



Τμήμα
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



‘ALEXANDER FLEMING’
Ερευνητικό Κέντρο
Βιοϊατρικών Επιστημών

«Επιγενετικός τόπος του Sox2 γονιδίου κατά την ανάπτυξη στον ποντικό»

Επιβλέπουσα Ερευνήτρια Γ΄:

Ευμορφία Ρεμπούτσικα, PhD.

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής,

Εργαστήριο Βιολογίας Βλαστικών Κυττάρων

Συν-επιβλέποντες Καθηγητές:

Μπαλατσός Νικόλαος, PhD.- Λέκτορας Βιοχημείας

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, PhD. - Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με
έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση

Σταματάκου Ελεάννα (Α.Φ.Μ.:1802130)

Λάρισα 2006



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5009/1
Ημερ. Εισ.: 13-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΣΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087760

Περιεχόμενα

1. Περίληψη	σελ. 3
2. Εισαγωγή	
▪ 2.1. Επιγενετική	σελ. 4-15
▪ 2.2 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (EBK)	σελ. 15-20
▪ 2.3 Επιγενετική και βλαστικά κύτταρα	σελ. 20-22
▪ 2.4 Γονίδια Sox	σελ. 22-28
3. Σχεδιασμός πειραματικού μέρους	σελ. 28-39
4. Υλικά και μέθοδοι	σελ. 40-42
5. Πειραματική προσέγγιση	σελ. 42-43
6. Αποτελέσματα και Συζήτηση	σελ. 43-47
7. Γλωσσάριο	σελ. 47-49
8. Αναφορές	σελ. 49-52

1. Περίληψη

Μελετάμε τις επιγενετικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την μετάβαση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (EBK) σε κύτταρα του αρχέγονου εξωδέρματος (AE). Ένα από τα γονίδια που μας ενδιαφέρει είναι αυτό του Sox2, ενός παράγοντα κρίσιμου για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης και της αυτό-ανανέωσης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (EBK). Η έκφραση του Sox2 ρυθμίζεται και χρονοταξικά και χωροταξικά. Αρχικά εκφράζεται στην εσωτερική κυτταρική μάζα (ΕΚΜ) της βλαστοκύστης, κατόπιν περιορίζεται στο αρχέγονο εξώδερμα (AE) και τέλος στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Εκτός του γεγονότος ότι ο Sox2 είναι ένας από τους κύριους παράγοντες για την γονιδιακή ρύθμιση πρώιμων γονιδίων, τα δεδομένα για την ρύθμιση του ιδίου είναι λιγοστά.

Συγκεντρώσαμε όλα τα στοιχεία που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για τις ρυθμιστικές αλληλουχίες του Sox2 και πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, ώστε να μελετήσουμε το επιγενετικό πρότυπο αυτών των περιοχών στα EBK και τα κύτταρα του AE δημιουργήσαμε από EBK.

2. Εισαγωγή

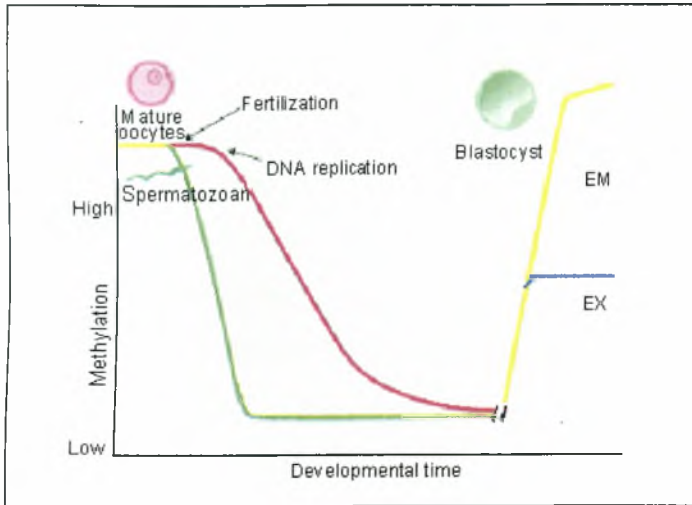
2.1. Επιγενετική

Ο όρος «επιγενετική» εισάχθηκε το 1942 από τον C. Waddington, ο οποίος προσπάθησε να περιγράψει ένα υποθετικό μοντέλο μέσω του οποίου ο γονότυπος δίνει γένεση στον φαινότυπο. Η Επιγενετική είναι η μελέτη των αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση που κληρονομούνται μέσω της μιτωτικής και μειωτικής διαίρεσης, αλλά δεν κωδικοποιούνται στο επίπεδο του DNA (1). Οι μοριακοί μηχανισμοί που μεσολαβούν στην επιγενετική ρύθμιση περιλαμβάνουν: DNA μεθυλίωση, τροποποίηση ιστονών —όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουϊτιλίωση και σουμοϋλίωση— και αποσιώπηση γονιδίων μεσολαβούμενη από RNA. Αυτά τα επιγενετικά γεγονότα είναι κρίσιμα κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών, αφού κάθε ιστός και κύτταρο απαιτεί διαφορετικό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης.

2.1.1 DNA μεθυλίωση

Στα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών θεωρούνται ως οι κύριες επιγενετικές αλλαγές. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης λαμβάνουν χώρα δυο κύκλοι επαναπρογραμματισμού της DNA μεθυλίωσης. Ο πρώτος κύκλος λαμβάνει χώρα στο στάδιο παραγωγής των γαμετικών κυττάρων, όπου πραγματοποιείται εξάλειψη της —γονικής προέλευσης— γενωμικής αποτύπωσης, με αποτέλεσμα την επανάκτηση της ολοδυναμίας των γαμετών. Ο δεύτερος κύκλος του επαναπρογραμματισμού λαμβάνει χώρα κατά την γονιμοποίηση με αποτέλεσμα την ασύμμετρη μεθυλίωση των γονικών γενωμάτων (Εικόνα 1).

Η μεθυλίωση του DNA επικρατεί σε δινοκλεοτίδια CpG, ειδικά σε περιοχές που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Θεωρείται ότι εξυπηρετεί ένα μηχανισμό αποσιώπησης αυτών των στοιχείων, ώστε να περιοριστεί η μετάθεσή τους. Η DNA μεθυλίωση μπορεί να εμποδίσει την απευθείας πρόσδεση μερικών μεταγραφικών παραγόντων στην θέση πρόσδεσής τους στο DNA και συνεπώς να καταστείλει την μεταγραφική δραστηριότητα της μεθυλιωμένης περιοχής. Τα CpG δινοκλεοτίδια σε περιοχές πλούσιες σε ποσοστό GC, καλούνται "νησίδες CpG δινοκλεοτιδίων" και



Εικόνα 1: Αμέσως μετά την γονιμοποίηση το πατρικό γένωμα (πράσινο) υφίσταται ταχύτατη απομεθυλίωση. Αντιθέτως, το μητρικό γένωμα (κόκκινο) απομεθυλιώνεται με αργούς ρυθμούς κατά την διάρκεια των πρώτων αυλακώσεων. Κατά το στάδιο της εμφύτευσης (στάδιο βλαστοκύστης) λαμβάνει χώρα ένα κύμα *de novo* μεθυλίωσης που επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό τους εμβρυικούς (EM) και τους εξωεμβρυικούς ιστούς (EX). (από Reik et al., 2001).

