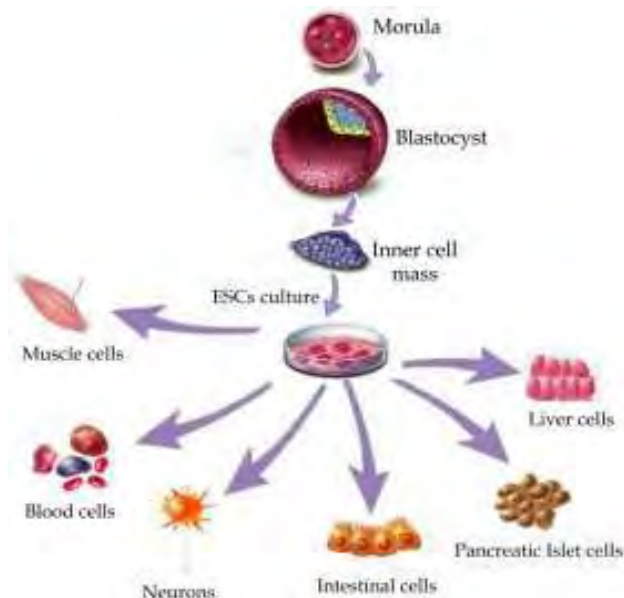
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (ESCS)

Η δημιουργία ενός εμβρύου προκύπτει από το ζυγωτό, ύστερα από τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου από το σπερματοζώαριο. Τα θυγατρικά κύτταρα διαιρούνται διαδοχικά και διαφοροποιούνται δίνοντας ολόκληρο το έμβρυο και τις εξωεμβρυϊκές δομές. Στο ποντίκι, κατά την φάση σχηματισμού 16 κυττάρων (όπου έχει δημιουργηθεί πλέον μια συμπαγής δομή) πραγματοποιείται η δημιουργία του μοριδίου που αποτελείται από μια ομάδα εσωτερικών κυττάρων, η οποία καλύπτεται από περισσότερα εξωτερικά κύτταρα (Barlow et al., 1972). Από τα εσωτερικά κύτταρα και κάποια διαιρούμενα κύτταρα του τροφοβλάστη (εξωτερική στιβάδα) προκύπτει το έμβρυο κατά την φάση μετάβασης στη βλαστοκύστη (Fleming, 1987; Siepel et al., 2005). Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, συμβαίνει στο στάδιο μετά τον σχηματισμό της βλαστοκύστης (κατά το στάδιο σχηματισμού 64 κυττάρων) όπου πλέον η εσωτερική κυτταρική μάζα και ο τροφοβλάστης δεν ανταλλάσσουν κύτταρα καθώς αποτελούν διαφορετικά κυτταρικά τμήματα (Dyce et al., 1987; Fleming, 1987).

Τα πολυδύναμα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells, ESCs) προκύπτουν από την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM) και χαρακτηρίζονται από πολυδυναμικότητα, αυτοανανέωση και αθανασία (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Η ICM σχηματίζεται στο στάδιο της βλαστοκύστης και καθένα από τα κύτταρα της έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί σε όλους τους τύπους των εμβρυϊκών ιστών (πολυδυναμία), ενώ έχει περιορισμένη συμμετοχή στους εξωεμβρυϊκούς ιστούς (Beddington and Robertson, 1989; Bradley et al., 1984). Τα πρώτα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα απομονώθηκαν από μια βλαστοκύστη ποντικού (Evans and Kaufman, 1981) ενώ ανθρώπινα ESC απομονώθηκαν το 1988 (Pan et al., 2007). Από την εσωτερική κυτταρική μάζα, τα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν και να διατηρηθούν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση σε καλλιέργειες (**Εικόνα 1**).

Τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά των βλαστοκυττάρων είναι η αυτο-ανανέωση και η πολυδυναμικότητα δηλαδή η ικανότητα να πολλαπλασιάζονται αενάως διατηρώντας την ταυτότητά τους και να διαφοροποιούνται δυναμικά παράγοντας διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.



Εικόνα 1: Απεικόνιση απομόνωσης και διατήρησης σε καλλιέργεια των ESCs.

Διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων, καλείται η διαδικασία κατά την οποία τα μη εξειδικευμένα βλαστοκύτταρα, εξειδικεύονται σταδιακά. Η ρύθμιση της απαιτεί ένα σύνθετο ρυθμιστικό δίκτυο εσωτερικού προγραμματισμού, μέσω γονιδίων, αλλά και εξωτερική σηματοδότηση μέσω ουσιών που εκκρίνονται από άλλα κύτταρα, από την φυσική επαφή με γειτονικά κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών, προκαλούν την απόκτηση επιγενετικών δεικτών πάνω στο κυτταρικό DNA, που μπορούν να μεταδοθούν και στην επόμενη γενιά (Hemberger M et al., 2009). Τέτοιοι δείκτες είναι η αλκαλική φωσφατάση, τα επιφανειακά σταδιο-ειδικά εμβρυικά αντιγόνα SSEA-1,3,4 και ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 που είναι ο κύριος ρυθμιστής της αυτοανέωσης των βλαστοκυττάρων και της διατήρησης της πολυδυναμικότητάς τους.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ

Κατά την ανάπτυξη, τα κύτταρα μεταπίπτουν από μια πολυδύναμη κατάσταση σε μια διαφοροποιημένη δημιουργώντας όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του σώματος. Η ανάπτυξη γενικά θεωρείται μια μη αναστρέψιμη διαδικασία που σημαίνει ότι ένα διαφοροποιημένο κύτταρο θεωρείται μη ικανό να επιστρέψει στην πολυδύναμη μορφή του. Ωστόσο, είναι πλέον εφικτός ο επαναπρογραμματισμός διαφοροποιημένων κυττάρων με αποτέλεσμα την απόκτηση της πολυδυναμίας τους. Έτσι, γίνεται κατανοητό πως το κύτταρο χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα και η ταυτότητά του είναι αναστρέψιμη, είτε μεταπίπτοντας

σε άλλον κυτταρικό τύπο, είτε επιστρέφοντας στην εμβρυονική του κατάσταση. Ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός αποτελεί φλέγον επιστημονικό ζήτημα από τη δεκαετία του 60' και πραγματοποιείται με τρεις βασικές μεθόδους: την πυρηνική μεταφορά (somatic cell nuclear transfer, SCNT), την κυτταρική σύντηξη (Cell fusion) και τον επαναπρογραμματισμό μέσω μεταγραφικών παραγόντων (Takahashi and Yamanaka, 2015).

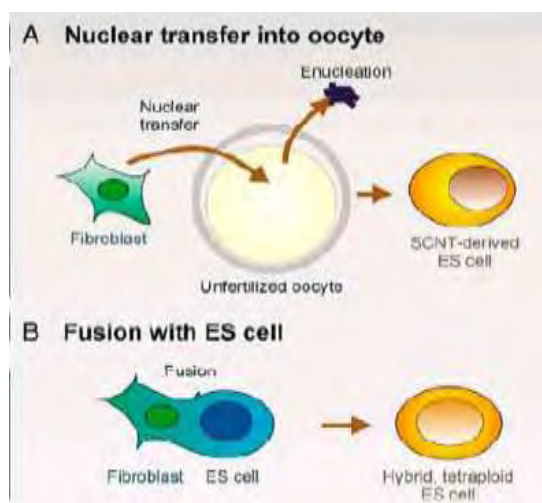
1. Πυρηνική μεταφορά

Η μεταφορά ενός διαφοροποιημένου πυρήνα ενός σωματικού κυττάρου σε απύρηνο ωοκύτταρο είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ολόκληρου οργανισμού πανομοιότυπου με του σωματικού κυττάρου. Η ανάπτυξη του ωοκυττάρου προκαλείται με την ενεργοποίηση του μέσω ηλεκτρικού εναύσματος ή με παράγοντες που μπλοκάρουν την πρωτεϊνοσύνθεση και την δραστικότητα των πρωτεϊνικών κινασών. Ο μεταφερόμενος πυρήνας αυξάνει σε μέγεθος και προσομοιάζει τον προπυρήνα ενός γονιμοποιημένου ζυγωτού. Η ανάπτυξη του ωοκυττάρου προχωρεί μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, από την οποία και απομονώνουμε τα ESCs από την εσωτερική κυτταρική μάζα, τα οποία στην συνέχεια μπορούμε να καλλιεργήσουμε και να διαφοροποιήσουμε στους τύπους κυττάρων που μας ενδιαφέρουν (Wakayama et al, 2001). Το 1997, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η κλωνοποίηση του γνωστού προβάτου Dolly, η πρώτη κλωνοποίηση μέσω μεταφορά πυρήνα σε θηλαστικά από τον Wilmut και τους συνεργάτες του (Wilmut et al, 1997) (**Εικόνα 2**).

2. Κυτταρική σύντηξη

Η κυτταρική σύντηξη ανάμεσα σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους αλλάζει το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων και μας δίνει την δυνατότητα να κατανοήσουμε πως οι μηχανισμοί με τους οποίους διαφοροποιούνται κατά την ανάπτυξη είναι αναστρέψιμοι. Η διαδικασία αυτή, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ετεροκαρυωτικών κυττάρων ή υβριδικών. Στην πρώτη περίπτωση, δεν πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός και σύντηξη πυρήνων σε αντίθεση με την περίπτωση των υβριδικών κυττάρων (Yamanaka S and Blau HM, 2010). Γενικότερα, η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε εκτενώς για τη σύντηξη πολλών κυτταρικών τύπων όπως μυοκυττάρων με ινοβλάστες και αποδείχθηκε πως η μεταστροφή ενός κυτταρικού

τύπου σε έναν άλλον έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγές στην έκφραση γονιδίων. Για παράδειγμα, γονίδια αποσιωπημένα μπορούν να ενεργοποιηθούν και το αντίστροφο (Weinmann JM et al, 2003). Είναι λοιπόν ιδιαίτερα σημαντικό να αναφέρουμε, πως ο επαναπρογραμματισμός των κυττάρων με αυτή τη μέθοδο συμβαίνει ύστερα από σύντηξη ESCs με διαφοροποιημένα κύτταρα με αποτέλεσμα την αλλαγή του γονιδιακού προφίλ των διαφοροποιημένων κυττάρων με τέτοιο τρόπο ώστε να εκφράζονται γονίδια που συνδέονται με την απόκτηση της πολυδυναμικής ταυτότητας. Το 2005, ο Cowan και η ερευνητική του ομάδα επαναπρογραμματίσαν για πρώτη φορά ανθρώπινα σωματικά κύτταρα ύστερα από σύντηξή τους με ESCs (Cowan et al, 2005) (Εικόνα2).



Εικόνα 2: A) Πυρηνική μεταφορά, B) Κυτταρική σύντηξη ινοβλάστη με ES κύτταρο

(Remboutsika E, 1994)

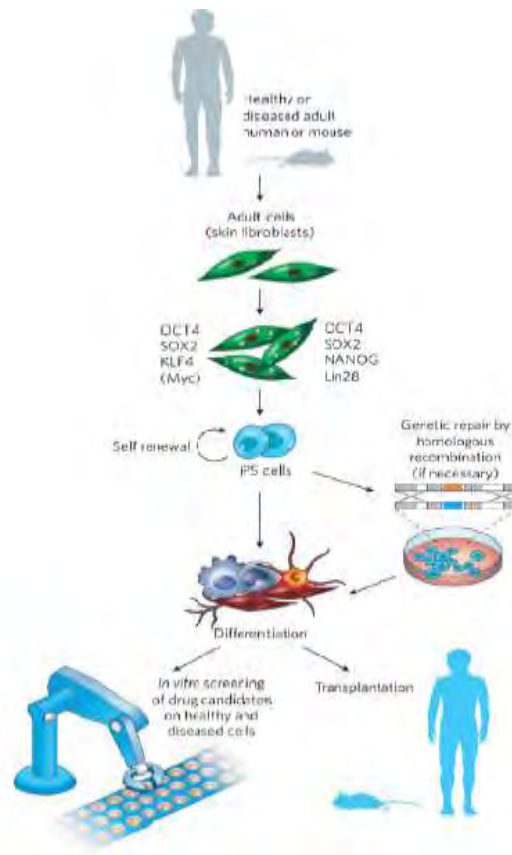
3. Επαναπρογραμματισμός μέσω μεταγραφικών παραγόντων

Το 2006 οι Takahashi και Yamanaka άνοιξαν τον δρόμο για μια νέα εποχή για τη μοριακή βιολογία των βλαστοκυττάρων αφού κατάφεραν να επαναπρογραμματίσουν σωματικά κύτταρα σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ύστερα από μελέτη 24 παραγόντων, κατέληξαν σε 4 παράγοντες που μέσω της συνεργατικής τους δράσης είναι ικανοί να επαναπρογραμματίσουν ινοβλάστες ποντικών σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) που ομοιάζουν με τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESCs). Οι παράγοντες αυτοί είναι οι Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM) και μπορούν να επαναπρογραμματίσουν διάφορους

κυτταρικούς τύπους. Πιο συγκεκριμένα, iPSCs προέκυψαν από κύτταρα διαφόρων ιστών όπως για παράδειγμα του αίματος (Hanna et al., 2008), του συκωτιού, του στομάχου (Aoi et al., 2008) και του παγκρέατος (Stadtfield et al., 2008). Επιπλέον, ανθρώπινοι ινοβλάστες (Lowry et al., 2008, Takahashi et al., 2007) και κερατινοκύτταρα (Aasen et al., 2008; Maherali et al., 2008) μετατράπηκαν σε iPSCs χρησιμοποιώντας τον ίδιο ή διαφορετικό συνδυασμό παραγόντων δηλαδή Oct4, Sox2, Lin28 και Nanog (Yu et al., 2007).

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αναφέρουμε, πως ο Oct4 είναι ο σημαντικότερος και αναντικατάστατος μεταγραφικός παράγοντας για την επίτευξη του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (Nakagawa et al., 2008). Το γονίδιο του Oct4 είναι δείκτης εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε αντίθεση με τους άλλους τρεις που εκφράζονται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Το γονίδιο για τον Sox2 εκφράζεται στα νευρικά βλαστικά και πρόδρομα κύτταρα. Ο Klf4 εκφράζεται στο δέρμα, στο στομάχι, στο έντερο και στους σκελετικούς μύες, ενώ ο c-myc εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η μέθοδος αυτή έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του τεράστιου εύρους εφαρμογών της κλινικά, όπως στην εξειδικευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία και στον έλεγχο απόκρισης σε διάφορους φαρμακολογικούς παράγοντες (**Εικόνα 3**).

Τα επαναπρογραμματισμένα iPSCs εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες με τα ESCs ως προς τα μεταγραφικά πρότυπα και τα πρότυπα μεθυλίωσης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζουν ταύτιση ως προς την απομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων πολυδυναμίας, oct4 και nanog. Επίσης, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν το πρότυπο των μεθυλίωσεων των ιστονών συμπεριλαμβανομένου και του προτύπου των δισθενών περιοχών στις λυσίνες K4 και K27 της ιστόνης H3 σε βαθμό που δε διαφέρει από τα ESC (Maherali et al., 2007; Mikkelsen et al., 2008; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Επίσης, στα θηλυκά παρατηρείται επανενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και γενικότερα αυξημένη δράση της τελομεράσης. Τα iPSCs όπως και τα ESCs παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του επιφανειακού δείκτη SSEA-1 και συμβάλλουν στη δημιουργία τερατωμάτων, τα οποία αποτελούν νεοπλασματικούς όγκους που περιέχουν κύτταρα και από τις τρεις εμβρυϊκές στιβάδες (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα). Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 0,1-1% των κυττάρων καταφέρνουν εν τέλει να επαναπρογραμματιστούν σε iPSCs.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας iPSCs για χρήση στην εξειδικευμένη για τον κάθε ασθενή θεραπεία ή στον έλεγχο φαρμακολογικών παραγόντων

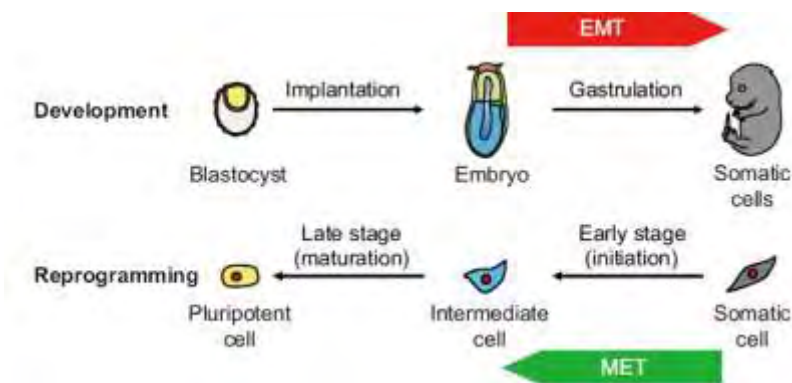
ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ iPSCs

1. Η μετάβαση από την μεσεγχυματική στην επιθηλιακή κατάσταση (MET)

Η επιτυχής δημιουργία iPSCs καθορίζεται σε πρώτη φάση από δύο σημαντικά γεγονότα: τη σταδιακή απώλεια σωματικών χαρακτηριστικών και ταυτόχρονα την απόκτηση επιθηλιακών πολυδύναμων χαρακτηριστικών. Η συνεχής έκφραση των εξωγενών παραγόντων επαναπρογραμματισμού οδηγεί στα ακόλουθα αποτελέσματα.

Αρχικά, κατά τη φυσιολογική διαφοροποίηση των ινοβλαστών, τα κύτταρα στο στάδιο της γαστριδίωσης μεταπίπτουν από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική κατάσταση (EMT) για τον σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) του εμβρύου (Thiery et al., 2009; Chen et al., 2012). Η αντίθετη μετάβαση, από την μεσεγχυματική

στην επιθηλιακή κατάσταση (MET) έχει προταθεί ως απαραίτητη προϋπόθεση για την εγκαθίδρυση των αρχικών σταδίων του επαναπρογραμματισμού (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010) (**Εικόνα 4**). Πράγματι, αυτό επιβεβαιώθηκε μετά από επαγωγή των παραγόντων OSKM σε ινοβλάστες, όπου η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με την μεσεγχυματική κατάσταση μειώθηκε τόσο σε κύτταρα ποντικού όσο και σε ανθρώπινα. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο Snai 1, Snai 2, Twist 1, Twist 2, Zeb 1, Zeb 2 (Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Takahashi et al., 2014). Ταυτόχρονα, παρατηρείται μείωση της έκφρασης επιφανειακών πρωτεϊνών μεσεγχυματικής ταυτότητας όπως η Thy1 και αύξηση έκφρασης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin στην επιφάνεια των κυττάρων (O'Malley et al., 2013). Οι αλλαγές αυτές προηγούνται της έκφρασης του SSEA-1 επιφανειακού δείκτη, που υποδηλώνει σε πρώτη φάση την εγκαθίδρυση της πολυδυναμικότητας στα κύτταρα που έχουν επαναπρογραμματιστεί.