βρίσκονται συνήθως στο 5' τελικό άκρο των γονιδίων. Οι CpG νησίδες αποτελούνται από μέσο όρο μεγαλύτερο των 500 ζεύγη βάσεων (bp) με εκατοστιαίο ποσοστό GC υψηλότερο του 55. Η διατήρηση αυτών των μεθυλιωμένων δινουκλεοτιδίων είναι αποτέλεσμα της δράσης των DNA μεθυλ-τρανσφερασών, DNMTs (Πίνακας 1). Η DNMT1 θεωρείται ότι δρα κατά την αντιγραφή του DNA στην διατήρηση των πρότυπων μεθυλίωσης, ενώ οι DNMT-3a και -3b θεωρείται ότι λειτουργούν πρωτίστως ως *de novo* DNA μεθυλ-τρανσφεράσες. Η απαρχή της *de novo* μεθυλίωσης λαμβάνει χώρα κατά την 5^η κυτταρική διαίρεση μετά την γονιμοποίηση και συμπίπτει με το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης, τον σχηματισμό της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ΕΚΜ) και του τροφοεξωδέρματος (ΤΕ). Αυτό το γεγονός μπορεί να αντικατοπτριστεί από τους υψηλά μεθυλιωμένους σωματικούς ιστούς και τους υπομεθυλιωμένους εξωεμβρυικούς ιστούς του πλακούντα (Εικόνα 1: EM και EX, αντίστοιχα).

DNA methyltransferase	Activity	Function
DNMT1	Prefers hemi-methylated DNA	Maintenance of methylation, repression of transcription
DNMT2	Low activity in vitro	Non CpG methylation in Drosophila
DNMT3a	De novo methylation	Imprinting and repression
DNMT3b	De novo and maintenance methylation	Repeat methylation, repression
DNMT3L	Not active, co-localizes with DNMT3a and 3b	Repeat methylation, repression

Πίνακας 1: Δράση και λειτουργία των DNA μεθυλ-τρανσφερασών

Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 80% των CpG δινουκλεοτιδίων στο γένωμα των θηλαστικών είναι μεθυλιωμένα (2). Τα υπόλοιπα μη μεθυλιωμένα CpG κατάλοιπα βρίσκονται κυρίως σε περιοχές εκκινητών ιδιοσυστάτα ενεργών και/ή επαγόμενων

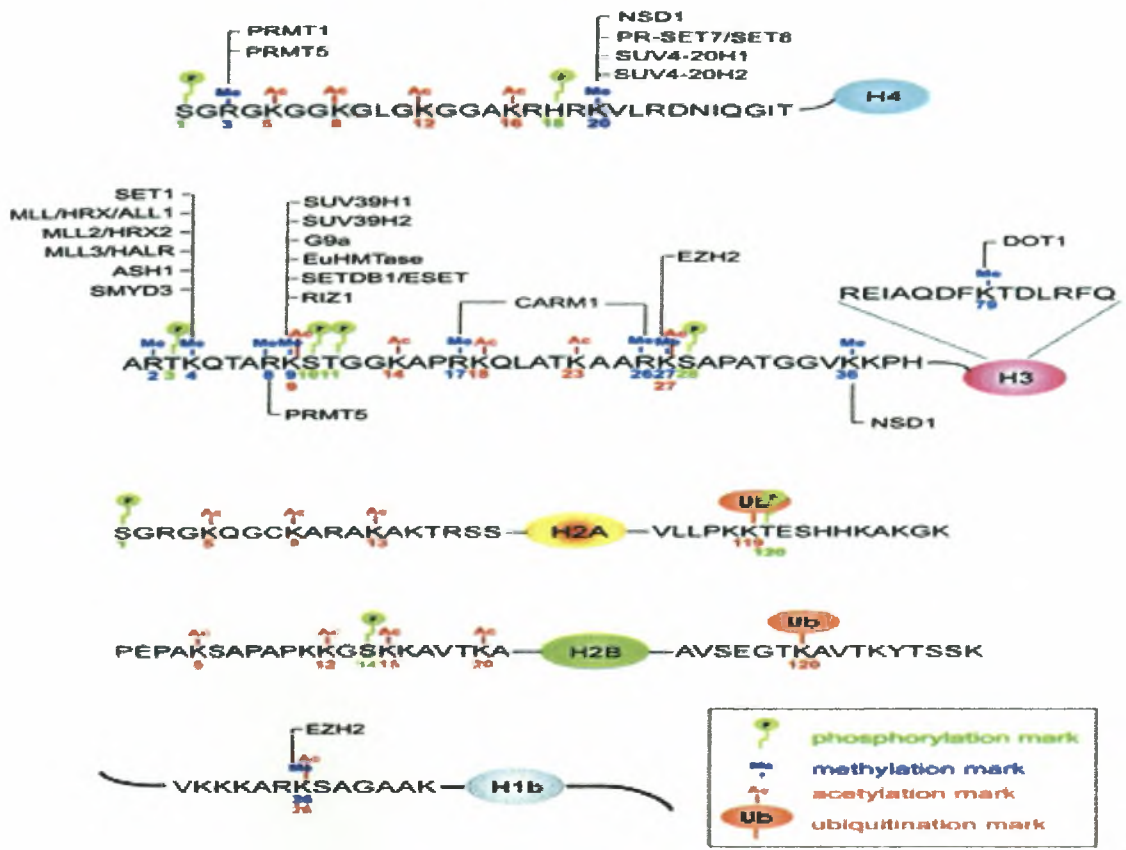
γονιδίων. Ο μηχανισμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα η de novo μεθυλίωση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες παραμένει άγνωστος. Οι εικασίες για την στοχευμένη DNA μεθυλίωση περιλαμβάνουν:

- (i) Αλληλουχία, συγκρότηση ή δευτεροταγής δομή του ίδιου DNA
- (ii) Μόρια RNA, τα οποία μπορεί να στοχεύουν περιοχές βάσει της συμπληρωματικότητας
- (iii) Ειδικές μη-ιστονικές πρωτεΐνες, τροποποιήσεις των ιστονών κ.ά.

2.1.2 Τροποποιήσεις ιστονών

Τα τελευταία χρόνια έγινε διακριτό ότι η χρωματίνη είναι ένα υψηλά εύκαμπτο σύστημα, στο οποίο συμβαίνουν συγχρονισμένες χωροταξικές και χρονολογικές αλλαγές, οι οποίες οδηγούν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η χρωματίνη αποτελείται από ιστόνες και μη-ιστονικές πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύονται στο γενωμικό DNA. Οκτώ (8) ιστόνες σχηματίζουν ένα νουκλεόσωμα —δύο μόρια από την ιστόνη H2A, δύο από την H2B, δύο από την H3 και δύο από την H4— γύρω από το οποίο τυλίγονται 146 bp DNA. Η ευκολία με την οποία οι μεταγραφικοί παράγοντες προσεγγίζουν τις αλληλουχίες του DNA εξαρτάται από την δομή της χρωματίνης. Μέχρις σήμερα έχουν χαρακτηριστεί δύο ξεχωριστές δομές: η συμπυκνωμένη μη-μεταγραφικά ενεργή ετεροχρωματίνη και η χαλαρωμένη μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη.

Οι ιστόνες είναι προσβάσιμες σε πληθώρα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Εικόνα 2) —ειδικά τα αμινοξέα στο άμινο-τελικό άκρο των ιστονών H3 και H4 και τα αμινοξέα στο άμινο- και καρβόξυλ- τελικό άκρο των ιστονών H2A, H2B και H1— όπως φωσφορυλίωση (των καταλοίπων S και T), ακετυλίωση (K), μεθυλίωση (K και R), ουβικουϊτιλίωση (K), σουμοϋλίωση (K), ADP ριβοσυλίωση, γλυκοσυλίωση, βιοτινυλίωση και καρβονυλίωση. Αν και οι τρεις πρώτοι τύποι τροποποιήσεων έχουν μελετηθεί εκτενώς, υπάρχουν σχετικά λίγες γνώσεις για τους υπόλοιπους.



Current Opinion in Genetics & Development

Εικόνα 2: Οι ιστόνες είναι επιρρεπείς σε ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Τα ένζυμα που καταλύουν την μεθυλίωση των ιστονών στα θηλαστικά, αναγράφονται πάνω ή κάτω από την θέση στόχο (3).

Η αναγνώριση της δυναμικής σχέσης μεταξύ των διαφόρων ιστονικών τροποποιήσεων έφερε στην επιφάνεια την υπόθεση του «κώδικα των ιστονών» (CD Allis, 2001). Αυτή η υπόθεση προτείνει ότι μια υπάρχουσα τροποποίηση σε ένα ειδικό κατάλοιπο ιστόνης καθορίζει μια επακόλουθη τροποποίηση στο ίδιο ή σε διαφορετικό μόριο ιστόνης. Πρόσφατες θεωρίες προτείνουν ότι οι υπάρχουσες τροποποιήσεις δρουν επιπλέον ως πρότυπα αναγνώρισης για μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις ιστόνες (4).

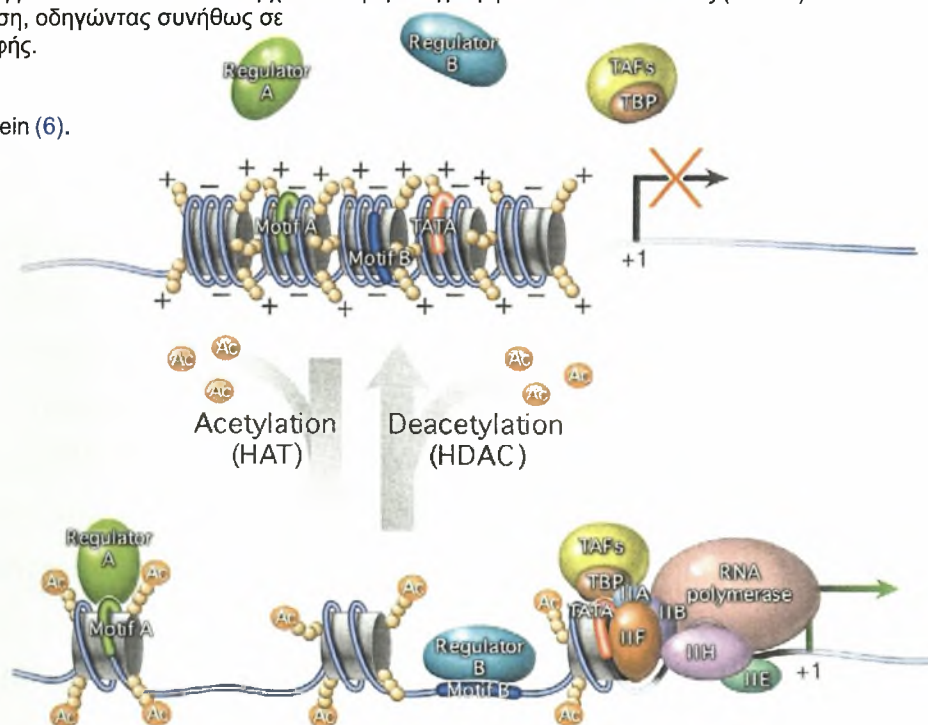
Ακετυλίωση των ιστονών

Η ακετυλίωση είναι ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός ομοιοπολικής τροποποίησης των ιστονών, ο οποίος καταλύεται από τα ένζυμα ακέτυλ-τρανσφεράσες των ιστονών (HAT). Η ακετυλίωση μειώνει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των ιστονών και του DNA «καλύπτοντας» το θετικό φορτίο του καταλοίπου λυσίνης, με αποτέλεσμα τη χαλαρωμένη δομή της χρωματίνης (Εικόνα 3). Εντούτοις, πλήρης

ακετυλίωση της ιστόνης H3, οδηγεί σε μείωση του θετικού φορτίου περίπου 10–30%, η οποία είναι πιθανόν αδύνατη να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις με το DNA (5). Ο κύριος ρόλος των ακετυλιωμένων ιστονών είναι να καθοδηγήσουν την πρόσδεση μη-ιστονικών πρωτεϊνών. Παραδείγματος χάριν, οι bromodomains (BMD) παρουσιάζουν ειδικότητα για ακετυλιωμένες λυσίνες και με αυτό τον τρόπο ερμηνεύουν τον «κώδικα των ιστονών».

Εικόνα 3: Οι ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών (HATs) μετατρέπουν την χρωματίνη από μια συμπυκνωμένη δομή σε μια χαλαρή μορφή, μειώνοντας την έλξη των ιστονικών πρωτεϊνών με τον σκελετό του DNA. Η χαλάρωση της χρωματίνης επιτρέπει σε κύτταρο-ειδικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες και το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης να προσεγγίσουν το DNA και να αρχίσουν την μεταγραφή. Οι από-ακετυλάσες (HDAC) καταλύουν την αντίστροφη αντίδραση, οδηγώντας συνήθως σε καταστολή της μεταγραφής.

Ac: ακετυλίωση, TAF: TBP-associated factor, TBP: TATA-binding protein (6).



Για τα περισσότερα από τα HAT ένζυμα έχει δειχθεί ότι κατέχουν λειτουργία συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής (7). Αντίστοιχα, πολλοί μεταγραφικοί συν-ενεργοποιητές, όπως ο p300 και ο CBP, επιδεικνύουν πραγματική HAT δραστηριότητα, η οποία ενισχύει την χαλάρωση της χρωματίνης.