Εικόνα 4: Η εναλλαγή των δύο καταστάσεων EMT και MET κατά την διαφοροποίηση και τον επαναπρογραμματισμό αντίστοιχα (Takahashi and Yamanaka, Review, 2015)

Κατά τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα, τα σωματικά γονίδια καταστέλλονται ενώ αυτά που σχετίζονται με την πολυδυναμικότητα αρχίζουν να υπερεκφράζονται. Ωστόσο, ο δρόμος προς τον επαναπρογραμματισμό περιλαμβάνει και μια παροδική κατάσταση που μεσολαβεί μεταξύ της αρχικής φάσης επαναπρογραμματισμού και των πλήρως επαναπρογραμματισμένων κυττάρων (iPSCs) (Marcellini et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, στα πρώτα στάδια του επαναπρογραμματισμού τα κύτταρα αυξάνουν τον ρυθμό

του πολλαπλασιασμού τους, αρχίζουν και αλλάζουν μορφολογία (σχηματίζουν στρογγυλές αποικίες) και παρουσιάζουν καταστολή της έκφρασης σωματικών γονιδίων.

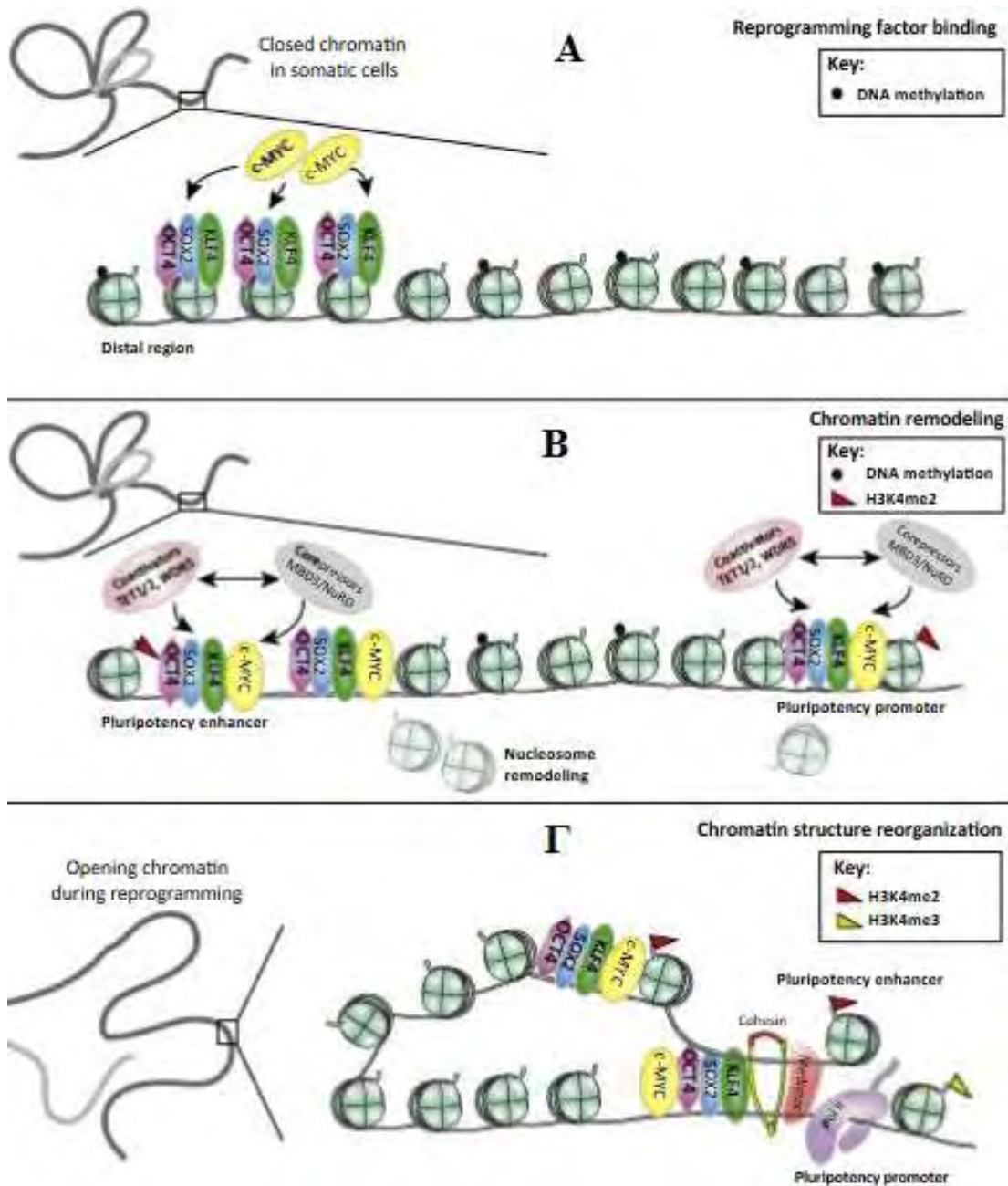
Σε ενδιάμεσα στάδια, όπως προαναφέρθηκε αρχίζουν και εκφράζονται οι επιφανειακοί δείκτες πολυδυναμικότητας όπως ο SSEA-1 και η E-cadherin δηλώνοντας την απόκτηση επιθηλιακού χαρακτήρα. Τέλος, τα κύτταρα θεωρούνται πλήρως επαναπρογραμματισμένα όταν αρχίζουν να σχηματίζουν καλοσχηματισμένες και μεγάλες στρογγυλές αποικίες, αποσιωπούν τα σωματικά τους γονίδια, ενεργοποιούν όλα τα πολυδύναμα όπως ο Oct4 και Nanog και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά όμοια των ESCs.

2. Αλλαγή γονιδιακού προγράμματος έκφρασης

Το κοκτέιλ των 4 μεταγραφικών παραγόντων OSKM που ανακαλύφθηκαν από τους Takahashi και Yamanaka, αποδεικνύουν πως μέσω της εξωγενούς έκφρασής τους σε σωματικά κύτταρα μπορούν να αλλάξουν την τύχη των κυττάρων. Οι Oct4, Sox2, Klf4 μαζί με το Nanog αλληλεπιδρούν δημιουργώντας ένα δικό τους δίκτυο αλληλεπιδράσεων ανεξάρτητο από την δράση του c-Myc (Boyer LA et al, 2005; Loh et al, 2006). Στόχος τους είναι η καταστολή σωματικών γονιδίων και η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων πολυδυναμικότητας. Για την καταστολή σωματικών γονιδίων, με την πρόσδεση ενός από τους Oct4, Sox2, Klf4 ή Nanog στον υποκινητή του γονιδίου είναι δυνατή η καταστολή του ενώ για την ενεργοποίηση γονιδίων πολυδυναμικότητας απαιτείται η συνεργατική τους δράση, δηλαδή η πρόσδεση όλων των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή. Αδυναμία πρόσδεσης ενός μόνο παράγοντα μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχημένο κυτταρικό επαναπρογραμματισμό (Kim et al, 2006; Sridharan et al, 2009).

3. Επιγενετικές τροποποιήσεις DNA και Ιστονών

Οι υποκινητές των γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμικότητα είναι μεθυλιωμένοι στους ινοβλάστες και στα σωματικά κύτταρα, ενώ απομεθυλιώνονται με σκοπό την έκφρασή τους στα ESCs και τα iPSCs. Συνεπώς, κατά τον επαναπρογραμματισμό οι ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών απομεθυλιώνονται (**Εικόνα 5**)



Εικόνα 5: (Α) Αναπαράσταση της κλειστής χρωματίνης κατά την έναρξη του επαναπρογραμματισμού και της πρόσδεσης του *c-Myc* στο σύμπλοκο των *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* (Β) Ο *c-Myc* προσδέεται και αλλάζει την διαμόρφωση της χρωματίνης 'κλειδώνοντας' την έναρξη του επαναπρογραμματισμού (Γ) Η χρωματίνη έχει ανοιχτή διαμόρφωση, οι υποκινητές των πολυδύναμων γονιδίων απομεθυλιώνονται και ξεκινά η μεταγραφή τους ύστερα από τη δημιουργία θηλιάς (μέσω κοχσινών) στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (Xu et al., Review 2015)

Η μεθυλίωση των ιστονών κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στην διαδικασία του επαναπρογραμματισμού. Πιο ειδικά, στα ESCs και στα iPSCs η ιστόνη 3 είναι μεθυλιωμένη στη λυσίνη 4 και απομεθυλιωμένη στη λυσίνη 9 στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που σχετίζονται με τη πολυδυναμία. Το αντίθετο ακριβώς πρότυπο έχουν οι ινοβλάστες και τα σωματικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, στα ESCs και iPSCs η χρωματίνη στους υποκινητές σωματικών γονιδίων περιλαμβάνει τη μεθυλίωση της ιστόνης 3 στις λυσίνες 27 και 4. Αυτά τα πρότυπα μεθυλίωσης στην χρωματίνη των κυττάρων που πρόκειται να επαναπρογραμματιστούν είναι απαραίτητη για την δημιουργία iPSCs (Bernstein et al., 2006). Γενικά, είναι αναγκαία η απομεθυλίωση του DNA στις περιοχές των υποκινητών των πολυδύναμων γονιδίων και ταυτόχρονα η μεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 9 (**Εικόνα 5**).

Οι ιστόνες 3 και 4 τόσο στα ESCs όσο και στα iPSCs είναι υπερακετυλιωμένες στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία. Ο c-Myc είναι υπεύθυνος για την στρατολόγηση ακετυλοτρανσφερασών (π.χ GCN, p300), συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, αποακετυλασών και απομεθυλασών των ιστονών στα γονίδια στόχους (Lin CH et al, 2009b).

4. Επανενεργοποίηση χρωμοσώματος X

Στα θηλαστικά, η αποσιώπηση του χρωμοσώματος X (Xi) στα κύτταρα θηλυκών ατόμων, εξασφαλίζει την εξισορρόπηση της γονιδιακής δόσης μεταξύ των δύο φύλων. Το χρωμόσωμα X που απενεργοποιείται επιλέγεται τυχαία και το υπεύθυνο γονίδιο για τη διαδικασία αυτή είναι το Xist το οποίο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από το X χρωμόσωμα που πρόκειται να αδρανοποιηθεί. Συγκεκριμένα, το Xist γονίδιο παράγει ένα μη κωδικό RNA που καλύπτει το Xi και το απενεργοποιεί. Μελέτες, έδειξαν ότι το χρωμόσωμα X σε θηλυκά σωματικά κύτταρα μπορεί να επανενεργοποιηθεί κατά τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό (Maherali et al., 2007).

Μετά από εξωγενή ενσωμάτωση των παραγόντων επαναπρογραμματισμού (OSKM) σε κύτταρα MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts), κατά τα τελευταία στάδια του επαναπρογραμματισμού, το γονίδιο Xist εντοπίστηκε αποσιωπημένο. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε απομάκρυνση του ενζύμου EZH2 από το χρωμόσωμα X (Xi), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της χρωματίνης σε συμπυκνωμένη μορφή μέσω τριμεθυλίωσης της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3). Έτσι, η απομεθυλίωση του DNA σε συνδυασμό με αποσιώπηση του Xist μπορεί να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση του χρωμοσώματος X.

Παρόμοια ευρήματα σε μελέτες ανθρώπινων iPSCs, οδήγησαν στην επιβεβαίωση αυτού του φαινομένου (Tomoda et al., 2012).

5. Τελομερή

Τα εμβρυϊκά πολυδύναμα κύτταρα, έχουν σε κάθε χρωματίδα μακριά τελομερή με συντηρημένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες TTAGGG, τα οποία προστατεύουν τα χρωμοσώματα από την αποικοδόμηση και από την σύντηξη μεταξύ τους (O'Sullivan και Karlseder, 2010). Κατά τη διαφοροποίηση, όσο περνούν οι κυτταρικές διαιρέσεις, τα τελομερή μικραίνουν και η δράση της τελομεράσης ολοένα και εξασθενεί. Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοπρωτεϊνική πολυμεράση, η οποία διατηρεί τα άκρα των τελομερών και παίζει σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική γήρανση. Γενικότερα, η μείωση του μήκους των τελομερών σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση και η απορρύθμιση της δράσης της τελομεράσης σε σωματικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση (Collins, 2006).

Η εξαρτώμενη από την τελομεράση επιμήκυνση των τελομερών, εμφανίζεται κατά τον επαναπρογραμματισμό των MEFs σε iPSCs και ολοκληρώνεται έως ότου το μήκος τους πλησιάσει το αντίστοιχο των ESCs (Marion et al., 2009b). Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με σύγηση του γονιδίου της τελομεράσης σε MEFs καλλιέργειες, έδειξαν χαμηλή απόδοση του επαναπρογραμματισμού τους σε iPSCs και μαζική κυτταρική απόπτωση. Επίσης, διαπιστώθηκε χαμηλό δυναμικό διαφοροποίησης, αδυναμία δημιουργίας χμαιοτικών απογόνων και τερατωμάτων (Le et al., 2014). Η βλάβη που προκαλείται στο DNA λόγω κοντών τελομερών επηρεάζει τη δημιουργία iPSCs κλώνων. Κατά συνέπεια, η απόκριση σε βλάβες του DNA με τη δράση της τελομεράσης και την επιμήκυνση των τελομερών, ενισχύει την διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού.

ΤΡΟΠΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ iPSCs

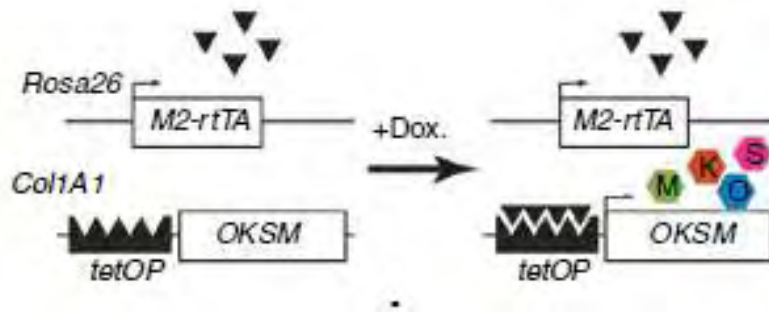
Η χρήση ρετροϊών για τη δημιουργία iPSCs έγινε μέσω σταθερής ενσωμάτωσης των τεσσάρων παραγόντων επαναπρογραμματισμού (OSKM) στο γονιδίωμα των κυττάρων. Αυτός ο τρόπος παρουσίασε δύο μειονεκτήματα: ο επαναπρογραμματισμός των κυτταρικών σειρών είχε άμεση εξάρτηση από την έκφραση των εξωγενών παραγόντων και η ενεργοποίηση των ιϊκών διαγονιδίων στα σωματικά κύτταρα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη όγκων στα χμαιοτικά

ζώα (Takahashi and Yamanaka, 2006; Okita et al., 2007). Μία ακόμη μέθοδος, στηρίζεται στη χρήση αδενοϊών χωρίς όμως τη σταθερή αλλά την παροδική ενσωμάτωση των OSKM. Επίσης, η χρήση επαγόμενων από δεοξυκυκλίνη λεντιϊκών φορέων από τη μία έφερε τα παραπάνω μειονεκτήματα λόγω σταθερής ενσωμάτωσης των παραγόντων, αλλά από την άλλη η απομάκρυνση της δεοξυκυκλίνης είχε σαν αποτέλεσμα τον τερματισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αυτονομία των κυττάρων (Stadtfeld et al., 2010).

Ωστόσο, είναι δυνατή η δημιουργία iPSCs χωρίς τη χρήση ιών. Συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα Yamanaka et al. χρησιμοποίησε δύο πλασμιδιακούς φορείς, ο ένας εξέφραζε τους Oct4, Klf4, Sox2 και ο άλλος τον c-Myc. Επιμόλυναν με αυτούς εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού και τελικά οδηγήθηκαν στη δημιουργία iPSCs (Okita et al., 2008). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν τρανσποζόνια (μεταθετά στοιχεία που ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των κυττάρων) για την παραγωγή iPSCs και στη συνέχεια αφαίρεση του διαγονιδίου μέσω εκτομής, με τη βοήθεια της Cre-ρεκομπινάσης ή επανέκφραση της τρανσποζάσης όπως συμβαίνει με τη χρήση piggyback τρανσποζονίων (Woltjen et al., 2009). Τέλος, ένας ακόμη τρόπος για την αποφυγή της ενσωμάτωσης ιών στο γένωμα είναι η δημιουργία iPSCs με τη βοήθεια χημικών ή μικρών μορίων. Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν ήδη ταυτοποιήσει χημικά που μπορούν να αντικαταστήσουν έναν ή δύο παράγοντες επαναπρογραμματισμού. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει χαμηλή αποτελεσματικότητα και μπορεί να επιφέρει ποικίλες ανωμαλίες στα παραγόμενα iPSCs καθώς πολλές χημικές ουσίες είναι ισχυροί τροποποιητές της χρωματίνης και του DNA (Li and Ding, 2010).

Ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της τεχνολογίας του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού αποτελεί η δημιουργία του στελέχους Rosa26-rtTA, ένα διαγονιδιακό ποντίκι που έχει ενσωματωμένη στο γονιδιώμά του την επαγόμενη από δεοξυκυκλίνη, πολυκυστρονική κασέτα των τεσσάρων παραγόντων επαναπρογραμματισμού (OSKM). Ειδικότερα, το συγκεκριμένο στέλεχος εκφράζει σταθερά τον επαγωγέα M2-rtTA ο οποίος έχει εισαχθεί στην περιοχή του γονιδίου Rosa26 και παρουσία δεοξυκυκλίνης προσδένεται στον υποκινητή της κασέτας OSKM (η ένθεση της κασέτας έγινε στην 3'αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου του κολλαγόνου, Col1a1). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταγραφή των πολυδύναμων γονιδίων κάθε φορά που προστίθεται δεοξυκυκλίνη στο θρεπτικό μέσο που καλλιεργούνται τα κύτταρα που έχουν απομονωθεί από το στέλεχος αυτό. Η μέθοδος αυτή ξεπερνά τα εμπόδια που δημιουργούνται από τη χρήση ιικών φορέων όπως η έκφραση ιικών

διαγονιδίων, η αποσιώπηση ενδογενών γονιδίων ή η πιθανή μεταλλαξιγένεση λόγω ιϊκής ενσωμάτωσης (**Εικόνα 6**) (Stadtfield et al., 2010).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της πρόσδεσης του επαγωγέα M2-rtTA στον υποκινητή της κασέτας OSMK ύστερα από επίδραση δεοξυκυκλίνης (Stadtfield et al., 2010)

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ iPSCs

Η εφαρμογή των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) που προκύπτουν από τον επαναπρογραμματισμό διαφόρων τύπων σωματικών κυττάρων, στην αναγεννητική ιατρική έχει σαν αποτέλεσμα την επιδιόρθωση ιστών από τραυματισμό ή ασθένεια. Στόχος είναι η χρήση τους στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών όπως στη θεραπεία του Parkinson (Kriks et al., 2011), στην ανεπάρκεια αιμοπεταλίων (Takayama et al., 2010), σε τραυματισμούς στη σπονδυλική στήλη (Nori et al., 2011; Tsuji et al., 2010) και στην εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Okamoto and Takahashi, 2011).

Τον Ιανουάριο του 2009 ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής ενέκρινε την πρώτη κλινική δοκιμή για χρήση ESC για τη θεραπεία ασθενών με τραυματισμό στη σπονδυλική στήλη. Η χρήση ESC που απομονώνονται από άνθρωπο, παρουσιάζει δύο σημαντικά προβλήματα τα οποία ξεπερνώνται με την τεχνολογία των iPSCs. Πρώτον, η απόρριψη του ανοσοποιητικού μετά τη μεταμόσχευση και δεύτερον η ηθικοί προβληματισμοί που προκύπτουν γύρω από τη χρήση ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων.

Ένας ακόμη στόχος της τεχνολογίας των iPSCs είναι η εφαρμογή τους στον έλεγχο των φαρμάκων και στην μοντελοποίηση ασθενειών. Συγκεκριμένα, ηπατοκύτταρα που δημιουργήθηκαν από iPSCs απομονώθηκαν με τη σειρά τους από άτομα με διαφορετικά ένζυμα για το κυτόχρωμα p450 και είναι χρήσιμα για να προβλέψουμε την τοξικότητα νέων φαρμάκων. Επιπρόσθετα, η δημιουργία iPSCs για κάθε άτομο εξειδικευμένα (Patient specific, PS-iPSCs) δίνει τη δυνατότητα μέσω δημιουργίας μιας κατάστασης παθογένειας στο τρυβλίο, να βρεθεί η αιτία της ασθένειας από την οποία πάσχει ο ασθενής (Lee and Studer, 2010). Για παράδειγμα, ένα μικρό ποσοστό ασθενών με τη συγγενή μορφή της νευροεκφυλιστικής ασθένειας ALS φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο SOD και διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν το μεταλλαγμένο SOD γονίδιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της παθογένειας της συγκεκριμένης ασθένειας. Η ερευνητική ομάδα Dimos et al. (Dimos et al., 2008) δημιούργησε iPSCs από έναν ασθενή που έπασχε από συγγενή ALS και τα διαφοροποίησε σε κινητικούς νευρώνες, παρέχοντας μια πολύ σημαντική πηγή για την μελέτη του θανάτου των κινητικών νευρώνων σε ασθενείς ALS.

Μεγάλη πρόκληση αποτελεί η εφαρμογή των iPSCs στην βιοτεχνολογία ζώων. iPSCs από διάφορα ζώα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη γενετική μηχανική επιτρέποντας τη δημιουργία μοντέλων ασθενειών αλλά και στην παραγωγή χρήσιμων ουσιών, όπως ένζυμα τα οποία απουσιάζουν ή είναι σε χαμηλά επίπεδα σε ασθενείς με γενετικές ασθένειες. Επίσης, η τεχνολογία αυτή μπορεί να αποδειχθεί μελλοντικά χρήσιμη για τη προστασία από την εξάφανιση διαφόρων ειδών παρόλο που για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να ξεπεραστούν αρκετά εμπόδια (Ben-Nun et al., 2011).

Τέλος, πέρα από το εύρος των εφαρμογών αυτής της τεχνολογίας και των σημαντικών θετικών αποτελεσμάτων που μπορεί να επιφέρει στον άνθρωπο πρέπει να αναφέρουμε και κάποια εμπόδια που πρέπει να εξαλειφθούν για την αύξηση της αποτελεσματικότητάς της και τη μείωση των κινδύνων που μπορεί να επιφέρει. Συγκεκριμένα, η δημιουργία τερατωμάτων από έναν μικρό αριθμό μη διαφοροποιημένων κυττάρων αποτελεί ένα βασικό πρόβλημα. Επίσης, η μη ολοκληρωμένη αποδιαφοροποίηση σωματικών κυττάρων σε iPSCs μπορεί να οδηγήσει στη μη σωστή διαφοροποίησή τους στον επιθυμητό κυτταρικό τύπο. Επιπλέον, η δημιουργία των iPSCs εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την στοιχειομετρική ισορροπία των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού. Για παράδειγμα, στα νευρικά βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν ενδογενώς Sox2, η αποτελεσματικότητα της δημιουργίας iPSCs είναι

υψηλότερη με την εξωγενή έκφραση των τριών παραγόντων πέρα του Sox2 παρά με τον συνδυασμό και των τεσσάρων παραγόντων (Eminli et al., 2008). Μια μη σωστή ισορροπία μεταξύ των τεσσάρων παραγόντων επαναπρογραμματισμού (OSKM), θα έχει σαν αποτέλεσμα το μη σωστό επαναπρογραμματισμό, τη γήρανση, ή και την απόπτωση.

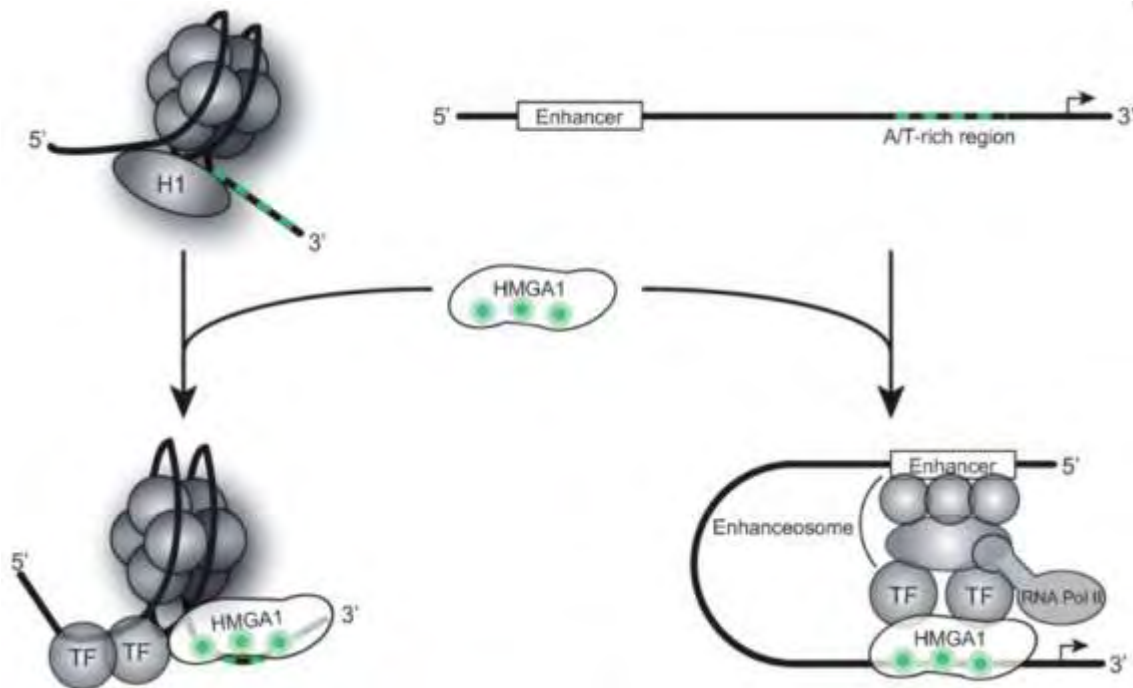
Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ HMGA1

Η οικογένεια των HMGA πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται ως ομάδα υψηλής κινητικότητας και αποτελείται από τέσσερα μέλη, τις HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου και η HMGA2 που προκύπτει από άλλο γονίδιο. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από τρεις περιοχές δέσμευσης του DNA, μέσω θηλιών πλούσιες σε AT και δρουν σε σημεία όπου η χρωματίνη έχει ανοιχτή διαμόρφωση προκαλώντας αλλαγές στην έκφραση γονιδίων. Είναι μη ιστονικές πρωτεΐνες και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα των φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος. Αυτό, επιτυγχάνεται μέσω αλλαγών στη διαμόρφωση του DNA συμμετέχοντας στη γονιδιακή ρύθμιση και όχι μέσω άμεσης μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές ανιχνεύονται δύσκολα σε φυσιολογικούς ενήλικες ιστούς καθώς εντοπίζονται σε αφθονία κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Cleynen and Van De Ven review, 2008).

Η εξωγενής υπερέκφραση της HMGA1 μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση κακοηθών επιθηλιακών όγκων ή λευχαιμίας αποκαλύπτοντας πως ίσως να διαθέτει έναν ρόλο κλειδί στην καρκινογένεση. Έτσι, αποτελεί αξιόπιστο δείκτη ώστε να χρησιμοποιηθεί στην προληπτική ιατρική καθώς τα επίπεδα έκφρασής της είναι ιδιαίτερα υψηλά σε καρκινικούς όγκους.

Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος της στην οργάνωση του ενισχυοσώματος καθώς δρα ανταγωνιστικά ως προς την συνδετική ιστόνη H1. Η H1 συνδέεται στην ίδια περιοχή του DNA με την HMGA1 και διατηρεί τη χρωματίνη συμπυκνωμένη καθιστώντας την μεταγραφικά ανενεργή. Έτσι, η HMGA1 προκαλεί αλλαγές στην δομή του DNA ώστε να ξετυλίξει την υψηλά συμπυκνωμένη χρωματίνη και να επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων. Ταυτόχρονα, οι HMGA1 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB, Sp1, NF-Y, ATF-2, c-Jun, p150, TAF3 κ.α οργανώνοντας την τοποθέτησή τους

στις περιοχές του υποκινητή και του ενισχυτή συγκεκριμένου γονιδίου ελέγχοντας έτσι την μεταγραφή του μέσω οργάνωσης του ενισχυσώματος (Yie et al., 1997, Currie, R.A 1997, Zhang et al. 1999). Ουσιαστικά, η πρόσδεση της μη ιστονικής αρχιτεκτονικής πρωτεΐνης HMGA1 κάμπει το DNA, ώστε να μπορούν στη συνέχεια να προσδεθούν οι υπόλοιποι μεταγραφικοί παράγοντες. Μετά τη συναρμολόγηση του ενισχυσώματος στον ελεύθερο από νουκλεοσώματα ενισχυτή το ενισχυσώμα οδηγεί στη συγχρονισμένη στρατολόγηση τροποποιητών της χρωματίνης και των βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον κοντινό υποκινητή (Agalioti et al., 2000). Η στρατολόγηση ολοκληρώνεται με την ολίσθηση του νουκλεοσώματος που καλύπτει τον βασικό υποκινητή και την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II για την έναρξη της μεταγραφής (Lomvardas and Thanos, 2001)(**Εικόνα 7**).



Εικόνα7: Σχηματική απεικόνιση οργάνωσης του ενισχυσώματος με τη διαμεσολάβηση της αρχιτεκτονικής, μη ιστονικής πρωτεΐνης HMGA1 (Benecke and Eilebrecht review, 2015)

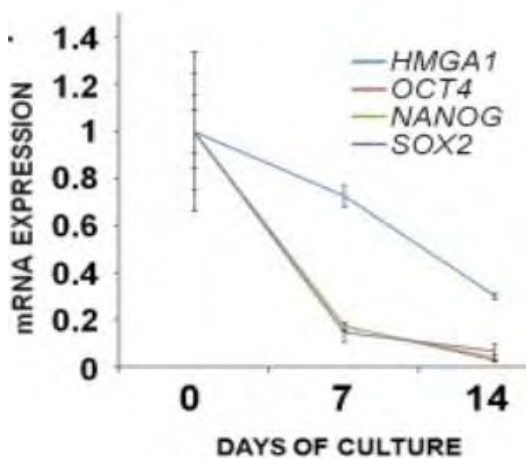
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ HMGA1 ΣΤΟΝ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟ

Μελέτες που έγιναν σε καρκινικά κύτταρα απέδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της HMGA1 σε αυτά, τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση γονιδίων που επάγουν την

ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων (Ben-Porath et al., 2008). Το γεγονός αυτό αποτέλεσε αφορμή για περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης στο πεδίο του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού με στόχο την αποκάλυψη των μεταγραφικών δικτύων που δημιουργούνται από την HMGA1 και προάγουν τη δημιουργία iPSCs από ενήλικα σωματικά κύτταρα (Shah et al., 2012).

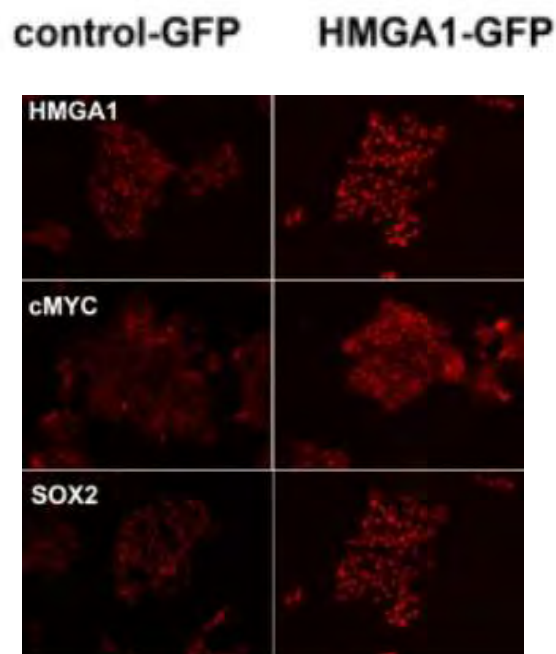
Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ESC (human ESC, hESCs) από τον Sandeep N. Shah και τους συνεργάτες του (Shah et al., 2012) απέδειξαν πως η HMGA1 παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό και στη διατήρηση των κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Συγκεκριμένα, αυξημένη έκφρασή της διαπιστώθηκε σε hESCs και iPSCs, σε ενδιάμεσα επίπεδα κυμαίνονταν η έκφρασή της σε καρκινικά κύτταρα και χαμηλή ήταν στα διαφοροποιημένα κύτταρα όπως οι ινοβλάστες. Επίσης, η HMGA1 ενισχύει τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό καθώς ταυτόχρονα παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση των hESCs. Εντυπωσιακή είναι η αλληλεπίδρασή της με τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού c-Myc, Sox2, Oct4 καθώς επάγει την έκφραση των γονιδίων τους ύστερα από πρόσδεσή της στους υποκινητές τους.

Για την απόδοση των παραπάνω συμπερασμάτων μελετήθηκε εκτενώς η έκφραση της HMGA1 σε κυτταρικές σειρές hESCs κατά τη διάρκεια διαφοροποίησής τους σε αιμοποιητικά κύτταρα. Έτσι, προέκυψε πως τα επίπεδα του mRNA της HMGA1 ήταν υψηλότερα την ημέρα 0 κατά την οποία τα κύτταρα ήταν αδιαφοροποίητα σε σύγκριση με την ημέρα 10 που είχε ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση. Επίσης, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα έκφρασής της ήταν παρόμοια με τα επίπεδα έκφρασης των πολυδύναμων παραγόντων Oct4, Sox2 και Nanog (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης της έκφρασης του mRNA της HMGA1 και των παραγόντων πολυδυναμίας κατά τη διαφοροποίηση των hESCs

Για το λόγο αυτό, πειράματα συνεχίστηκαν με την χρήση λεντιϊού ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό hESCs. Η μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά παρουσίαζε υψηλά επίπεδα έκφρασης του εξωγενούς γονιδίου της HMGA1 που σε συνδυασμό με το γονίδιο μάρτυρα GFP, χρησιμοποιήθηκε σε ποικίλες τεχνικές και επιβεβαίωσε πως η αύξηση της HMGA1 συνεπάγεται και την αύξηση των παραγόντων Sox2 και c-Myc. Ειδικότερα, η σύγκριση έγινε μεταξύ της κυτταρικής σειράς που περιγράφηκε και μιας άλλης που είχε μετασχηματιστεί μόνο για το γονίδιο GFP και εξέφραζε το ενδογενές γονίδιο για την HMGA1 (**Εικόνα 9**). Στη συνέχεια, οι κυτταρικές αυτές σειρές καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες που προάγουν τη διαφοροποίηση σε νευρικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά καθώς τα κύτταρα με την εξωγενή έκφραση της πρωτεΐνης HMGA1 παρέμειναν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση εκφράζοντας τους παράγοντες πολυδυναμίας ενώ τα κύτταρα με GFP άρχιζαν να παρουσιάζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων (Shah et al., 2012).



Εικόνα9: Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού παρουσιάζεται η έκφραση των HMGA1, c-Myc και Sox2 μέσω του δείκτη GFP μεταξύ των δύο μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών hESCs

Μέσω σίγησης του γονιδίου της HMGA1 σε κυτταρικές σειρές hESCs με την μέθοδο του shRNA καθορίστηκε ο ρόλος της στην ενίσχυση του επαναπρογραμματισμού κατά τα πρώτα κιάλια στάδια καθώς προάγει την έκφραση των πολυδύναμων γονιδίων. Η σίγηση του γονιδίου λοιπόν, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης των παραγόντων επαναπρογραμματισμού, 96 ώρες μετά. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε με siRNA σίγηση και τα επίπεδα έκφρασης των Sox2, Oct4, c-Myc και Lin28 μειώθηκαν 24 ώρες μετά. Το αποτέλεσμα αυτό, οδήγησε την ερευνητική ομάδα σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης της HMGA1. Τα γονίδια c-Myc, Sox2, Lin28 έχουν στους υποκινητές τους περιοχές πλούσιες σε AT γεγονός που υποδηλώνει πως η HMGA1 προσδένεται σε αυτές, επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών. Με αυτό τον τρόπο, η HMGA1 φαίνεται να ενισχύει την πολυδυναμικότητα των κυττάρων που επαναπρογραμματίζονται, στα πρώτα στάδια της διαδικασίας. Τέλος, πειράματα έδειξαν πως η HMGA1 παίζει ρόλο και στην μορφολογία των iPSCs καθώς βοηθά στην αύξηση των αποικιών τόσο σε αριθμό όσο και σε μέγεθος (Shah et al., 2012).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευθεί για τον ρόλο της πρωτεΐνης HMGA1 στον επαναπρογραμματισμό ανθρώπινων σωματικών κυττάρων, το εργαστήριό μας πραγματοποίησε πειράματα με στόχο τη μελέτη του ρόλου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον επαναπρογραμματισμό εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs). Συγκεκριμένα, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του προτύπου έκφρασης της HMGA1 σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια επαναπρογραμματισμού των MEFs σε χρονικό διάστημα 18 ημερών. Ειδικότερα, ανά τρεις ημέρες συλλέγουμε δείγματα από τις καλλιέργειες των MEFs ώστε να αναλύσουμε το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεϊνών. Παράλληλα, θέλουμε να μελετήσουμε τη μεταβολή της πρόσδεσης της HMGA1 κατά τον επαναπρογραμματισμό των MEFs σε γονίδια στόχους (Sox2, c-Myc).

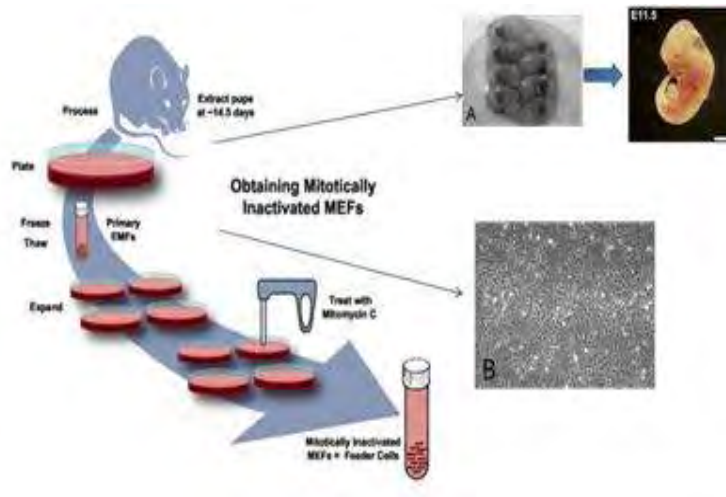
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MEFs KNOCK IN (B6.Rosa26-rtTA)

Σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Hood, Esco Class II Biohazard Safety Cabinet LA 2-4A1/ Class II Type A2), απομονώνουμε από B6.Rosa26-rtTA ποντίκι που βρίσκεται στην 14^η ημέρα κύησης (13,5 ημερών) τα έμβρυα (έξι) και τα τοποθετούμε σε τρυβλίο διαμέτρου 10cm με 10 ml, PBS (**Εικόνα 1**). Στη συνέχεια, αφαιρούμε τον αμνιακό σάκο γύρω από τα έμβρυα και μεταφέρουμε καθένα από αυτά σε ξεχωριστό τρυβλίο όπου απομακρύνουμε το κεφάλι και το ήπαρ ώστε να απομονώσουμε κύτταρα αποκλειστικά μεσοδερμικής προέλευσης.