Μεθυλίωση των ιστονών

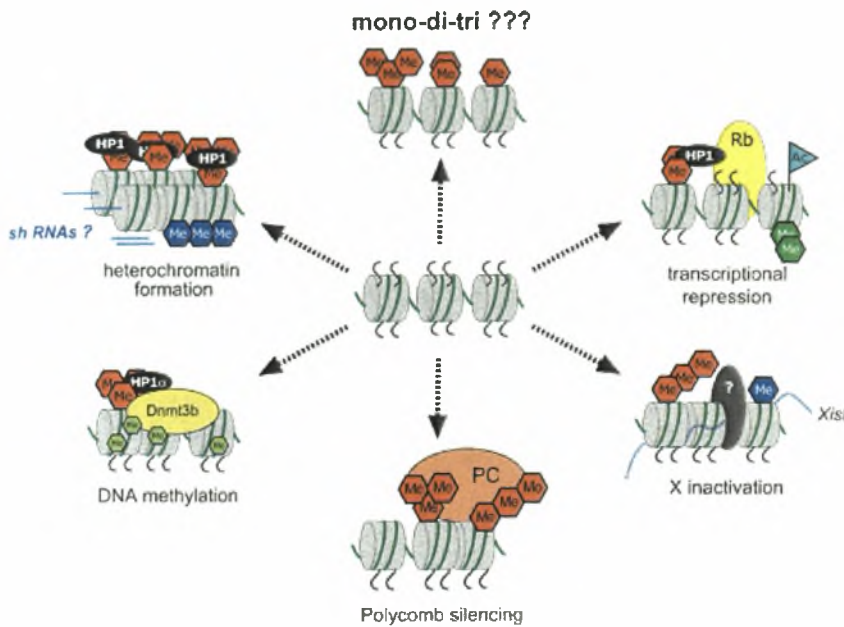
Η μεθυλίωση των ιστονών έλκυσε την προσοχή των ερευνητών πιο πρόσφατα, μέσω της ανακάλυψης της SET περιοχής, η οποία κωδικοποιεί πεπτιδίο με δράση μέθυλ-τρανσφεράσης N-λυσίνης (HMTase). Πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί πληθώρα από HMTases, οι οποίες θεωρείται ότι καταλύουν την προσθήκη μεθυλομάδων στο

άμινο-τελικό άκρο των ιστονών H3 (K4, K9, K27, K36) και H4 (K20). Το γονίδιο SuVar39h κωδικοποιεί μία HMT πρωτεΐνη, με μια SET περιοχή η οποία παρουσιάζει ειδικότητα για την K9 της ιστόνης H3. Τα κατάλοιπα λυσίνης (K) μπορούν να μόνο-, δι- και τρι-μεθυλιωθούν, με λειτουργική συνάφεια η οποία εξαρτάται από την θέση του αμινοξέος (Εικόνα 4). Για παράδειγμα, η δι- και τρι-μεθυλιωμένη K4-H3 συναντάτε σε μεταγραφικά ενεργά γονίδια, τουναντίον η δι- και τρι-μεθυλιωμένη K9-H3 είναι παρούσα σε μεταγραφικά ανενεργές χρωμοσωμικές περιοχές.

Μέχρι προσφάτως, η φαινομενική έλλειψη απο-μεθυλασών οδήγησε στην πεποίθηση ότι η μεθυλίωση είναι μια διαρκής επιγενετική ρύθμιση, της οποίας η άρση απαιτεί αντικατάσταση των ιστονών. Λόγω της έλλειψης αναστρεψιμότητας, θεωρήθηκε από πολλούς ερευνητές ότι εμπλέκεται στην διατήρηση των κυτταρικού καθορισμού κατά την ανάπτυξη (8). Όμως, η ανακάλυψη δυο ένζυμων από-μεθυλασών —LSD1 και Jmj-C— κλόνισε αυτήν την πεποίθηση (9).

Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι υψηλά επίπεδα μεθυλιωμένων CpG δινουκλεοτιδίων συμπίπτουν με ετεροχρωματικές περιοχές. Επιπλέον, μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG είναι παρούσες σε υπέρ-ακετυλιωμένες ιστόνες. Επίσης, πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι συστατικά του μηχανισμού μεθυλίωσης του DNA [π.χ. DNA μέθυλ-τρανσφεράσες και κάποιες μέθυλ-CpG-προσδενόμενες πρωτεΐνες (MBD)] στρατολογούν κατασταλτικά σύμπλοκα που περιέχουν από-ακετυλάσες των ιστονών. Παράλληλα, μερικές μελέτες προτείνουν ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι προαπαιτούμενες για την μεθυλίωση του DNA. Παρατηρήσεις που έγιναν σε μαγιά, φυτά και θηλαστικά καταδεικνύουν ότι η μεθυλίωση της K9-H3 δρα ως σήμα για την μεθυλίωση του DNA. Στα θηλαστικά, οι DNA μεθυλ-τρανσφεράσες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Suv39h1 και έλλειψη της Suv39h1 σε knock-out εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ελαττώνει την Dnmt3b-εξαρτώμενη μεθυλίωση των CpG στα κεντρομερή.

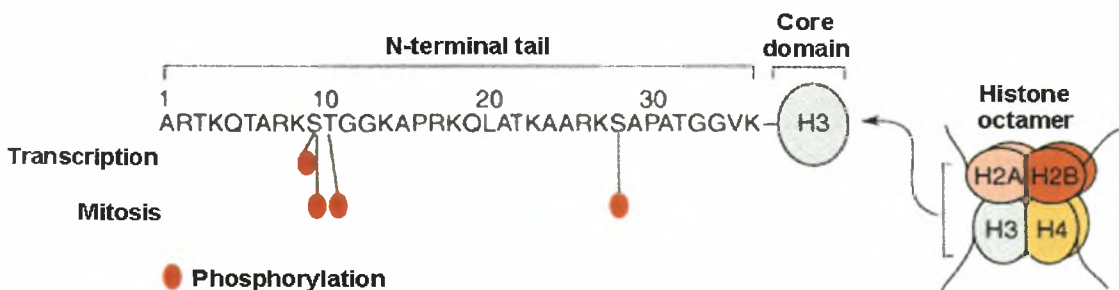
Η ανακάλυψη των K9-H3 μεθυλ-τρανσφερασών, όπως η SETDB1 και η CLLD8, οι οποίες έχουν μια ενσωματωμένη μέθυλ-CpG-προσδενόμενη περιοχή προτείνει ότι αυτά τα ένζυμα πιθανόν στρατολογούνται απ' ευθείας σε θέσεις όπου υπάρχει CpG μεθυλίωση. Η στρατολόγηση των DNA μεθυλ-τρανσφερασών σε θέσεις K9-H3 μεθυλίωσης, πιθανόν προάγεται από την πρωτεΐνη προσαρμογής HP1 (heterochromatin protein 1), η οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τις DNA μέθυλ-τρανσφεράσες των θηλαστικών.