Σε κάθε τρυβλίο, αφού πολτοποιήσουμε το υπόλοιπο έμβρυο με χρήση δύο ξυραφιών, προσθέτουμε 1ml θρυψίνη (stock: 0.5% trypsin-EDTA 10x, Gibco, 15400-054) και τα επωάζουμε στους 37°C για 3 λεπτά ώστε να διαχωριστούν καλύτερα τα κύτταρα. Έπειτα, προσθέτουμε 9ml θρεπτικό υλικό για απενεργοποίηση της θρυψίνης και φιλτράρουμε το κυτταρικό διάλυμα αρχικά με τη χρήση σύριγγας μεγάλης διαμέτρου (19G 1,10x50mm) και ομοίως με μικρότερης διαμέτρου σύριγγα (21G, 0,80x40mm) ώστε να διαλυτοποιηθούν πλήρως τα εμβρυικά μέρη. Αφού φιλτράρουμε τα κύτταρα, τα μεταφέρουμε σε νέο τρυβλίο 10cm και τα επωάζουμε στους 37°C στον επωαστικό κλίβανο (Thermo Forma Steri- Cycle, CO₂ Incubator) σε 5% διοξειδίου του άνθρακα. Μόλις η πληρότητα των κυττάρων στα τρυβλία πλησιάσει το 100%, καθένα από αυτά θα διαιρεθεί σε 4 νέα τρυβλία 10cm.

Ύστερα από 4 ημέρες, τα νέα τρυβλία παρουσιάζουν την απαιτούμενη πληρότητα σε κύτταρα (80%-100%) και στόχος μας είναι να αποθηκεύσουμε σε φιαλίδια κρυοσυντήρησης (vials) στους -80°C, περίπου 3.000.000 κύτταρα/vial σε 1ml διαλύματος με περιεκτικότητα 45% Medium, 45% FBS, 10% DMSO. Για το λόγο αυτό, επαναιωρούμε τα κύτταρα από τα τρυβλία με χρήση 3ml θρυψίνης. Ύστερα, απενεργοποιούμε την θρυψίνη προσθέτοντας 6ml θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρούμε το εναιώρημα στις 1200 στροφές για 5 λεπτά. Τέλος, επαναδιαλύουμε την πελέτα των κυττάρων σε 1ml διαλύματος με την παραπάνω περιεκτικότητα και παγώνουμε τα κύτταρα σε vials στους -80°C.



Εικόνα 1: Η διαδικασία επίστρωσης MEFs από πρώιμα εμβρυϊκά κύτταρα

Θρεπτικό υλικό των MEFs Κ.Ι κυττάρων (15% FBS)

- 500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma, D6429)
- 88 ml FBS (15% τελική συγκέντρωση)
- 6.1 ml μίγμα αντιβιοτικών Πενικιλίνης – Στρεπτομυκίνης (Gibco, 15140-122)
- 6.1 ml GlutaMax 100x (Gibco, 35050-38)
- 6.1 ml MEM NEAA 100x (Gibco, 1140-035)
- 1.8 μ L β -μερκαπτοαιθανόλη 14,3M (Applichem, A1108-0100)

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 (τελικό pH: 7.4)

ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ MEFs

Για τη μελέτη του επαναπρογραμματισμού MEFs ανά 3 ημέρες σε χρονικό διάστημα 18 ημερών, θέλουμε να επιστρώσουμε σε 7 τρυβλία των 10cm, 500.000 κύτταρα/τρυβλίο ώστε να συλλέξουμε από κάθε ημέρα πελέτες 200.000 (x2 δείγματα) και 50.000 (x2 δείγματα) κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για απομόνωση RNA και πρωτεϊνών αντίστοιχα.

Αρχικά, ξεπαγώνουμε 4 φιαλίδια κρυοσυντήρησης (vials) MEFs K.I κυττάρων του 1ml, τα αναμιγνύουμε με 8ml θεραπετικό υλικό και φυγοκεντρούμε στις 1200 στροφές για 5 λεπτά. Στόχος μας είναι η απομάκρυνση του DMSO και η επαναδιάλυση της πελέτας κυττάρων σε 10ml θεραπετικό υλικό. Εν συνεχεία, επιστρώνουμε το εναιώρημα των κυττάρων σε 10cm τρυβλίο, επωάζουμε στους 37° C, 5% διοξείδιο του άνθρακα, 95% αέρα.

Ύστερα από 4 ημέρες, η πληρότητα του τρυβλίου είναι περίπου 80% και μπορούμε να επιστρώσουμε τα τρυβλία που θα χρειαστούμε για το πείραμα μελέτης του επαναπρογραμματισμού. Συγκεκριμένα, ξεκινάμε μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων που έχουμε στο τρυβλίο μας ως εξής: Ξεπλένουμε τα κύτταρα (βρίσκονται προσκολλημένα στη βάση του τρυβλίου) 2 φορές με 10ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS. Προσθέτουμε 3ml θρυψίνη για 5 λεπτά και έπειτα την απενεργοποιούμε με 6ml θεραπετικό υλικό. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 1200rpm και επαναδιαλύουμε την κυτταρική πελέτα σε 10 ml θεραπετικό υλικό. Έπειτα, με τη χρήση του κυτταρόμετρου Neubauer (**Εικόνα 2**) υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων καθώς και το συνολικό αριθμό των κυττάρων στα 10ml. Σύμφωνα με αυτή τη μέτρηση απομονώνουμε σε tubes των 1,5ml την ποσότητα που αντιστοιχεί σε 200.000 και 50.000 κύτταρα. Έπειτα, φυγοκεντρούμε τα δείγματά μας στους 4°C, στις 3.000rpm για 5 λεπτά και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αφαιρούμε το υπερκείμενο. Τέλος, αποθηκεύουμε τις πελέτες των κυττάρων στους -80 °C και ορίζουμε τη μέρα αυτή ως ημέρα 0 του επαναπρογραμματισμού.

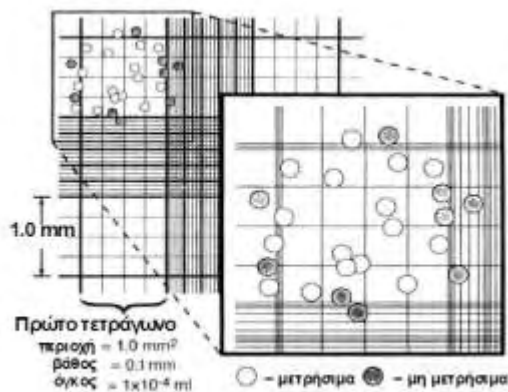
Στη συνέχεια, επιστρώνουμε 500.000 κύτταρα σε 8 τρυβλία 10cm που αντιστοιχούν στις υπόλοιπες ημέρες συλλογής δειγμάτων (ημέρα 3, 6, 9, 12, 15 και 18) Επιπλέον, προσθέτουμε τον αντίστοιχο όγκο θεραπετικού ώστε τελικά να έχουμε όγκο 10 ml σε κάθε τρυβλίο και 1μL δεοξυκυκλίνη/ml θεραπετικού (έναρξη έκφρασης κασέτας επαναπρογραμματισμού). Επωάζουμε στους 37° C , σε αέρα 95% και 5% CO₂ .

Κάθε δύο ημέρες μεταξύ του διαστήματος των 18 ημερών αντικαθιστούμε το θεραπετικό υλικό που είναι ενισχυμένο με δεοξυκυκλίνη με φρέσκο και κάθε τρεις ημέρες συλλέγουμε τις πελέτες των 200.000 και των 50.000 κυττάρων που θα χρησιμοποιήσουμε μετέπειτα για απομόνωση RNA και πρωτεϊνών αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ανά τρίήμερο επαναλαμβάνεται η εξής διαδικασία: Προσθέτουμε στο τρυβλίο που επιθυμούμε 5 ml PBS, το απορρίπτουμε, προσθέτουμε 3ml θρυψίνη για 5 λεπτά και την απενεργοποιούμε με 6ml θεραπετικό. Έπειτα,

φυγοκεντρούμε στις 1.200 rpm για 5 λεπτά και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε τόσο όγκο κάθε φορά ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων μέσω της Neubauer. Αφού υπολογίσουμε την κατάλληλη ποσότητα που θα περιέχει 200.000 και 50.000 κύτταρα αντίστοιχα, την μεταφέρουμε σε tubes των 1,5ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 3.000 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου θρεπτικού μετά το πέρας της φυγοκέντρησης. Τέλος, αποθηκεύουμε τις πελέτες στους -80°C για τα δείγματα 0,3,6,9,12,15,18 ημερών (η ημέρα 0 που έχει προηγηθεί είναι η 1^η ημέρα επίστρωσης των τρυβλίων και προσθήκης δεοξυκυκλίνης σε αυτά).

ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ Neubauer

Είναι η πιο απλή, άμεση και οικονομική μέθοδος μέτρησης κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Το κυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δυο κατάλληλα επεξεργασμένες, γυαλισμένες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 αρχικά τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (εμβαδόν 1 mm²). Κάθε τετράγωνο ορίζεται από τρεις παράλληλες και πολύ κοντινές γραμμές (των οποίων η μεταξύ τους απόσταση είναι 2,5 μm), που χρησιμεύουν για τον καθορισμό του αν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα. Επίσης, κάθε ένα από τα αρχικά τετράγωνα, έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα από δυο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης γυαλισμένης επιφάνειας και των σημείων όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα και με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.



Εικόνα 2 : Κυτταρόμετρο Neubauer – Σχηματική απεικόνιση και υπολογισμός κυττάρων.

Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι $0,1 \text{ mm}^3$ ($1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$) ή $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$. Μετά από καλό πιπετάρισμα του εναιωρήματος κυττάρων προσθέτουμε 10 μl σε κάθε σταυρό του κυτταρομέτρου. Μετράμε τον αριθμό των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα γύρω από τον σταυρό και υπολογίζουμε τον μέσο όρο. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ml) προκύπτει αν πολλαπλασιάσουμε τον μέσο όρο των κυττάρων που υπολογίσαμε από τη μέτρηση στα τετράγωνα με το 10.000. Αφού γνωρίζουμε την συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα, μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα κυττάρων που επιθυμούμε να χρησιμοποιήσουμε από αυτό για την υλοποίηση των επόμενων βημάτων του πειράματός μας.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA (RNA isolation)

Η απομόνωση του RNA από πελέτες 200.000 κυττάρων πραγματοποιείται στα δείγματα που αποθηκεύσαμε από τη μελέτη του επαναπρογραμματισμού στα MEFs K.I κύτταρα για τις ημέρες 0,3,9,12,15 και 18. Στόχος μας είναι η δημιουργία cDNA και έπειτα η μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR).

Αφού ξεπαγώσουμε τα δείγματά μας, επαναδιαλύουμε κάθε πελέτα κυττάρων σε 500 μL Trisol μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως. Έπειτα, χτυπάμε ήπια με τα δάχτυλά μας τα tubes ώστε να ανακατευτεί το περιεχόμενο, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 100 μL χλωροφόρμιο και αναδεύουμε ήπια (χωρίς vortex). Τοποθετούμε τα δείγματά μας για φυγοκέντρηση στους 4°C, για 15 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (13.000rpm) . Συνεχίζοντας, μεταφέρουμε την υδατική πάνω φάση από κάθε δείγμα, σε νέα tubes και προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Τοποθετούμε τα δείγματά μας για φυγοκέντρηση στους 4°C, για 15 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και πλύση της πελέτας με 250 μL 75% αιθανόλη. Στη συνέχεια, τοποθετούμε τα δείγματά μας για φυγοκέντρηση στους 4°C, για 15 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα, αφαιρούμε την αιθανόλη και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει για 5 λεπτά. Τέλος, επαναδιαλύουμε κάθε πελέτα σε 21 μL H₂O το οποίο είναι απαλλαγμένο από RNAσες.

Χρησιμοποιούμε 1μL από κάθε δείγμα μας για να υπολογίσουμε μέσω του φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (Nanodrop, Thermo Scientific) την ποσότητα του συνολικού RNA ανά δείγμα σε ng/μL.

Αφού ολοκληρώσουμε τη μέτρηση, υπολογίζουμε την συνολική ποσότητα RNA σε κάθε δείγμα των 20μL και από αυτή χρησιμοποιούμε 2μg RNA το οποίο επωάζουμε με DNAση ώστε να αποικοδομήσουμε τις υπολείμματα DNA που υπάρχουν στα δείγματά μας. Πιο ειδικά, προσθέτουμε σε κάθε δείγμα: 1μL DNAση (Roche), 6μL 10x buffer της DNAσης, 1μL περιοριστικό ένζυμο Hae III (BioLab, #R0108) και συμπληρώνουμε με H₂O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης για κάθε δείγμα να είναι 60μL. Έπειτα, επωάζουμε τα δείγματά μας στους 37°C για 1 ώρα. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, κάνουμε ήπιο vortex στα δείγματά μας.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του RNA και της επώασης με DNAση, χρησιμοποιούμε το NucleoSpin RNA II kit της Macherey-Nagel για τον καθαρισμό των δειγμάτων RNA από τα θραύσματα του DNA. Η διαδικασία σύμφωνα με το εγχειρίδιο του kit πραγματοποιείται ως εξής:

- Προσθέτουμε στα δείγματά μας τόσο απεσταγμένο H₂O (απαλλαγμένο από DNAσες και RNAσες) ώστε ο τελικός τους όγκος να είναι 100μL/δείγμα.
- Ύστερα, για κάθε δείγμα προετοιμάζουμε μίγμα με 300 μL Buffer RA1 και 300 μL 100% αιθανόλη και το προσθέτουμε.
- Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες κολώνες με το φίλτρο που κατακρατά το RNA, προσθέτουμε σε αυτές τα 700 μL του κάθε δείγματος και φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000 g. Απομακρύνουμε το απόσταγμα.
- 1^η πλύση: 200 μL / δείγμα Buffer RA2 και φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000 g. Απομακρύνουμε το απόσταγμα.
- 2^η πλύση: 600 μL / δείγμα Buffer RA3 φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000 g. Απομακρύνουμε το απόσταγμα.

3^η πλύση: 250 μ L / δείγμα Buffer RA3 και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 11.000 g. Απομακρύνουμε το απόσταγμα.

- Η τελική έκλουση του RNA πραγματοποιείται στα 40 μ L / δείγμα απεσταγμένο H₂O (απαλλαγμένο από DNAσες και RNAσες). Προσθέτουμε την ποσότητα του H₂O στην κολώνα κάθε δείγματος και φυγοκεντρούμε στα 11.000 g για 1 λεπτό.
- Τέλος, μέσω του φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (Nanodrop, Thermo Scientific) υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση των δειγμάτων μας σε RNA.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η πρότυπη μέθοδος για τον διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, στο οποίο τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο ενώ τα θετικά μόρια μεταναστεύουν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος σχηματίζει πήκτωμα με πόρους, των οποίων η διάμετρος κυμαίνεται από 100nm έως 300nm. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα και κατά συνέπεια η παράμετρος αυτή καθορίζει το εύρος των κλασμάτων DNA που μπορεί να διαχωριστούν.

Ηλεκτροφορούμε τα δείγματα RNA σε 2% w/v πήκτωμα αγαρόζης για να ελέγξουμε την ποιότητα τους (αν έχουν αποικοδομηθεί). Τόσο το πήκτωμα όσο και το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης έχει παρασκευασθεί από TBE ρυθμιστικό διάλυμα (5x TBE 4 lt: 216 g Tris, 110 g βορικό οξύ και 14,9 g EDTA). Το TBE είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που επιτρέπει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου του πηκτώματος όταν ασκηθεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού στα άκρα του. Ζυγίζουμε την ποσότητα της αγαρόζης και την διαλυτοποιούμε στο ρυθμιστικό διάλυμα υπό την επίδραση θέρμανσης. Επίσης, προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide Solution 1%, Biochemica) 1:20.000 στο gel και 1:40.000 στο buffer, για να γίνει ορατό το RNA ύστερα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Αδειάζουμε το ρευστό διάλυμα της αγαρόζης στο εκμαγείο του πηκτώματος στο οποίο έχουμε τοποθετήσει τα χτένια ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Μόλις,

δημιουργηθεί το πήκτωμα, γεμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης 1X TBE. Πριν φορτώσουμε τις επιθυμητές ποσότητες των δειγμάτων στο gel, προσθέτουμε σε αυτά χρωστική ώστε να είναι διακριτά και λόγω της γλυκερόλης να κατακρημνιστεί το υλικό μας στα πηγαδάκια. Τέλος, τα δείγματα μετακινούνται από τα αρνητικά προς τα θετικά ηλεκτρόδια έχοντας ρυθμίσει τη συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 120 volts. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, φωτογραφίζουμε το πήκτωμά μας με τη χρήση ειδικής λάμπας UV.

RT- PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής)

Ο συνδυασμός της αντίστροφης μεταγραφής με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει την σύνθεση αντιγράφων cDNA. Το πρώτο βήμα είναι η ενζυμική μετατροπή του RNA σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφάση βάσει του εξής πρωτοκόλλου:

Αρχικά, προσθέτουμε σε 1 µg RNA / δείγμα, 1 µL εκκινητή oligodT με συγκέντρωση 0,5 µg/µL και 1 µL dNTPs συγκέντρωσης 10 mM. Συμπληρώνουμε με ddH₂O σε κάθε δείγμα ώστε η τελική μας αντίδραση να έχει συνολικό όγκο 12 µL. Ο εκκινητής oligodT υβριδοποιείται επιλεκτικά με τις πολυαδενυλιωμένες ουρές των mRNA μορίων (πολυ-A ουρές). Έτσι, τα παραγόμενα cDNA προέρχονται κυρίως από αγγελιοφόρο RNA και όχι από ριβοσωμικό ή μεταφορικό RNA. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 65° C (Πίνακας 1). Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα διαμοιράζουμε 8 µL από το mix που παρασκευάσαμε με τα εξής συστατικά / δείγμα: 4 µL 5x Buffer SuperScript, 2 µL DTT (0,1 M), 1µL ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript (Invitrogen,200 units) και 1 µL ddH₂O.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
65° C	5 λεπτά
4° C	5 λεπτά
42° C	52 λεπτά
70° C	15 λεπτά
4° C	Επ'άοριστον

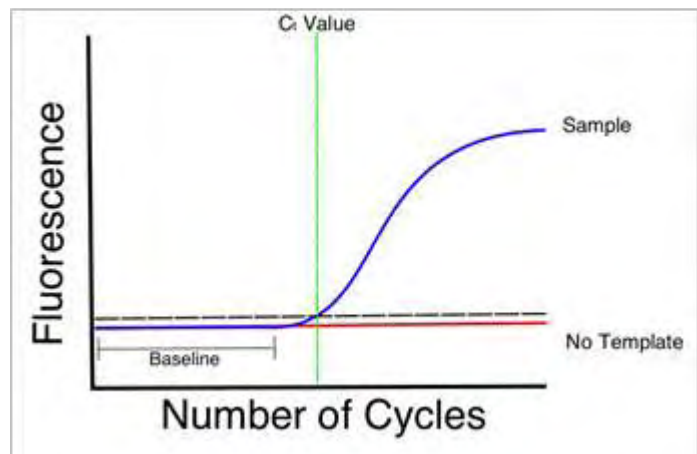
Πίνακας1: Συγκεντρωτικά, το πρωτόκολλο διεξαγωγής της Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR) που ακολουθήσαμε.