Εικόνα 4: Πολλαπλοί ρόλοι για την μεθυλίωση της K9-H3 στην επιγενετική ρύθμιση. Η στρατολόγηση της HP1 και η πρόσδεση του συμπλόκου SuVar39h1/HP1 στην ετεροχρωματίνη ήταν η πρώτη λειτουργία που παρουσιάστηκε να εμπλέκεται η μεθυλιωμένη K9-H3. Αν και τα μέχρις στιγμής στοιχεία εστιάζονται στην δι-μεθυλιωμένη K9-H3, παραμένει να διαπιστωθεί ο ρόλος της μονό- και τρι-μεθυλίωσης (www.imp.ac.at/jenuwein/jen_p01.html).

Φωσφορυλίωση των ιστονών

Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στην σερίνη 10 σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση ενδιάμεσα πρώιμων γονιδίων, ωστόσο αυτή η τροποποίηση —όπως και η φωσφορυλίωση της S28-H3— συνδέονται επίσης με χρωμοσωμική συμπύκνωση κατά την μίτωση (Εικόνα 5).

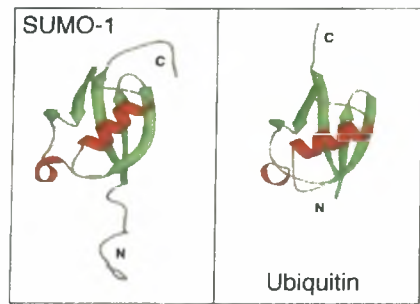


Εικόνα 5: Φωσφορυλίωση του αμινο-τελικού άκρου της ιστόνης H3. Οι θέσεις της φωσφορυλίωσης απεικονίζονται με κόκκινο. Οι σχετιζόμενες κυτταρικές λειτουργίες αναφέρονται στα αριστερά (10).

Σουμοϋλίωση ιστονών

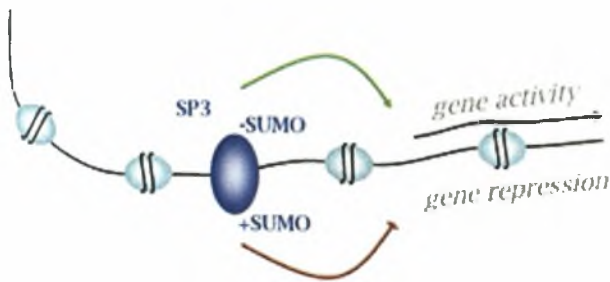
Η small ubiquitin-related modifier (SUMO) μοιράζεται 18% ομοιότητα με την ουβικουΐνη και διαθέτει παρόμοια τρισδιάστατη δομή (Εικόνα 6). Η λειτουργία της ουβικουΐτυλίωσης είναι η αποδόμηση πρωτεϊνών, ενώ της σουμοϋλίωσης όχι. Το μέγεθος της SUMO και της ουβικουΐνης (11 και 9 kDa, αντίστοιχα) τις διακρίνει ξεκάθαρα από τις υπόλοιπες γνωστές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών,

οι οποίες είναι όλες μικρές χημικές ομάδες. Η SUMO —όπως και το ATP-εξαρτώμενο μονοπάτι σύζευξή της στα υποστρώματα— είναι συντηρημένη σε όλους τους ευκαριώτες που ερευνήθηκαν, από την μαγιά έως και τους ανθρώπους. Η SUMO έχει δειχθεί ότι προσδένεται σε πολλές πρωτεΐνες, αλλά για να κατανοήσουμε την σουμοϋλίωση των ιστονών, είναι ευκολότερο να μελετήσουμε τις επιδράσεις τις σε DNA-προσδεδόμενους μεταγραφικούς παράγοντες.



Εικόνα 6: Η SUMO σχετίζεται σε υψηλό βαθμό με την ουβικουΐνη. Τα διαγράμματα καταδεικνύουν την ομοιότητα των τριδιάστατων δομών τους. Η SUMO έχει μια επέκταση στο N-τελικό άκρο που απουσιάζει από την ουβικουΐνη (11).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες πρέπει να έχουν σταθερή έκφραση, να μεταφέρονται στον πυρήνα, να προσδένονται στο DNA ή σε άλλες πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται και αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες —συμπεριλαμβανομένων της RNA πολυμεράσης, συν-ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς και σύμπλοκα αναδιάταξης της χρωματίνης— ώστε να ρυθμίσουν την μεταγραφή. Κάθε μια από αυτές τις λειτουργίες μπορεί να υποστεί ρύθμιση μέσω της SUMO τροποποίησης. Η σουμοϋλίωση μερικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο TCF-4 (T-cell factor-4), έχει προταθεί ότι αυξάνει την μεταγραφική ενεργοποίηση ή να αναστέλλει την μεταγραφική καταστολή. Εντούτοις,



Εικόνα 7: Η τροποποίηση με SUMO καταστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα Sp3 (www.uni-giessen.de/.../forscherguppe/pro8.htm)

στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με SUMO αναστέλλουν την δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων (55). Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η σουμοϋλίωση ρυθμίζει την δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων δεν είναι πλήρως

κατανοητοί, πρόσφατες πρόοδοι προτείνουν μια από τις συνέπειες της σουμοϋλίωσης είναι η προώθηση αλληλεπίδρασης με συν-καταστολείς (12). Η πρωτεΐνη Sp3, ένα μέλος της οικογένειας των GC-box προσδεδόμενων παραγόντων, είναι ο καλύτερα μελετημένος μεταγραφικός παράγοντας που υπόκειται ρύθμιση από SUMO. Η τροποποίηση λαμβάνει χώρα στο κατάλοιπο λυσίνης K551 και καταλύεται από την SUMO E3 λιγάση PIAS1. Η σουμοϋλίωση αναστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα της Sp3 (54).

Το άμινο-τελικό άκρο της ιστόνης H4 περιέχει πέντε λυσίνες, οι οποίες είναι όλες υποψίες για σουμοϋλίωση. Εντούτοις, καμία από τις ιστονικές πρωτεΐνες —συμπεριλαμβανομένης της ιστόνης H4— δεν περιέχει την συντηρημένη αλληλουχία για σουμοϋλίωση (-Lys-X-Glu, το οποίο είναι ένα υψηλά υδροφοβικό τριπεπτίδιο όπου X είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ). Επιπροσθέτως, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, πολλά από τα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να υποστούν άλλες τροποποιήσεις (π.χ. μεθυλίωση). Συμπερασματικά, είναι εξαιρετικά δύσκολο να μελετηθεί η φυσιολογική σημασία της σουμοϋλίωσης σε ιστονικές πρωτεΐνες (13).