REAL TIME PCR (PCR πραγματικού χρόνου)

Η PCR πραγματικού χρόνου ή αλλιώς ποσοτική PCR (quantitative PCR, qPCR) είναι η πιο σύγχρονη μέθοδος για την ακριβή ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων αφού επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων DNA και RNA. Η real-time PCR μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι-σήμα φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green, μίας χρωστικής η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα) καθορίζει σε ποιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct) (**Εικόνα 3**). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA. Όσο πιο πολλούς κύκλους θέλει ένα τμήμα DNA για να ενισχυθεί, τόσο λιγότερο είναι σε σύγκριση με άλλα τμήματα που εκπέμπουν φθορισμό σε λιγότερους κύκλους.

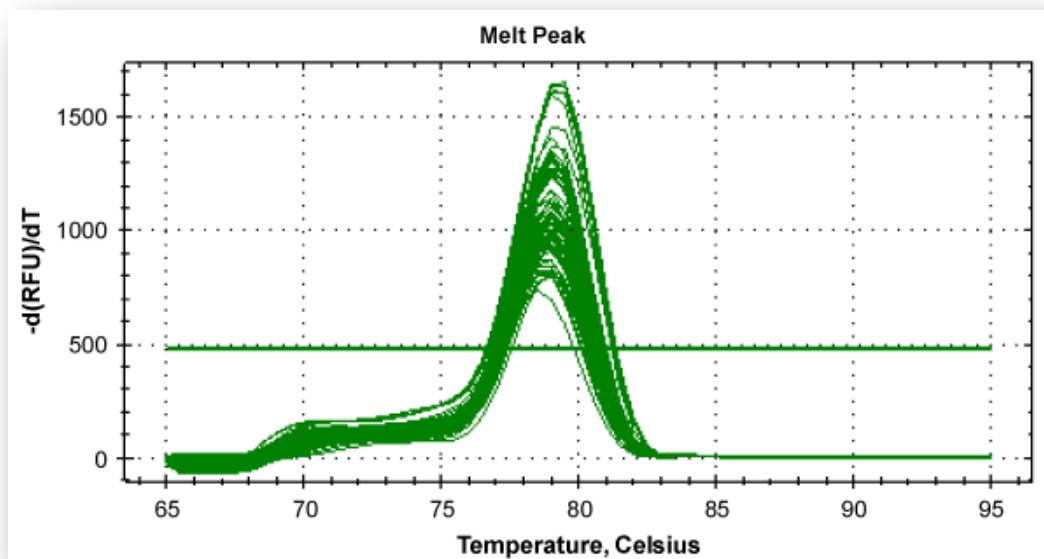
Επιπρόσθετα, η PCR πραγματικού χρόνου μας δίνει τη δυνατότητα να διακρίνουμε την ειδικότητα του νεοσυντιθέμενου DNA προϊόντος. Αυτό συμβαίνει, διότι μετά την ολοκλήρωσή

της μπορούμε να προγραμματίσουμε το μηχάνημα ώστε να μας δώσει το αποτέλεσμα της καμπύλης τήξης (Melting Curve), (**Εικόνα 4**) μέχρι τους 95° C λόγω της σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλιωνα μόρια DNA αποδιατάσσονται προσωρινά, με συνέπεια τη μείωση του φθορισμού. Το πρόγραμμα υπολογίζει το λόγο διαφοράς στις



Εικόνα 3 : Σχηματική απεικόνιση των βασικών παραμέτρων για τον υπολογισμό των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου.

σχετικές μονάδες φθορισμού (RFU) με το χρόνο (T) στον άξονα y προς τη θερμοκρασία στον άξονα x. Η κορυφή της καμπύλης μας δείχνει την θερμοκρασία τήξης του προϊόντος, T_m . Έτσι



Εικόνα 4: Καμπύλη τήξεως (Melting Curve) στη Real-Time PCR.

λοιπόν, στην ανάλυση οτιδήποτε παρατηρήσουμε εκτός της καμπύλης είναι παραπροϊόν που μπορεί να οφείλεται σε μόλυνση του δείγματος ή λόγω σχηματισμού διμερών των εκκινητών.

Για να εξετάσουμε συγκεκριμένα γονίδια, σε κάθε δείγμα προσθέτουμε τα εξής απαραίτητα συστατικά για την πειραματική διαδικασία:

- 6 μL δείγματος (στην παρούσα: cDNA)
- 10 μL 2X SYBR Green KAPA mix (Kapa Biosystems, KM2602)
- 1 μL mix εκκινητών (forward και reverse) ειδικών για το επιθυμητό γονίδιο
- 3 μL H_2O

Τοποθετούμε τα δείγματά μας στον θερμοκυκλοποιητή και ορίζουμε το επιθυμητό πρωτόκολλο, μέσω του H/Y που είναι συνδεδεμένη η PCR πραγματικού χρόνου, το οποίο περιλαμβάνει την εκάστοτε θερμοκρασία δράσης των εκκινητών των διαφόρων γονιδίων ή συνδυασμό θερμοκρασιών για την ταυτόχρονη μελέτη διαφορετικών γονιδίων (για παράδειγμα

του γονιδίου στόχου και του housekeeping γονιδίου που λειτουργεί ως θετικό control) . Το πρόγραμμα που χρησιμοποιούμε περιγράφεται στον (Πίνακα 2Α):

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1. 95°C	5 λεπτά	Προ-θέρμανση
2. 95°C	15 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
3. 60-70°C (TM)	20 δευτερόλεπτα	Πρόσδεση εκκινητών
4. TM- 95°C	5 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη, δημιουργία καμπυλών τήξεως

Πίνακας 2 Α: Συγκεντρωτικός πίνακας προγράμματος Real-Time PCR. Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών εξαρτάται από τους ίδιους εκκινητές και διαφέρει κάθε φορά. Το βήμα 2 επαναλαμβάνεται 39 φορές.

Ειδικότερα, οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες των εκκινητών (forward και reverse) για τα γονίδια που εξετάσαμε στην παρούσα εργασία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα: (Πίνακας 2B)

<i>Hmga1</i>, 62° C	Fw: GTGAGTCCTGGGACGGCG Rv: AGAGGACTCCTGGGAGATGC
<i>Gapdh</i>, 62° C	Fw: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA Rv: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
<i>Oct4</i>, 64° C	Fw: AGAGTATGAGGCTACAGG Rv: AGCTCCAGGTCTCTTGTCTA

Πίνακας 2B : Συγκεντρωτικός πίνακας με τις αλληλουχίες και τις θερμοκρασίες πρόσδεσης των εκκινητών κάθε γονιδίου που μελετήσαμε.

ΣΤΥΠΙΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Κατά των επαναπρογραμματισμό των MEFs K.I. κυττάρων συλλέξαμε πελέτες των 50.000 κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση στοχευμένων πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής Western blot.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελεί την δημοφιλέστερη μέθοδο ποσοτικοποίησης και διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός δείγματος. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (MBA). Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Γενικά, όσο πιο μικρή είναι η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης τόσο μεγαλύτεροι πόροι δημιουργούνται στο πήκτωμα και αντιστρόφως.

Η πιο συχνή μέθοδος ηλεκτροφόρησης είναι αυτή που πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος (SDS-PAGE). Το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και προσδίδει σε αυτές αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα με αποτέλεσμα οι μικρότερες πρωτεΐνες να μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό ηλεκτρόδιο και οι μεγαλύτερες πιο αργά.

Για την παρασκευή του πηκτώματος ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

- Επιλέγουμε τα τζάμια με το επιθυμητό πάχος (1,5 mm) και τα αντιστοίχου πάχους χτένια με τον αριθμό θέσεων που επιθυμούμε (10 θέσεις) και τα τοποθετούμε στην κατάλληλη θήκη.
- Παρασκευάζουμε το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες μας. Για τον σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών που θα μελετήσουμε η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης του πηκτώματος ήταν $14\%^{w/v}$. (Πίνακας 3)
- Αφού προσθέσουμε το διάλυμα στο εσωτερικό των τζαμιών, πριν πολυμεριστεί, αποχύνουμε πάνω από αυτό 0.5 mL ισοπροπανόλη ώστε να ευθυγραμμίσουμε το

πήκτωμα και να το απαλλάξουμε από τυχόν φυσαλίδες. Αφού πολυμεριστεί, αφαιρούμε την ισοπροπανόλη και προχωράμε στην παρασκευή του πήκτωματος πακεταρίσματος (**Πίνακας 3**) το οποίο δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

- Στη συνέχεια, αφού το αποχύσουμε στο εσωτερικό των τζαμιών, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, αμέσως τοποθετούμε τα χτένια και το αφήνουμε να πολυμεριστεί.

Πήκτωμα διαχωρισμού (7.5 mL)	Πήκτωμα πακεταρίσματος (3.75 mL)
3.5 mL Acrylamid 30% ^{w/v} (Sigma, A3574)	625.5 μ L Acrylamid 30% ^{w/v} (Sigma, A3574)
2 mL ddH ₂ O	2.62 mL ddH ₂ O
1.85 mL 1.5M Tris-HCl pH 8.8	468 μ L 1M Tris-HCl pH 6.8
37.5 μ L 20% SDS	18.75 μ L 20% SDS
30 μ L 10% APS	11.25 μ L 10% APS
15 μ L TEMED (Applichem)	7.5 μ L TEMED (Applichem)

Πίνακας 3: Σύσταση πήκτωμάτων διαχωρισμού και πακεταρίσματος.

Παρασκευάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (EL) σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL, προσθέτοντας 100 mL 10x EL (**Πίνακας 4**), 5 mL 20% SDS και 895 mL d H₂O. Πριν φορτώσουμε τα δείγματά μας, ξεπλένουμε τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων και ηλεκτροφορούμε το πήκτωμα στα 120 volts για 15 λεπτά. Ταυτόχρονα, έχουμε επαναδιαλύσει τα δείγματά μας σε 40 μ L/ δείγμα διάλυμα RIPA (**Πίνακας 5**) ως εξής: Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος, 5 λεπτά στον πάγο, έντονο vortex, 5 λεπτά στον πάγο. Ύστερα, προσθέτουμε 10 μ L 5x Loading dye (**Πίνακας 5**) / δείγμα η οποία περιέχει μερκαπτοαιθανόλη, που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεινών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με 10 λεπτά βρασμό των δειγμάτων στους 98°C. Στη συνέχεια, φορτώνουμε στο πήκτωμα τα δείγματα καθώς

και 7 μL πρωτεϊνικό μάρτυρα (Page Ruler Prestained Protein Ladder) για να μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος των πρωτεϊνών. Τέλος, ηλεκτροφορούμε στα 120 V μέχρι να περάσουν τα δείγματα το πήκτωμα πακεταρίσματος και στη συνέχεια ρυθμίζουμε την τάση στα 150V όπου γίνεται η ηλεκτροφόρηση κατά μήκος του πηκτώματος διαχωρισμού.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση παρασκευάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL προσθέτοντας τα εξής: 200 mL Methanol, 100 mL 10x Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (**Πίνακας 4**), dH₂O 698 mL , 2 mL 20% SDS.

10x EL (1L)	10X ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ (1L)
30.3g Tris base	30.3g Tris base
144g glycine	144g glycine

Πίνακας 4: Σύσταση διαλυμάτων 10x EL και 10x Ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς

Σε γυάλινο πιπέρι που έχουμε προσθέσει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, τοποθετούμε το πήκτωμα πάνω στο οποίο έχει εφαρμοστεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ανάμεσα σε τέσσερα διηθητικά χαρτιά Whatman που έχουν εμποτιστεί με το διάλυμα, μέσα στην ειδική θήκη μεταφοράς. Έπειτα, τοποθετούμε παγοκύστη στη συσκευή για να αποφύγουμε την υπερθέρμανση, προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζουμε τη τροφοδοτική συσκευή στα 300mA, στα 120 V για 55 min.

Διάλυμα RIPA	5x Loading dye
50 mM Tris-HCl pH: 7.4	5% β-μερκαπτοαιθανόλη
1% NP-40	0.02% μπλε της βρωμοφαινόλης
0,5% Na-deoxycholate	30% γλυκερόλη
0,1% SDS	10% SDS
150 mM NaCl	250 mM pH: 6.8 Tris-HCl
2 mM EDTA	
50 mM NaF	

Πίνακας 5:
Σύσταση
διαλύματος RIPA,
5xLoading dye

Δέσμευση μη ειδικών θέσεων για το αντίσωμα (blocking)

Συνεχίζουμε τη διαδικασία αφού ελέγξουμε ότι η μεταφορά πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με την εμφάνιση των ζωνών του πρωτεϊνικού μάρτυρα στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, παρασκευάζουμε 5% w/v γάλα / PBST (PBS, 0.1% Tween 20) το οποίο δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις στις οποίες μπορεί να δεσμευθεί το αντίσωμα. Τοποθετούμε τη μεμβράνη στο 5% w/v άπαχο γάλα (Applichem, Non-fat dried milk powder) και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.

Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος

Παρασκευάζουμε 1% w/v άπαχο γάλα διαλυμένο σε PBST και προσθέτουμε σε αυτό το πρώτο αντίσωμα που είναι ειδικό για την κάθε πρωτεΐνη που μελετάμε (a-HMGA1: Santa Cruz, SC-8982, και GAPDH: Ambion, AM4300) Έπειτα, κόβουμε τη μεμβράνη στις περιοχές που περιμένουμε να βρίσκονται οι πρωτεΐνες που μελετάμε και επωάζουμε τη κάθε μεμβράνη με το αντίστοιχο αντίσωμά της υπό ανάδευση, στους 4°C για 16 ώρες.

Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος

Πριν την προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος είναι απαραίτητες οι πλύσεις κάθε μεμβράνης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, με 10mL PBST για 10 λεπτά (μία επανάληψη) και 5 λεπτά πλύση με 10mL PBST (τρεις επαναλήψεις). Στη συνέχεια, παρασκευάζουμε 1% w/v άπαχο γάλα σε PBST στο οποίο προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα (για a-HMGA1: HRP goat-a-rabbit, Invitrogen και για GAPDH: goat-a-mouse, Invitrogen) το οποίο προέρχεται από διαφορετικό οργανισμό από αυτόν από τον οποίο έχουμε απομονώσει τις πρωτεΐνες και είναι ειδικό για τη βαρεία αλυσίδα του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Επωάζουμε τις μεμβράνες με το δεύτερο αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση.

Διαδικασία εμφάνισης σε φιλμ

Σε αυτό το στάδιο, ξεκινάμε κάνοντας τα ίδια βήματα για τις πλύσεις κάθε μεμβράνης που πραγματοποιήσαμε πριν την προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος. Μετά την ολοκλήρωσή τους, προσθέτουμε σε κάθε μεμβράνη 1 mL από το μείγμα φθορισμού ECL (H₂O₂ και Lumipol) και

το αφήνουμε για 1 λεπτό στο σκοτάδι. Το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (HRP) είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η λουμινόλη (Luminol) είναι ο δότης ηλεκτρονίων και οξειδώνεται. Η διεγερμένη λουμινόλη μεταπίπτει σε σταθερή κατάσταση μετά την εκπομπή φωτονίων. Το μείγμα αυτό λειτουργεί ως υπόστρωμα για το HRP ένζυμο με αποτέλεσμα να παράγει φως στις περιοχές όπου υπάρχει ο συνδυασμός 1^{ου} αντισώματος-2^{ου} αντισώματος (+HRP) και ECL. Στραγγίζουμε την περίσσεια του ECL και καλύπτουμε την νιτροκυτταρίνη με ζελατίνη αφού την έχουμε μεταφέρει στην κασετίνα εμφάνισης. Ολοκληρώνουμε τη διαδικασία εμφάνισης στο dark room όπου καλύπτουμε την νιτροκυτταρίνη με το φιλμ εμφάνισης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο στη συνέχεια το τοποθετούμε στο μηχάνημα εμφάνισης.

ΧΡΩΣΗ ΓΙΑ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (alkaline phosphatase staining)

Η αλκαλική φωσφατάση εκφράζεται στην επιφάνεια πολυδύναμων κυττάρων και μέσω της τεχνικής αυτής μπορούμε να τα ανιχνεύσουμε στα τρυβλία όπου έχουμε επαναπρογραμματίσει κύτταρα MEFs K.I. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για κάθε τρυβλίο είναι το εξής: Ξεκινάμε την τεχνική, αφαιρώντας το θρεπτικό μέσο από τα τρυβλία και ξεπλένοντας κάθε τρυβλίο με 5 mL PBS. Έπειτα, προσθέτουμε 4 mL 4% Φορμαλδεΐδη για την μονιμοποίηση των κυττάρων, για 10 λεπτά στους 4° C. Αφαιρούμε την Φορμαλδεΐδη και ξεπλένουμε μία φορά με 5 mL PBS. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 5 mL NTMT ρυθμιστικού διαλύματος (**Πίνακας 6**) υπό ανάδευση για 5 λεπτά και επαναλαμβάνουμε το βήμα αυτό άλλες δύο φορές.

NTMT ρυθμιστικό διάλυμα

(100 mL)

10 mL 1M NaCl

10 mL 1M Tris-HCl pH: 9.5

5 mL MgCl₂·H₂O

1 mL 10% Tween20

Πλήρωση με dH₂O

Πίνακας 6: Σύσταση NTMT ρυθμιστικού διαλύματος

Συνεχίζουμε, προσθέτοντας 4 mL NTMT+NBT/BCIP, που είναι το υπόστρωμα χρώσης των αποικιών και καλύπτουμε τα τρυβλία με αλουμινόχαρτο καθώς η αντίδραση είναι φωτοευαίσθητη. Επωάζουμε υπό ανάδευση γύρω στα 5-7 λεπτά έως ότου χρωματιστούν μωβ οι αποικίες. Έπειτα, αφαιρούμε το διάλυμα χρώσης και ξεπλένουμε με 5 mL PBS ή NTMT ρυθμιστικό διάλυμα τρεις φορές υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Τα τρυβλία είναι έτοιμα να φωτογραφηθούν και στη συνέχεια να αποθηκευτούν στους 4° C ύστερα από προσθήκη 10 mL, PBS.

ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Για τη μελέτη της πρόσδεσης της HMGA1 πρωτεΐνης στο γονιδίωμα του ποντικού και του τρόπου ρύθμισης των γονιδίων που συμμετέχουν στον επαναπρογραμματισμό των MEFs, επιστρώνουμε σε 2 τρυβλία των 15 cm 3x10⁶ MEFs KI κύτταρα και τα επωάζουμε σε θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 15% FBS στους 37° C, 5% διοξείδιο του άνθρακα, 95% αέρα. Ύστερα από 4 ημέρες, και ενώ τα τρυβλία έχουν πληρότητα περίπου 90% (18x10⁶ κύτταρα), προσθέτουμε σε κάθε τρυβλίο φορμαλδεϋδη τελικής συγκέντρωσης 1% $\frac{v}{v}$ και τα επωάζουμε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η προσθήκη φορμαλδεϋδης συμβάλει στη μονιμοποίηση των κυττάρων και κατ' επέκταση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών με τη χρωματίνη. Η διαδικασία της μονιμοποίησης διακόπτεται με την προσθήκη γλυκίνης τελικής συγκέντρωσης 125mM και ανάδευση των τρυβλίων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, απορρίπτουμε το θρεπτικό υλικό των τρυβλίων, ξεπλένουμε τα κύτταρα 2 φορές με PBS, τα επαναιωρούμε σε 10ml PBS, τα συλλέγουμε σε κωνικό φιαλίδιο (falcon) των 15 ml και τα φυγοκεντρούμε σε 4.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.