Histone modification	Modifying enzymes	Demodifying enzymes	Primary transcriptional effect	Nature of modification
Acetylation	HATs	HDACs	Activation	Dynamic
Methylation	HMTs	LSD 1	Activation/Repression	Static/Dynamic
Phosphorylation	MAP kinases	Phosphatases	Activation	Dynamic
Ubiquitylation	Rad6*	Ubiquitin proteases	Activation	Dynamic
Sumoylation	UBC9	ULP-related protease**	Repression	Dynamic

Πίνακας 2: Σύνοψη των τροποποιήσεων των ιστονών και τα χαρακτηριστικά τους.

* η πρωτεΐνη UBC9 (συντηρημένη από την μαγιά έως τον άνθρωπο) είναι η μόνη μέχρι στιγμής γνωστή E2 SUMO-λιγάση και η πρωτεΐνη της μαγιάς Rad6 είναι μια E2 ουβικουΐτίνη που ουβικουΐτυλιώνει ιστόνες *in vivo*.

**Αν και η από-σουμοϋλίωση των ιστονών δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί, μελέτες σε άλλα υποστρώματα σουμοϋλίωσης απεκάλυψαν την παρουσία ULP πρωτεασών (13).

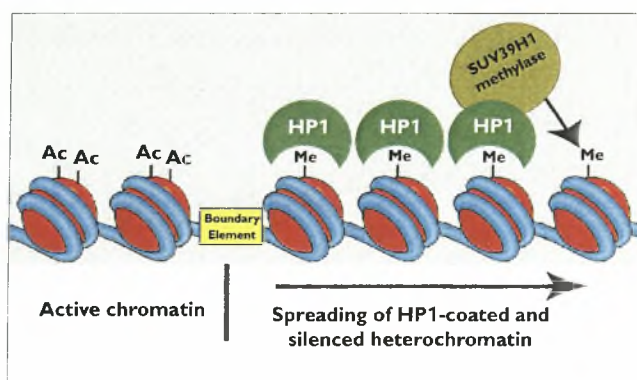
2.1.3 Μη ιστονικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες

Η πρώτη απόδειξη ότι η συμπυκνωμένη δομή της χρωματίνης επηρεάζει την ενεργότητα των γονιδίων προέκυψε από πειράματα ακτίνων-X στην *Drosophila*, τα οποία παρουσίασαν μωσαϊκή έκφραση του γονιδίου *white* στα μάτια. Αυτή η μερική αποσιώπηση του γονιδίου βρέθηκε να οφείλεται σε χρωμοσωμική μετατόπιση του *white* γονιδίου από την φυσιολογική ευχρωματική εντόπισή του στην γειτονική κεντρομερική ετεροχρωματίνη. Το φαινόμενο ονομάστηκε PEV (position effect variegation). Κατά την δεκαετία του '80 πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταλλαγόμενης τα οποία συνέβαλλαν στην κατανόησή μας για την αποσιώπηση γονιδίων μεσολαβούμενη από την ετεροχρωματίνη. Τα αποτελέσματα απεκάλυψαν περισσότερα από 100 γονίδια τα οποία ενισχύουν [E(Var)s] ή καταστέλλουν [Su(Var)s] το φαινόμενο PEV όταν μεταλλάσσονται (14).

Ένα από τα καλύτερα παραδείγματα των καταστολέων της PEV είναι το γονίδιο SuVar2-5, το οποίο κωδικοποιεί την ετεροχρωματική πρωτεΐνη 1 —heterochromatin

protein 1 (HP1). Η HP1 προσδένεται σε περιοχές ετεροχρωματίνης στους ανώτερους ευκαριώτες. Η πρόσδεσή της σε ειδικές περιοχές του γενώματος θεωρείται ότι είναι το κρίσιμο γεγονός για τον σχηματισμό, την επέκταση και την διατήρηση της συμπυκνωμένης δομής της χρωματίνης (Εικόνα 8). Αυτή η λειτουργία, όπως ήδη γνωρίζουμε, είναι στενά συνδεδεμένη με την μεθυλίωση των ιστονών και την αναδιάταξη της χρωματίνης (2).

Η εντόπιση και οι ρόλοι της HP1 στις ετεροχρωματινικές περιοχές δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί. Εντούτοις, είναι ξεκάθαρο ότι η HP1 δεν εντοπίζεται μόνο σε ετεροχρωματινικές περιοχές αλλά επίσης και σε ευχρωματινικές. Η HP1 αλληλεπιδρά με την χρωματίνη μέσω πρόσδεσης της μεθυλιωμένη K9-H3 και της chromodomain (CD). Η μεθυλίωση της K9-H3 είναι άφθονη σε



Εικόνα 8: Η HP1 αναγνωρίζει μεθυλιωμένες K9-H3 και βοηθά στον σχηματισμό, την επέκταση και την διατήρηση της ετεροχρωματίνης (www.biochemsoctrans.org/.../0741/bst0310741.htm)

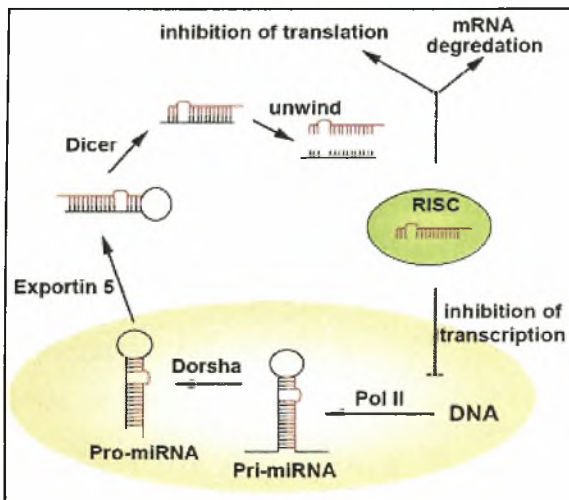
περιοχές περικεντρομερικής ετεροχρωματίνης, με συνέπεια η HP1 να συναντάτε περισσότερο σε εκείνες τις περιοχές. Συμπερασματικά, η αλληλεπίδραση της HP1 και της χρωματίνης μπορεί να εμποδιστεί με την χρήση ενός δραστικού αναστολέα των από-ακετυλασών (HDAC) —όπως η trichostatin A (TSA)— με αποτέλεσμα αναστολή της μεθυλίωσης της K9-H3 μέσω ακετυλίωσης.