Έπειτα, απορρίπτουμε το υπερκείμενο, επαναιωρούμε την κυτταρική πελέτα σε 5ml διαλύματος λύσης (**Πίνακας 7**), επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρούμε σε 4.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης έχουμε ως ίζημα τους πυρήνες των κυττάρων τους οποίους και ξεπλένουμε 2 φορές με 2ml διαλύματος πλύσης (**Πίνακας 7**) φυγοκεντρώντας μετά από κάθε πλύση σε 4.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Εν συνεχεία, ξεπλένουμε την πυρηνική πελέτα, χωρίς να την επαναιωρήσουμε, με 2ml διαλύματος κατακερματισμού και τελικώς την επαναδιαλύουμε σε 1ml από το ίδιο διάλυμα.

Συνεχίζοντας, κατακερματίζουμε την χρωματίνη μέσω της συσκευής παραγωγής υπερήχων (Covaris S220) σε σωληνάριο χωρητικότητας 1ml (AFA™) για 12 λεπτά (ένταση 5,

μέγιστη ισχύς 175Watt) καταλήγοντας σε θραύσματα χρωματίνης μήκους 200-500 ζευγών βάσεων. Ακολούθως, μεταφέρουμε την κατακερματισμένη χρωματίνη σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5ml και φυγοκεντρούμε σε 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Απορρίπτουμε την πελέτα που αποτελείται από θραύσματα DNA μεγάλου μεγέθους καθώς και πυρηνικά θραύσματα και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο στο οποίο και προσθέτουμε Triton X-100 και NaCl τελικής συγκέντρωσης 1% $\frac{v}{v}$ και 150mM αντιστοίχως. Έπειτα, διαμοιράζουμε το δείγμα μας σε 2 σωληνάρια (500μl) και μεταφέρουμε επιπλέον 5l (input) σε άλλο σωληνάριο το οποίο και αποθηκεύουμε στους -80°C. Προσθέτουμε 2μg α -HMG (sc8982, Santa Cruz) αντισώματος στο ένα σωληνάριο που περιέχει 500μl δείγματος και 2μg Ανοσοσφαιρίνης Γ (IgG, sc-2027, Santa Cruz) στο άλλο σωληνάριο. Τα δείγματα αυτά τα αναδεύουμε σε κυκλικό ρότορα στους 4°C για 16 ώρες.

Την επόμενη ημέρα προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 10μl μαγνητικών σφαιριδίων (Dynabeads® Protein G, #10004D LifeTechnologies) και τα συνεχίζουμε την ίδια επώαση για επιπλέον 1,5 ώρα. Έπειτα, απομακρύνουμε τα δείγματα από τον ρότορα και τα τοποθετούμε σε μαγνητική βάση. Τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία έχουν δεσμεύσει στην επιφάνειά τους τα αντισώματα, έλκονται προς την πλευρά των σωληναρίων που έρχεται σε επαφή με το μαγνήτη. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια διαδοχικά με: διάλυμα χαμηλής αλατότητας, διάλυμα υψηλής αλατότητας, διάλυμα λιθίου και διάλυμα TE/10 (**Πίνακας 8**). Τελικώς, επαναδιαλύουμε κάθε δείγμα σε 45μl διαλύματος έκλουσης (**Πίνακας 8**) ενώ αφού απομακρύνουμε από τους -80 °C το input, προσθέτουμε σε αυτό 40 μl από το ίδιο διάλυμα. Ακόμα, προσθέτουμε 30μg RNase και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως, προσθέτουμε 20μg πρωτεΐνης K και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 50°C. Έπειτα, τοποθετούμε τα δείγματα στη μαγνητική βάση και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια. Τέλος, προσθέτουμε NaCl τελικής συγκέντρωσης 300mM σε όλα τα δείγματα και τα επωάζουμε στους 65 °C για 16 ώρες.

Μετά το πέρας της επώασης, απομονώνουμε μόνο θραύσματα DNA από κάθε δείγμα μας με τη βοήθεια των μαγνητικών σφαιριδίων καθαρισμού DNA NucleoMag® (744970, Macherey Nagel) και τα εκλύουμε σε 45μl διαλύματος TE/10.

Συνεχίζοντας, ελέγχουμε με PCR πραγματικού χρόνου την πρόσδεση της HMGA1 στον υποκινητή των c-myc και sox2 γονιδίων (θετικοί στόχοι) και στο gapdh γονίδιο (αρνητικό

γονίδιο ελέγχου). Ειδικότερα, οι αλληλουχίες, η θερμοκρασία εκκίνησης των εκκινήτων και το πρόγραμμα της PCR πραγματικού χρόνου περιγράφονται συγκεντρωτικά στους **Πίνακες 9Α,Β**.

Διάλυμα λύσης	Διάλυμα πλύσης	Διάλυμα κατακερματισμού
50 mM HEPES pH 7.9	10 mM Tris-HCl, pH 8.1	0.1% SDS
140 mM NaCl	200 mM NaCl	1 mM EDTA
1 mM EDTA	1 mM EDTA, pH 8.	10 mM Tris, pH 8.1
10% glycerol	0.5 mM EGTA, pH 8.0	
0.5% NP---40		
0.25% Triton X---100		

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας με τη σύσταση των διαλυμάτων λύσης, πλύσης και κατακερματισμού

Διάλυμα πλύσης χαμηλής αλατότητας	Διάλυμα πλύσης υψηλής αλατότητας	Διάλυμα πλύσης λιθίου	Διάλυμα TE/10	Διάλυμα έκλουσης
0.1% SDS	0.1% SDS	100 mM Tris-HCl, pH 7.5	10 mM Tris-HCl, pH 8.0	20 mM HEPES, pH 7.9
1% Triton X-100	1% Triton X -100	0.5 M LiCl	0.1 mM EDTA	1 mM EDTA
2 mM EDTA	2 mM EDTA	1% NP-40		0.5% SDS
20 mM Hepes--KOH, pH7.9	20 mM Hepes--KOH, pH7.9	1% Sodium Deoxycholate		
150 mM NaCl	500 mM NaCl			

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας με τη σύσταση των διαλυμάτων χαμηλής και υψηλής αλατότητας, του διαλύματος πλύσης λιθίου, του διαλύματος TE/10 και του διαλύματος έκλουσης

(A)

<i>Sox</i> , 69°C	FW: TGCTTTCGTCCCCAAGGTTT RV: AAAGGGTGCAAAGGCAAAGC
<i>Gapdh</i> , 64,4°C	FW: TCCCAAAGTCCTCCTGTTTCA RV: CAGCAGGACACTAGGGAGTCAA
<i>c-Myc1</i> , 68,2°C	FW: ATCACTCCACACACTGGCG RV: CAGGCGTCTCTCTTAAGGCTG
<i>c-Myc2</i> , 64°C	FW: CTGAGGCTCCTCCTCCTCTT RV: TTTCTCCCTTCCCCACCTC

Πίνακες 9: (A) Απεικόνιση αλληλουχιών και θερμοκρασιών εκκίνησης των εκκινητών κάθε γονιδίου στόχου (B) Πρόγραμμα PCR πραγματικού χρόνου

(B)

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1. 95°C	2 λεπτά	Προ-θέρμανση
2. 95°C	15 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
3. 60-70°C(TM)	30 δευτερόλεπτα	Πρόσδεση εκκινητών
4. TM-88.4°C	5 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη, δημιουργία καμπυλών τήξεως

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

WESTERN BLOT

Για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης της HMGA1 κατά τον επαναπρογραμματισμό διαφοροποιημένων κυττάρων ποντικού, χρησιμοποιούμε το διαγονιδιακό ποντίκι B6.Rosa26-rtTA, από το οποίο απομονώνουμε τους εμβρυονικούς ινοβλάστες (MEFs) όπως περιγράφηκε στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Τα MEFs K.I που απομονώνουμε εκφράζουν συνεχώς τον επαγωγέα M2-rtTA ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή της κασέτας των OSKM. Με την χορήγηση δεοξυκυκλίνης στο θρεπτικό μέσο των MEFs K.I, ενεργοποιείται ο επαγωγέας με συνέπεια την έναρξη του επαναπρογραμματισμού. Συγκεκριμένα, ως ημέρα 0 ορίζουμε την 1^η ημέρα χορήγησης δεοξυκυκλίνης και συλλέγουμε δείγματα των 50.000 (x2) κυττάρων και των 200.000 (x2) κυττάρων όπως ακριβώς επαναλαμβάνουμε ανά 3 ημέρες για το επόμενο χρονικό διάστημα των 18 ημερών.

Με τη μέθοδο Western blot, εντοπίζουμε την ελάχιστη ποσότητα κυττάρων που απαιτείται για την ανίχνευση της πρωτεΐνης HMGA1, μοριακού βάρους 17 kDa. Συγκεκριμένα, ηλεκτροφορούμε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 14% ^{w/v}, 4 διαφορετικές ποσότητες κυττάρων: 12.500, 25.000, 50.000 και 100.000 κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από τρυβλίο των 6 cm με 80% πληρότητα, στο οποίο είχαμε επιστρώσει αρχικά 500.000 κύτταρα MEFs K.I χωρίς την επίδραση δεοξυκυκλίνης. Το αποτέλεσμα ύστερα από αποτύπωση των πρωτεϊνών στο φιλμ είναι το εξής: **(Εικόνα 1)**



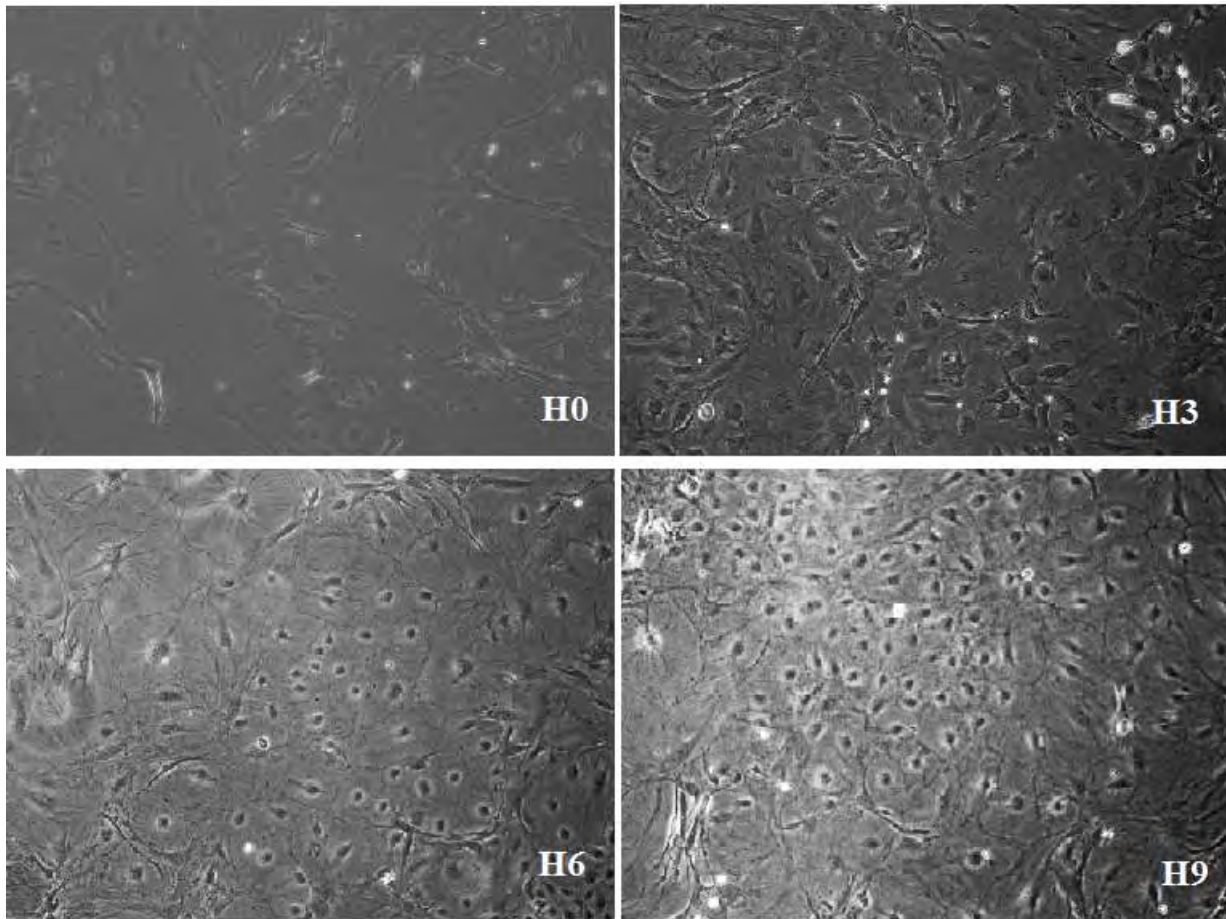
Εικόνα 1: Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντίσωμα για την πρωτεΐνη HMGA1 με τη μέθοδο Western blot.

Ηλεκτροφορήθηκαν (A): 12.500 (B): 25.000 (Γ): 50.000 και (Δ): 100.000 κύτταρα.

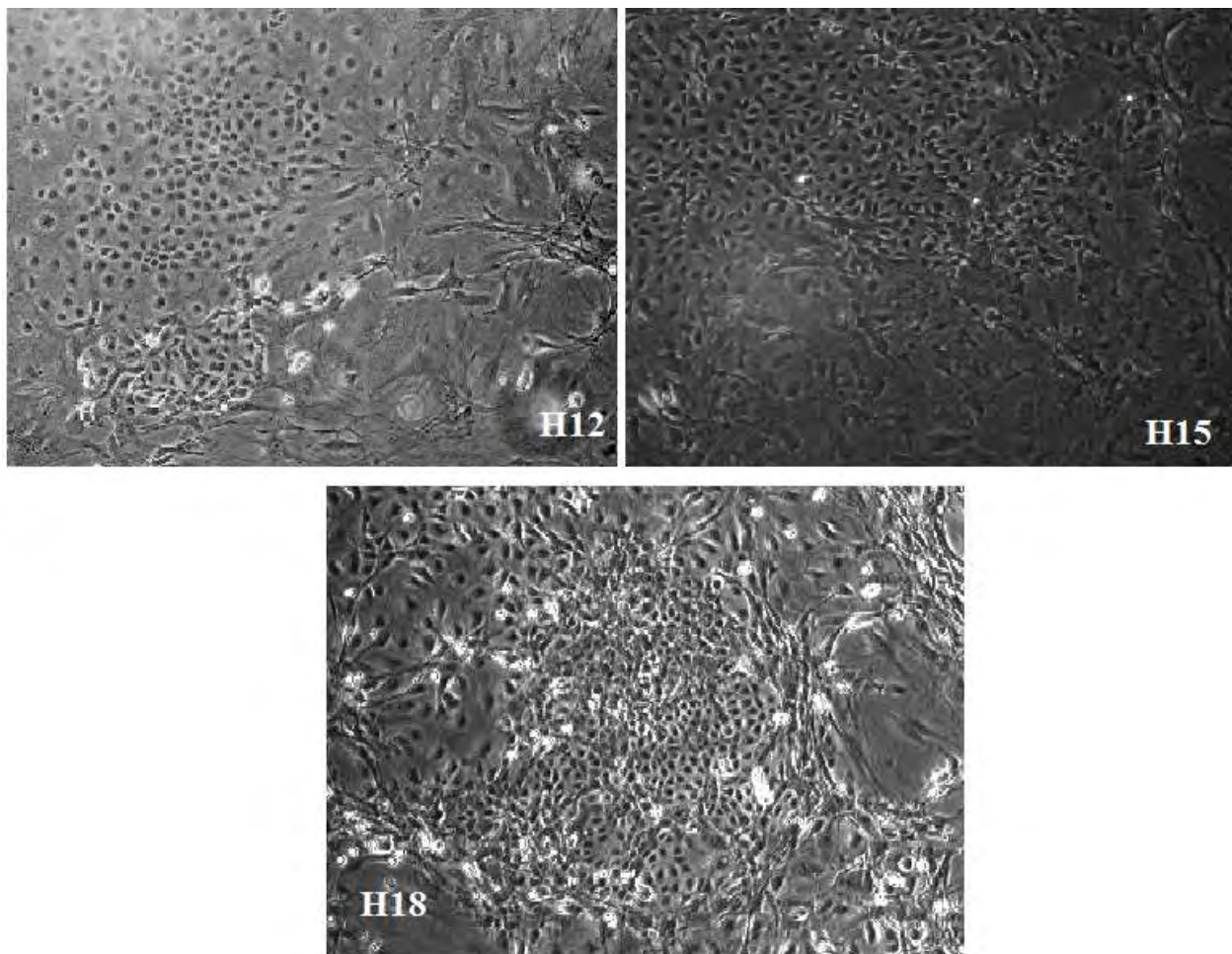
Σύμφωνα με το παραπάνω αποτέλεσμα, επιλέγουμε ως ιδανική εικόνα αυτή των 12.500 κυττάρων. Επομένως, για το πείραμα του επαναπρογραμματισμού και τη μελέτη του προτύπου έκφρασης της HMGA1 συλλέγουμε πελέτες 50.000 κυττάρων/δείγμα ώστε να έχουμε περιθώριο επανάληψης της μεθόδου του Western blot ηλεκτροφορώντας 12.500 κύτταρα/δείγμα.

ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ MEFs

Για τον επαναπρογραμματισμό των MEFs K.I σε iPSCs, επιστρώνουμε σε 7 τρυβλία των 10cm, 500.000 κύτταρα/τρυβλίο. Ύστερα από την πάροδο των 18 ημερών, στο τρυβλίο ο αριθμός των κυττάρων έχει φτάσει στα 8.500.000 και η πληρότητα είναι 90-95%. Ακολουθούμε τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού όπως έχει αναλυθεί στην προηγούμενη ενότητα και ανά 3 ημέρες φωτογραφίζουμε τα τρυβλία με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως εξής: **(Εικόνα 2,3)**



Εικόνα 2: Φωτογραφίες τρυβλίων (10cm) με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου για τις ημέρες: 0, 3, 6, 9 του επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I. Στην H0 δεν έχει χορηγηθεί δεοξυκυκλίνη στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων.