Πρόσφατα η έρευνα έχει εστιαστεί στην εύρεση «συνεργατών» της HP1. Έχουν ταυτοποιηθεί πολλές υποψήφιες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν ως κύριο ρόλο την αποσιώπηση γονιδίων. Το γονίδιο SuVar39h1 είναι ένας επίσης κύριος καταστολέας της PEV, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με δραστικότητα HMTase με μια περιοχή chromodomain (CD). Η πρωτεΐνη είναι άφθονη σε ετεροχρωματινικές περιοχές και μπορεί να υποστεί ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιώντας αντίσωμα εναντίον της HP1 σε κυτταρικά εκχυλίσματα ποντικού και ανθρώπου. Ο παράγοντας της μεταγραφής TIF1α (Transcription Intermediary Factor 1α) αλληλεπιδρά με ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς, πληθώρα πρωτεϊνών που διαθέτουν KRAB περιοχές —οι οποίες μπορούν να δρουν ως συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής μέσω ενεργοποίησης από σύμπλοκα προσδέτη-υποδοχέα— και συν-καταστολείς που διαθέτουν μια KRAB περιοχή. Μελέτη δυο υβριδίων στην μαγιά με cDNA βιβλιοθήκη από έμβρυα ποντικού χρησιμοποιώντας τον TIF1α επανέκτησε κλώνους που κωδικοποιούσαν την HP1α —το ομόλογο της HP1

στα θηλαστικά. Η φυσιολογική σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι εμφανής, αφού μέχρι στιγμής δεν έχει παρατηρηθεί καμία σημαντική πυρηνική συν-εντόπιση των δυο πρωτεϊνών (15).

2.1.3 Αποσιώπηση μεσολαβούμενη από RNAs

Τα μικρού μεγέθους μη-κωδικά μόρια RNAs: siRNAs και miRNAs (small interfering RNAs και micro RNAs, αντίστοιχα) εμπλέκονται στην αποσιώπηση γονιδίων και επαναλαμβανόμενων στοιχείων στο DNA. Τα siRNAs και τα miRNAs μπορούν να καταστείλουν την γονιδιακή έκφραση μέσω ποικίλων μηχανισμών, δρώντας σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Δημιουργούν διμερή με το mRNA, τα οποία αποικοδομούνται από ενδονουκλεάσες ή καταστέλλουν την μετάφραση των mRNA στόχων. Αυτός ο



Εικόνα 9: Διαδικασία αποσιώπησης μέσω RNA παρεμβολής

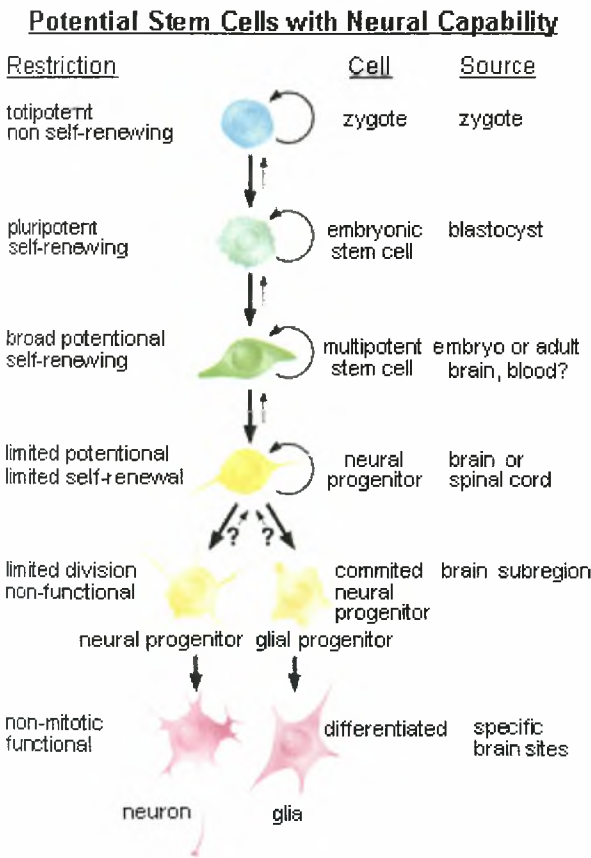
μηχανισμός αποσιώπησης που μεσολαβείται από RNA καλείται RNA παρεμβολή (RNA interference-RNAi). Τα miRNAs είναι μη-κωδικά μετάγραφα μεγέθους 18-25 νουκλεοτιδίων (nt), προέρχονται από μεγάλους μεγέθους μετάγραφα (pri-miRNAs), τα οποία μετατρέπονται στο πυρήνα σε ~70 nt πρόδρομα-miRNAs (pro-miRNAs) από την RNase III Droscha. Αυτά τα πρόδρομα μόρια έχουν δομή φουρκέτας, η οποία αποκόβεται από το ένζυμο Dicer με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ωρίμων μορίων miRNA. Το ώριμο πλέον κυτταροπλασματικό miRNA ενσωματώνεται στο σύμπλοκο RNA-induced silencing complex (RISC), ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που τεμαχίζει τον mRNA στόχο ή καταστέλλει την μετάφρασή του (Εικόνα 9) (Lewin, 8^η έκδοση).

Πρόσφατα, δείχθηκε ότι αυτά τα μη-κωδικά μόρια RNAs εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της κυτταρικής διαφοροποίησης, της διατήρησης της βλαστικότητας και της γονιδιακής αποτύπωσης. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή των μορίων mi/siRNAs στον σχηματισμό ετεροχρωματικών περιοχών, μέσω πρόσδεσής τους σε ομόλογες περιοχές στο DNA. Έχει δεχτεί στην μαγιά, η ύπαρξη

μορίων siRNA, τα οποία είναι συμπληρωματικά με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα κεντρομερή και εμπλέκονται στην μεθυλίωση της K9-H3. Παρόμοια στοιχεία έχουν ανακαλυφθεί και για την *Drosophila* (1).

2.2 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ΕΒΚ)

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα κατέχουν δυο ξεχωριστές ιδιότητες. Είναι ικανά για αυτό-ανανέωση και —όντας πλειοδύναμα— μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο συμπεριλαμβανομένου των γενετικών κυττάρων. Ο όρος «πλειοδύναμος» (pluripotent) χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα βλαστικά κύτταρα



Εικόνα 10: Τάξεις των θηλαστικών βλαστικών κυττάρων που δίνουν γένεση σε νευρώνες, διευθετημένα ιεραρχικά από το πιο αρχέγονο και πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο προς το πιο καθορισμένο. Τα μικρά βέλη υποδεικνύουν την δυνατότητα αποδιαφοροποίησης (17).

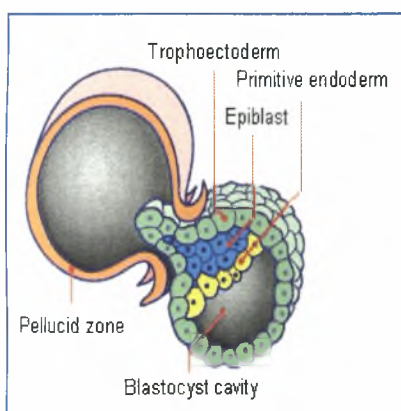
που μπορούν να δώσουν γένεση σε οποιοδήποτε κύτταρο προέρχεται από τα τρία εμβρυικά στρώματα —μεσόδερμα, ενδόδερμα και εξώδερμα. Η πρόθεση «πλειο» —προέρχεται από το λατινικό «plures»—σημαίνει αρκετά ή πολλά. Συνεπώς, τα πλειοδύναμα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να δώσουν γένεση σε κάθε κυτταρικό τύπο, μια ιδιότητα που παρατηρείται στο φυσιολογικό πλαίσιο της εμβρυικής ανάπτυξης, όπως επίσης και υπό συγκεκριμένες εργαστηριακές συνθήκες. Ο όρος «ολοδύναμος» (totipotent) —από το λατινικό «totus» που σημαίνει ολόκληρος— χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα κύτταρα, τα οποία έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν όλα τα κύτταρα και τους ιστούς που αποτελούν το έμβρυο και που στηρίζουν την ανάπτυξή του