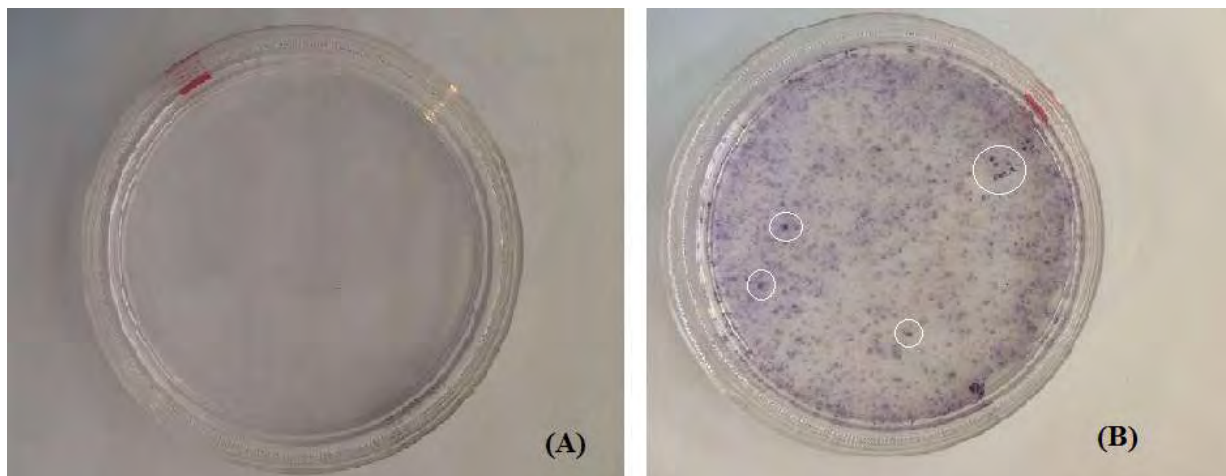
Εικόνα 3: Φωτογραφίες τρυβλίων (10cm) με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου για τις ημέρες: 12, 15, 18 του επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I.

Από τις παραπάνω φωτογραφίες με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου, παρατηρούμε την αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων MEFs K.I κατά τον επαναπρογραμματισμό τους σε iPSCs. Ειδικότερα, από την 3^η κιάλας ημέρα καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο ενισχυμένο με δεοξυκυκλίνη, παρατηρούμε πως αρχίζουν και δημιουργούνται πιο στρογγυλά κύτταρα σε σχέση με τους αρχικούς επιμήκεις ινοβλάστες που σχηματίζουν δικτυωτές ίνες. Παράλληλα, παρατηρούμε την αύξηση του ρυθμού με τον οποίο τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και τη δημιουργία ολοένα και μεγαλύτερων αποικιών στρογγυλής διαμόρφωσης. Κατά την 18^η ημέρα,

ο αριθμός των κυττάρων που καλύπτει το τρυβλίο έχει προσεγγίσει τη μέγιστη πληρότητα και η μορφολογία των κυττάρων έχει αλλάξει ολοκληρωτικά. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως 0,1-1% του συνόλου των κυττάρων καταφέρνουν να επαναπρογραμματιστούν πλήρως ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αποκτά χαρακτηριστικά πολυδυναμικότητας όπως είναι η αλλαγή στην μορφολογία τους και στον ρυθμό ανάπτυξής τους.

ΧΡΩΣΗ ΓΙΑ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Χρησιμοποιούμε τρυβλίο των 10cm με κύτταρα MEFs Κ.Ι που βρίσκονται στην 18^η ημέρα επαναπρογραμματισμού υπό την επίδραση δεοξυκυκλίνης η οποία επάγει την έκφραση των εξωγενών παραγόντων επαναπρογραμματισμού OSKM, μέσω ενεργοποίησης του M2-rtTA επαγωγέα (**Εικόνα 4B**). Επιπλέον, χρησιμοποιούμε τρυβλίο των 10cm με κύτταρα MEFs Κ.Ι, στην 18^η ημέρα καλλιέργειας στα οποία δεν χορηγείται δεοξυκυκλίνη (**Εικόνα 4A**). Το αποτέλεσμα της χρώσης ανάμεσα στα δύο τρυβλία είναι:



Εικόνα 4: Χρώση για αλκαλική φωσφατάση των iPSCs αποικιών (κυκλωμένες αποικίες)

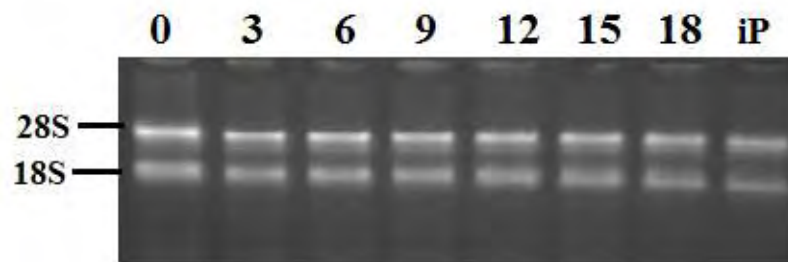
(A) Χωρίς τη χορήγηση δεοξυκυκλίνης (B) Με χορήγηση δεοξυκυκλίνης

Σύμφωνα με την **Εικόνα 4**, ο επαναπρογραμματισμός πραγματοποιείται στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε δεοξυκυκλίνη. Η χρώση με αλκαλική φωσφατάση που είναι επιφανειακός δείκτης πολυδυναμικότητας, χαρακτηρίζει τα πολυδύναμα κύτταρα στην καλλιέργειά μας και σύμφωνα με αυτή εντοπίζουμε τις iPSCs αποικίες (οι κυκλωμένες αποικίες με εντονότερο μωβ

χρώμα). Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, μόνο το 0,1-1% των κυττάρων επαναπρογραμματίζονται πλήρως σε iPSCs ενώ τα υπόλοιπα δεν καταφέρνουν να ολοκληρώσουν το μονοπάτι του επαναπρογραμματισμού παρόλο που έχουν αρχίσει να αποκτούν πολυδύναμα χαρακτηριστικά.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ RNA ΣΕ 2% ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Πραγματοποιούμε απομόνωση του συνολικού RNA από τις πελέτες των 200.000 κυττάρων MEFs K.I κάθε δείγματος για τα χρονικά σημεία 0,3,6,9,12,15,18 και αντίστοιχα από πελέτα ίδιου αριθμού κυττάρων iPSCs (αμιγής πληθυσμός). Ηλεκτροφορούμε τα δείγματά μας σε 2% πήκτωμα αγαρόζης για να ελέγξουμε την ποιότητα του RNA (αν έχει αποικοδομηθεί) και να διαπιστώσουμε αν υπάρχουν υπολείμματα DNA στα δείγματά μας (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5: Φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης του συνολικού RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα

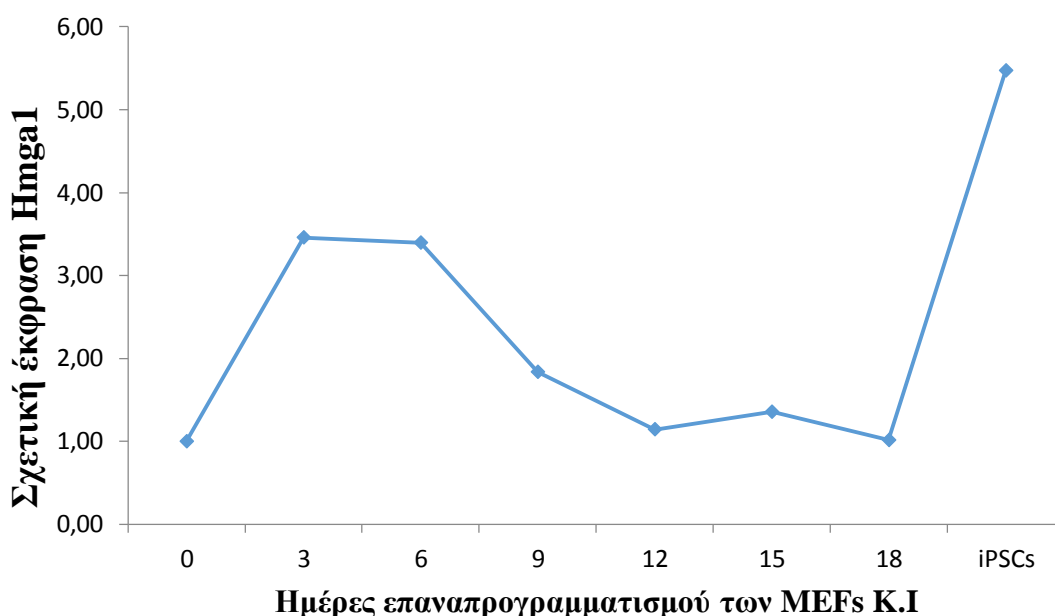
Στο παραπάνω αποτέλεσμα είναι εμφανείς οι δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις 28S και 18S ριβοσωμικές υπομονάδες του rRNA σε κάθε δείγμα. Η μία μπάντα αναμένεται σχεδόν διπλάσια από την άλλη, όπως και παρατηρούμε σε κάθε δείγμα γεγονός που υποδηλώνει πως τα RNA έχουν απομονωθεί σωστά και δεν υπάρχουν περαιτέρω προσμίξεις.

ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ HMGA1

1. Real time PCR (PCR πραγματικού χρόνου)

Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hmga1, απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα ύστερα από εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου στα cDNA δείγματα των 0,3,6,9,12,15,18

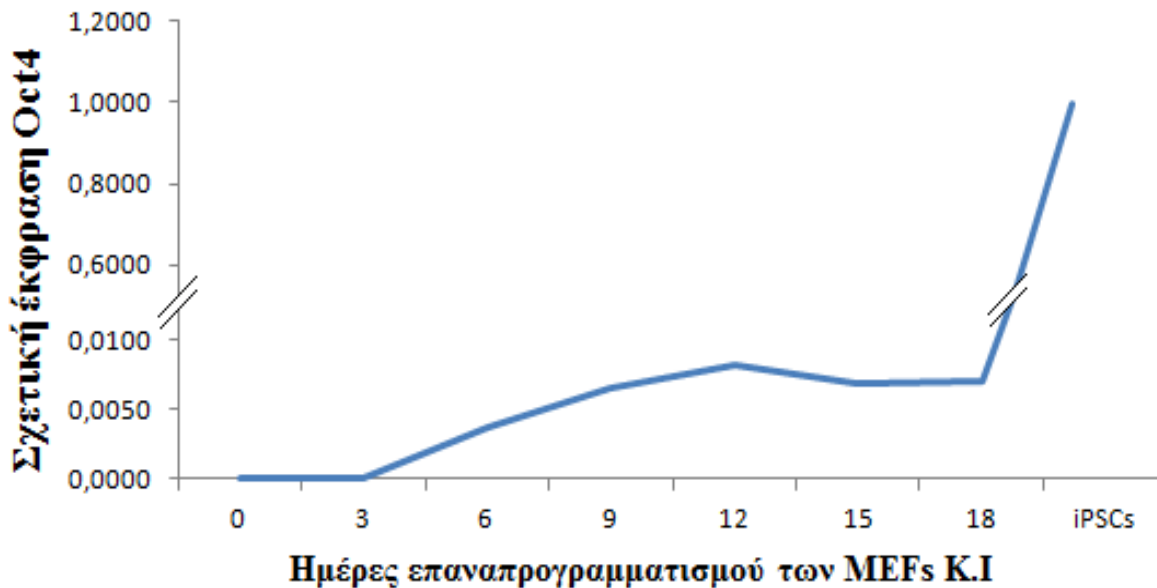
ημερών και στο cDNA δείγμα των iPSCs για το γονίδιο αυτό. Επίσης, εφαρμόζουμε τη μέθοδο για το γονίδιο *Gapdh* που είναι ‘housekeeping’ και έχει σταθερά επίπεδα έκφρασης ώστε να κανονικοποιήσουμε τις τιμές που προκύπτουν από την PCR πραγματικού χρόνου, μέσω υπολογισμού του λόγου *Hmga1/Gapdh* κάθε δείγματος. Έτσι, εξισορροπούμε τα δείγματα μεταξύ τους και είμαστε σε θέση να παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα διαγραμματικά ορίζοντας ως μονάδα την σχετική έκφραση του γονιδίου *Hmga1* την ημέρα 0 και διορθώνοντας ως προς αυτή την σχετική έκφραση της *Hmga1* των άλλων δειγμάτων (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση της σχετικής έκφρασης της *Hmga1* ως προς τις ημέρες επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I.

Στο διάγραμμα της **Εικόνας 6**, κατά την 3^η ημέρα επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I η σχετική έκφραση του γονιδίου *Hmga1* εμφανίζει τη μέγιστη τιμή (περίπου 3,5 φορές περισσότερη έκφραση από την ημέρα 0). Επίσης, παρατηρούμε πως μέχρι την 6^η ημέρα η έκφραση του γονιδίου παραμένει σταθερή, ενώ τα επίπεδα έκφρασής του φαίνεται να μειώνονται από την 6^η ημέρα και μετά. Στα iPSCs, η έκφραση του γονιδίου της HMGA1 είναι σχεδόν διπλάσια σε σύγκριση με τη μέγιστη σχετική έκφραση που παρουσιάζουν τα MEFs K.I την 3^η ημέρα.

Εφαρμόζουμε τη μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου στα cDNA δείγματα των 0,3,6,9,12,15,18 ημερών και στο cDNA δείγμα των iPSCs για το γονίδιο Oct4 και για το Gapdh. Ύστερα από την κανονικοποίηση των τιμών προκύπτει το εξής διάγραμμα: (Εικόνα 7)

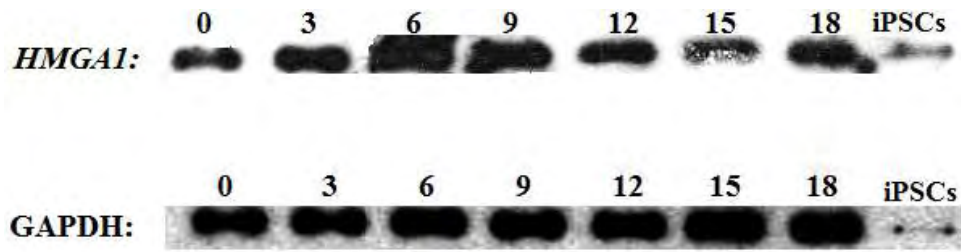


Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του Oct4 ως προς τις ημέρες επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I

Το αποτέλεσμα του παραπάνω διαγράμματος, επιβεβαιώνει πως η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού διεξήχθη επιτυχώς, καθώς η σχετική έκφραση του Oct4 έχει εκθετικό πρότυπο. Ειδικότερα, παρατηρούμε πως η έκφραση του γονιδίου ξεκινά μετά την 3^η ημέρα επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I και σταθεροποιείται μετά τη 12^η ημέρα. Στο δείγμα των iPSCs, η σχετική έκφραση του Oct4 είναι θεαματικά υψηλότερη από αυτή της 12^{ης} ημέρας επαναπρογραμματισμού που φαίνεται πως η σχετική έκφραση του Oct4 έχει τη μέγιστη τιμή.

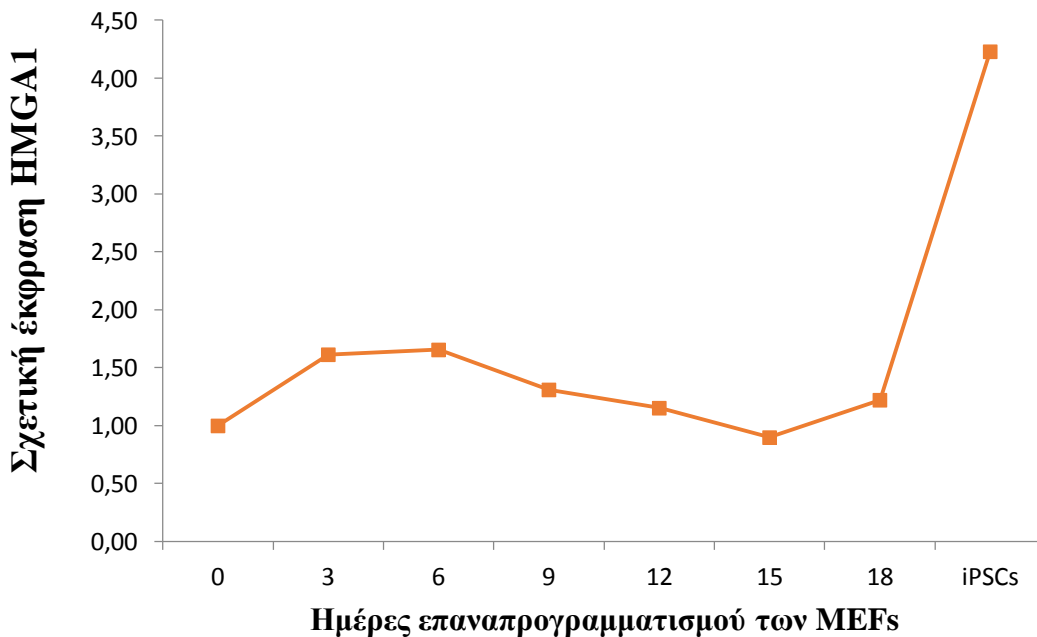
2. Western blot

Για τη μελέτη της σχετικής έκφρασης της πρωτεΐνης HMGA1 κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I στο χρονικό διάστημα των 18 ημερών εφαρμόζουμε την τεχνική Western blot στα δείγματα 0-18 και iPSCs, χρησιμοποιώντας αντισώματα εναντίων των πρωτεϊνών HMGA1 και GAPDH (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντισώματα εναντίον των *HMGA1* και *GAPDH* με τη μέθοδο *Western blot*.

Με ανάλυση της **Εικόνας 8** μέσω του προγράμματος Image J, ποσοτικοποιούμε την ένταση του σήματος / δείγμα για την κάθε πρωτεΐνη. Έπειτα, βρίσκουμε το λόγο σήματος *HMGA1*/*GAPDH* για κάθε δείγμα, ορίζουμε ως μονάδα τη σχετική έκφραση της *HMGA1* την ημέρα 0 και διορθώνουμε ως προς αυτή τη σχετική έκφραση της *HMGA1* των υπόλοιπων δειγμάτων. Έτσι, προκύπτει το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης που απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 9**).

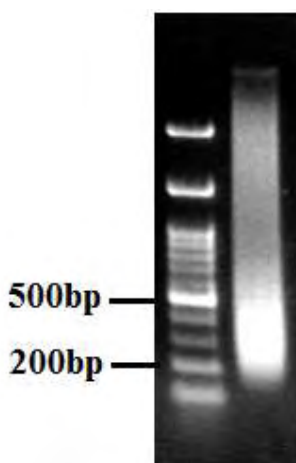


Εικόνα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της σχετικής έκφρασης της πρωτεΐνης *HMGA1* ως προς τις ημέρες επαναπρογραμματισμού των *MEFs K.I*

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, η σχετική έκφραση της HMGA1 την 6^η ημέρα επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή και είναι σχεδόν διπλάσια της ημέρας 0. Ύστερα από την 6^η ημέρα, τα επίπεδα έκφρασής της μειώνονται μέχρι την 15^η ημέρα και κατά το χρονικό διάστημα 15^{ης} -18^{ης} ημέρας παρατηρείται και πάλι αύξηση. Τέλος, η έκφραση της πρωτεΐνης στα iPSCs είναι τετραπλάσια της έκφρασης της HMGA1 πριν την έναρξη του επαναπρογραμματισμού, κατά την ημέρα 0.

ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

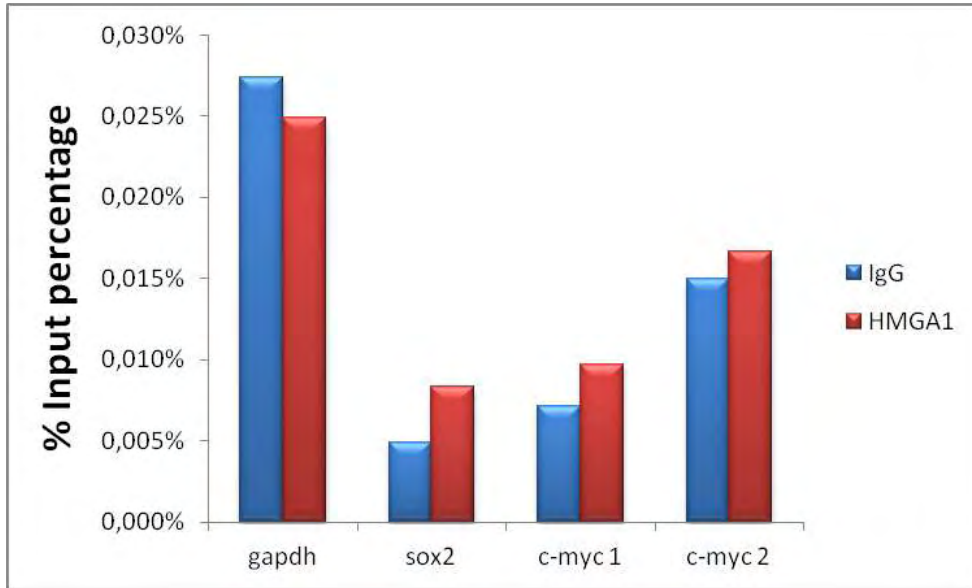
Ύστερα από εφαρμογή του πρωτοκόλλου ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης σε MEFs K.I κύτταρα, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι' ηλεκτροφορούμε ένα μικρό δείγμα από την κατακερματισμένη χρωματίνη (ύστερα από Sonication), σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (**Εικόνα 10**). Με αυτό τον τρόπο, ελέγχουμε το μέγεθος των τμημάτων στα οποία έχει κατακερματιστεί η χρωματίνη. Παρατηρούμε, πως κυμαίνεται μεταξύ 200-500bp σύμφωνα με την απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης ύστερα από έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία.



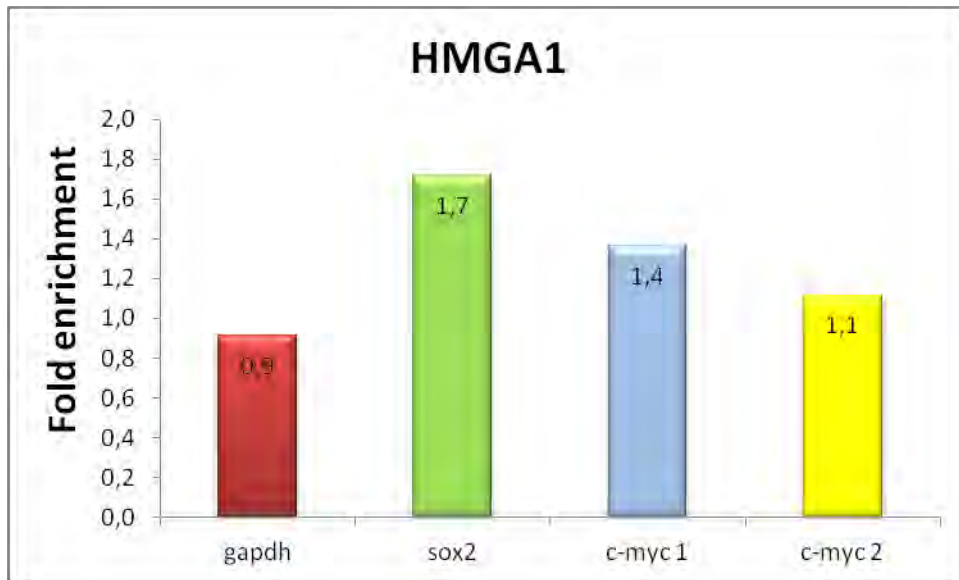
Εικόνα 10: Φωτογραφία του πηκτώματος αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση της κατακερματισμένης από Sonication χρωματίνης

Μετά το πέρας της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, ελέγχουμε με PCR πραγματικού χρόνου την πρόσδεση της HMGA1 στον υποκινητή των c-Myc και Sox2 γονιδίων (θετικοί στόχοι) και στο Gapdh γονίδιο (αρνητικό γονίδιο ελέγχου). Για το σκοπό αυτό,

χρησιμοποιούμε ειδικούς για κάθε γονίδιο εκκινητές όπως έχει ήδη αναφερθεί. Αξίζει να σημειωθεί, πως το γονίδιο Sox2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 ενώ το c-Myc σε δύο περιοχές του χρωμοσώματος 15 (**Εικόνα 11 A,B**).



Εικόνα 11 (A): Διαγραμματική απεικόνιση του αποτελέσματος της PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοστιαία αύξηση της πρόσδεσης της HMGA1 στα γονίδια στόχους, εκφραζόμενη ως προς το % ποσοστό του input.



Εικόνα 11 (B): Συγκενρωτική απεικόνιση των μονάδων αύξησης της πρόσδεσης της HMGA1 στα γονίδια στόχους

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν μία σχετική αύξηση της πρόσδεσης στα γονίδια που αποτελούν θετικούς στόχους για την HMGA1. Όμως, η αύξηση αυτή κυμαίνεται σε ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά και εμφανίζει μικρή διαφορά σε σύγκριση με την αύξηση πρόσδεσης στον αρνητικό στόχο που είναι το γονίδιο Gapdh, γεγονός που αποδεικνύει πως δεν υπάρχει εξειδίκευση ως προς την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε θετικούς ή αρνητικούς στόχους. Ειδικότερα, όταν παρουσιάζεται μεγάλη διαφορά μεταξύ του IgG και της HMGA1 διαγραμματικά για ένα γονίδιο, τότε αυτό αποτελεί θετικό στόχο ενώ οι μικρότερες διαφορές είναι χαρακτηριστικές για γονίδια-αρνητικούς στόχους. Για το λόγο αυτό, το αποτέλεσμα του πειράματος είναι μη αξιόπιστο και απαιτείται η επανάληψή του σε διαφορετικές συνθήκες και ελέγχοντας τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας ώστε να προκύψει ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, έπειτα από αλλαγές στο πρωτόκολλο της τεχνικής και στις πειραματικές συνθήκες είναι εφικτό να αποδοθεί η πραγματική εικόνα πρόσδεσης της HMGA1 στα γονίδια στόχους και η διεξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων ως προς τον ρόλο αυτής της πρωτεΐνης στον επαναπρογραμματισμό των MEFs K.I.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης της HMGA1 κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I για την χρονική περίοδο των 18 ημερών, μπορούν να προκύψουν ποικίλα συμπεράσματα. Αρχικά, η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού διεξήχθη επιτυχώς σύμφωνα με το πείραμα χρώσης για την αλκαλική φωσφατάση, βάσει του προτύπου έκφρασης του Oct4 αλλά και την μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων ανά 3 ημέρες. Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 είναι ο βασικότερος δείκτης πολυδυναμικότητας και είναι απόλυτα θεμιτό η έκφραση του γονιδίου του να αυξάνεται όσο τα κύτταρα αποκτούν πολυδύναμο χαρακτήρα. Ταυτόχρονα, η αλκαλική φωσφατάση που αποτελεί από τους πρώτους δείκτες πολυδυναμικότητας είναι χρήσιμο εργαλείο με το οποίο μπορούμε να διακρίνουμε τις αποικίες των κυττάρων που επαναπρογραμματίστηκαν σε iPSCs, όπως και έγινε στο πείραμά μας. Επίσης, η μορφολογία των MEFs K.I κυττάρων άλλαξε σε μεγάλο ποσοστό καθώς από επιμήκη κύτταρα με δικτυωτές ίνες (ημέρα 0), πολλαπλασιάστηκαν σχηματίζοντας στρογγυλές αποικίες (ημέρα 18).

Εν συνεχεία, το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hmga1 φαίνεται να σχετίζεται με το αντίστοιχο της πρωτεΐνης καθώς η μέγιστη έκφραση του γονιδίου εντοπίζεται την 3^η ημέρα και της πρωτεΐνης την 6^η ημέρα. Η διαφορά αυτή μεταξύ των ημερών είναι λογική καθώς η μεταγραφή προηγείται της μετάφρασης. Επιπρόσθετα, παρατηρούμε πως το γονίδιο του Oct4 αρχίζει να παρουσιάζει αυξημένη έκφραση από την 3^η ημέρα και μετά γεγονός που αν το συσχετίσουμε με την έκφραση του γονιδίου της Hmga1, θα επιβεβαιώσουμε πως πιθανόν να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο παραγόντων κατά την πάροδο του επαναπρογραμματισμού. Το εύρημα αυτό, συμφωνεί με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν από τον ερευνητή Shah και την ομάδα του (Shah et al., 2012) για τον ρόλο της HMGA1 στον επαναπρογραμματισμό των ESCs που απομονώθηκαν από άνθρωπο. Συγκεκριμένα, δημοσιεύθηκε πως η HMGA1 είναι εκείνος ο μεταγραφικός παράγοντας που προσελκύει την πρόσδεση του Oct4 και των υπολοίπων παραγόντων πολυδυναμικότητας (OSKM) ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού. Η αύξηση της έκφρασης της HMGA1 τις πρώτες ημέρες (3^η – 6^η) του επαναπρογραμματισμού των MEFs K.I

δικαιολογεί την δημοσίευση αυτή καθώς μπορεί τα επίπεδα της να μειώνονται αφού στρατολογήσει τους OSKM στην χρωματίνη ενεργοποιώντας έτσι έμμεσα την έκφρασή τους.

Στα περισσότερα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, χρησιμοποιήσαμε ως θετικό έλεγχο δείγμα με αμιγή πληθυσμό iPSCs κυττάρων. Παρατηρήσαμε, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεϊνών πως η HMGA1 εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα iPSCs γεγονός που συμφωνεί με πολλές δημοσιεύσεις όπως του Shah και των συνεργατών του (Shah, et al., 2012). Το αποτέλεσμα αυτό μας βοήθησε να κατανοήσουμε πως η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε από τεχνικής άποψης ολοκληρώθηκε σωστά αλλά ταυτόχρονα μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως οι αλλαγές που συμβαίνουν στην έκφραση της HMGA1 μπορεί να είναι υποτιμημένες. Πιο ειδικά, στα πειράματά μας μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης της HMGA1 στο σύνολο των κυττάρων και όχι στοχευμένα στο 0,1-1% των κυττάρων που έχουν επαναπρογραμματισθεί πλήρως. Αυτό έχει σαν συνέπεια, την πιθανή υποτίμηση των πραγματικών αλλαγών στο χρονικό διάστημα των 18 ημερών που μπορεί να δικαιολογήσει τα χαμηλά επίπεδα μεταβολών της HMGA1 και του γονιδίου της σε σύγκριση με αυτά που παρατηρούμε στον αμιγή πληθυσμό των κυττάρων iPSCs.

Σύμφωνα με το παραπάνω συμπέρασμα, θα μπορούσαμε να προτείνουμε περαιτέρω πειράματα που να λύνουν το πρόβλημα των υποτιμημένων αποτελεσμάτων. Ειδικότερα, βάσει του δείκτη πολυδυναμικότητας SSEA-1 στην επιφάνεια των κυττάρων είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους ανάμεσα σε μη επαναπρογραμματισμένα κύτταρα με τη μέθοδο cell sorting, ώστε να επαναληφθούν παρόμοια πειράματα για την έκφραση της HMGA1 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεϊνών, μόνο στο 0,1-1% των κυττάρων που μας ενδιαφέρει. Έπειτα, αφού εγκαθιδρυθεί το πρότυπο έκφρασης της HMGA1 και εντοπίσουμε τις κομβικές ημέρες στις οποίες παίζει ρόλο στον επαναπρογραμματισμό θα μπορούσαμε να επαναλάβουμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για να εντοπίσουμε τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει τις ημέρες αυτές. Τέλος, ένα ακόμη πείραμα που έχει αρχίσει ήδη να πραγματοποιείται στο εργαστήριό μας είναι η σίγηση του γονιδίου της HMGA1 με sh-RNA, ώστε να μελετήσουμε τις συνέπειες που έχει στον επαναπρογραμματισμό MEFs K.I κυττάρων και να διαπιστώσουμε αν απουσία της μειώνεται η απόδοση της δημιουργίας iPSCs.

Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε πως η δημιουργία πολυδύναμων κυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα, αποτελεί ένα φλέγον ζήτημα για την επιστημονική κοινότητα καθώς

βρίσκει ποικίλες κλινικές εφαρμογές, συμβάλλει στην πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών και λύνει τους ηθικούς φραγμούς που έχει η μέχρι τώρα χρήση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Η διαδικασία παραγωγής iPSCs, είναι μια διαδικασία που ‘γυρνά τα κύτταρα πίσω στο χρόνο’ και οι ανακαλύψεις για το μηχανισμό αυτό είναι ακόμη παρθένες. Συνεπώς, οποιοδήποτε κομμάτι γνώσης προστίθεται στο παζλ των βλαστοκυττάρων είναι χρήσιμο για την κατανόηση της πολυδυναμικότητας και τη βελτίωση των πειραματικών μεθόδων με σκοπό την μελλοντική χρήση της τεχνολογίας αυτής στην αναγεννητική ιατρική και στην εξυγίανση ασθενειών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boue, S. and Belmonte, J.C. (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 26, 1276-1284.
- Agalioti, T., S. Lomvardas, et al. (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter *Cell* 103(4): 667-78
- Arndt G. Benecke and Sebastian Eilebrecht (2015). RNA-Mediated Regulation of HMGA1 Function. *Biomolecules*, 5, 943-957
- Aoi, T., [*Advance in study of induced pluripotent stem cells (iPS cells)*]. *Nippon Rinsho*, 2008. 66(5): p. 850-6
- Barlow, P., Owen, D.A. and Graham, C. (1972) DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 27, 431-445.
- Beddington, R.S. and Robertson, E.J. (1989) An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 105, 733-737.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L. and Lander, E.S. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125, 315-326.
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, et al (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507
- Boyer LA, LEE TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. and Robertson, E. (1984) Formation of germline chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-256.
- Chen, J., Han, Q. and Pei, D. (2012). EMT and MET as paradigms for cell fate switching. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 66-69.
- Collins, K. (2006). The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 484-494.

Cowan, C.A., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells*. *Science*, 2005. 309, 1369-73.

Currie, R.A. (1997). Functional interaction between the DNA binding subunit trimerization domain of NF-Y and the high mobility group protein HMG-I(Y). *J. Biol. Chem.* 272, 30880-30888

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221.

Dyce, J., George, M., Goodall, H. and Fleming, T.P. (1987) Do trophoblast and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development*, 100, 685-698.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R. and Hochedlinger, K. (2008) Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 26, 2467-2474.

Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.

Fleming, T.P. (1987) A quantitative analysis of cell allocation to trophoblast and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, 119, 520-531.

Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1920-3.

Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 526–537.

Isabelle Cleyne and Wim J.M Van de Ven (2008). The HMGA proteins: A myriad of functions (Review). *International Journal of Oncology* 32: 289-305

Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka, Review (2015). A developmental framework for induced pluripotency. *Development* 142, 3274-3285

Kim J, Chu J, Shen X, Wang J and Orkin SH (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049-1061

Kriks, S., Shim, J.W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551.

Le, R., Kou, Z., Jiang, Y., Li, M., Huang, B., Liu, W., Li, H., Kou, X., He, W., Rudolph, K. L. et al. (2014). Enhanced telomere rejuvenation in pluripotent cells reprogrammed via nuclear transfer relative to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14, 27-39.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q. et al. (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51-63.

Li W and Ding S (2010). Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 31, 36-45.

Lin CH, Lin C, Tanaka H, Fero ML and Eisenman RN (2009b). Gene regulation and epigenetic remodeling in murine embryonic stem cells by c-Myc. *PLoS ONE* 4, e7839

Lomvardas, S., D. Thanos, 2001 Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo *Cell* 106(6): 685-96

Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T. and Plath, K. (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2883-2888.

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C. and Hochedlinger, K. (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 340-345.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K. and Hochedlinger, K. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1, 55-70.

Marcellini, S., Technau, U., Smith, J. C. and Lemaire, P. (2003). Evolution of Brachyury proteins: identification of a novel regulatory domain conserved within Bilateria. *Dev. Biol.* 260, 352-361.

Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M. and Blasco, M. A. (2009b). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 141-154.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A.,

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N and Yamanaka S (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101-106.

Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., et al. (2011). Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 16825–16830.

Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448, 313-317.

Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.* Science, 2008. 322(5903): p. 949-53.

O'Malley, J., Skylaki, S., Iwabuchi, K. A., Chantzoura, E., Ruetz, T., Johnsson, A., Tomlinson, S. R., Linnarsson, S. and Kaji, K. (2013). High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. *Nature* 499, 88-91.

O'Sullivan, R. J. and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 171-181.

Pan, G., Tian, S., Nie, J., Yang, C., Ruotti, V., Wei, H., Jonsdottir, G.A., Stewart, R. and Wakayama, T., et al., *Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer.* Science, 2001. 292(5517): p. 740-3.

Okamoto, S., and Takahashi, M. (2011). Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8785–8790.

Remboutsika, E., *Transcriptional regulator Leu3p of yeast: Modular architecture and function.* 1994, Purdue University.

Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S. and Bernstein, B.E. (2007) Genomewide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448, 553-560

Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.-k., Beyer, T. A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A. and Wrana, J. L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7, 64-77.

Shah SN, Resar LMS (2012). High Mobility Group A1 and Cancer: Potential Biomarker and Therapeutic Target. *Histol Histopathol* 27: 567-579

Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J.S., Hinrichs, A.S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L.W., Richards, S., Weinstock, G.M., Wilson, R.K., Gibbs, R.A., Kent, W.J., Miller, W. and Haussler, D. (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res*, 15, 1034-1050.

Sridharan R, Tchieu J et al. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364-377

Stadtfield, M., K. Brennand, and K. Hochedlinger, *Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells*. *Curr Biol*, 2008. 18(12): p. 890-4.

Stadtfield M and Hochedlinger K (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms and applications. *Genes & Development* 24, 2239-2263

Takahashi, K., Murakami, M. and Yamanaka, S. (2005) Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans*,33, 1522-1525.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-872.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Sasaki, A., Yamamoto, M., Nakamura, M., Sutou, K., Osafune, K. and Yamanaka, S. (2014). Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat. Commun.* 5, 3678.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676.

Takayama, N., Nishimura, S., Nakamura, S., Shimizu, T., Ohnishi, R., Endo, H., Yamaguchi, T., Otsu, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., et al. (2010). Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J. Exp. Med.* 207, 2817–2830.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Thomson, J.A. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 1, 299-312.

Tomoda, K., Takahashi, K., Leung, K., Okada, A., Narita, M., Yamada, N. A., Eilertson, K. E., Tsang, P., Baba, S., White, M. P. et al. (2012). Derivation conditions impact x-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 91-99.

Weinmann JM, Charlton CA et al. (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2088-2093

Wernig, M., et al., *A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types*. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(8): p. 916-24.

Wilmut I, Schnieke AE et al, (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813

Woltjen, K., et al., *piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2009. 458, 766-70.

Yamanaka S and Blau HM (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704-712

Yan Xu, Meng Zhang, Wenjuan Li, Xihua Zhu, Xichen Bao, Baoming Quin, Andrew P.Hutchins and Miguel A.Esteban, Review (2015). Transcriptional control of somatic cell reprogramming. *Trends in Cell Biology* 1203

Yie J.,Liang S., Merika M., Thanos D. (1997) Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3649-3662

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian,S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II and Thomson,J.A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-1920.

Zhang, X.M., Verdine G.L. (1999). A small region in HMG I (Y) is critical for cooperation with NF- κ B on DNA. *J. Biol.Chem.* 274, 20235-20243