στην μήτρα. Το μόνο πραγματικά ολοδύναμο κύτταρο είναι το γονιμοποιημένο ωάριο. Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να δώσουν γένεση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, των οποίων όμως ο αριθμός είναι περιορισμένος. Ένα παράδειγμα

πολυδύναμου κυττάρου είναι το νευρικό βλαστικό κύτταρο (NBK) το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί σε πολλούς τύπους νευρικών κυττάρων, αλλά όχι σε κύτταρα του αίματος ή άλλους κυτταρικούς τύπους (16). Η σχέση μεταξύ πλειοδύναμων και πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων παραμένει αδιευκρίνιστη και η πιθανότητα για κυτταρική εναλλαγή μεταξύ αυτών των κυττάρων παραμένει κρίσιμο θέμα για την επιστήμη της βιολογίας βλαστικών κυττάρων.

2.2.1 Μοριακά γεγονότα κατά την πρώιμη ανάπτυξη στον ποντικό

Η 4.5 ημερών (embryonic day 4.5-E4.5) βλαστοκύστη ποντικού, κατά την στιγμή της εμφύτευσης, αποτελείται από τρεις κυτταρικούς τύπους: τα κύτταρα του επιβλάστη —ο οποίος καλείται επίσης αρχέγονο εξώδερμα—, τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος και τα κύτταρα του αρχέγονου ενδόδερματος (18, 19). Ο επιβλάστης και το αρχέγονο ενδόδερμα αποτελούν την εσωτερική κυτταρική μάζα (ΕΚΜ) της βλαστοκύστης. Μελέτες



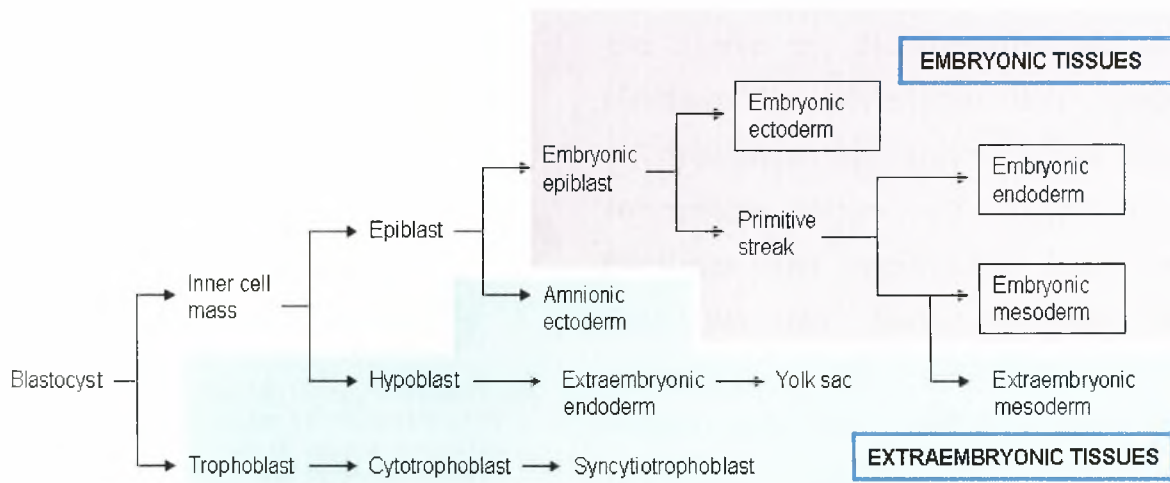
Εικόνα 11: Η βλαστοκύστη εξέρχεται της μερικώς αποσυντιθέμενης διαφανής ζώνης (18).

με χρήση χιμαιρικών και ανασχηματισμένων βλαστοκυστεών, αποκάλυψαν ότι αυτοί οι τρεις κυτταρικοί τύποι δίνουν ξεχωριστούς ιστούς κατά την ανάπτυξη (Εικόνα 11). Το τροφοεξώδερμα (TE) δίνει γένεση σε όλες τις τροφοβλαστικές σειρές που σχηματίζονται από τον εμβρυϊκό πλακούντα. Το αρχέγονο ενδόδερμα (PE) σχηματίζει το σπλαχνικό και πλευρικό ενδόδερμα. Ο επιβλάστης (Epi) δίνει γένεση σε ολόκληρο το έμβryo, το άμνιον, την αλλαντοΐδα καθώς και τους εξωεμβρυϊκούς μεσοδερμικούς ιστούς που επικαλύπτουν το εσωτερικό του λεκιθικού σάκου.

Οι εξωεμβρυϊκές κυτταρικές σειρές TE και PE είναι απαραίτητες για την ανταλλαγή θρεπτικών και άλλων συστατικών με το περιβάλλον της μήτρας. Επίσης, έχει γίνει εμφανές ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην σηματοδότηση προς τον επιβλάστη για την εγκαθίδρυση του αξονικού προτύπου στο έμβryo.

Είναι πολύ κρίσιμο να κατανοήσουμε το πώς αναπτύσσονται οι τρεις διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι της βλαστοκύστης. Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει ότι η κυτταρική εξειδίκευση των κυττάρων της ΕΚΜ —τα πλειοδύναμα κύτταρα της βλαστοκύστης— οφείλεται στην περιορισμένη έκφραση πολλών μεταγραφικών παραγόντων

συμπεριλαμβανομένου του Oct4 (γονίδιο Pou5f1), του Nanog και του Sox2 —οι οποίοι έχουν θεμελιώδη ρόλους κατά την πρώιμη ανάπτυξη και απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των αδιαφοροποίητων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ιδιότητα αυτό-ανανέωσης) σε καλλιέργεια. Η Oct4 είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει μια POU περιοχή και εκφράζεται στα ωκύτταρα και σε όλα τα βλαστομερή κατά το στάδιο της αυλάκωσης. Η έκφρασή της Oct4 περιορίζεται στην ΕΚΜ κατά το στάδιο της βλαστοκύστης και διατηρείται στον επιβλάστη (αρχέγονο εξώδερμα) του εμβρύου πριν την γαστριδιοποίηση έως και τον σχηματισμό των αρχέγονων γενετικών κυττάρων, όπου περιορίζεται στα κύτταρα της γενετικής σειράς (20). Εκφράζεται επίσης στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ΕΒΚ). Συμπερασματικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τα κύτταρα που είναι πλειοδύναμα.



Εικόνα 12: Πρώιμη ανάπτυξη στον ποντικό (19, διασκευή).

Ο Sox2 εκφράζεται σε όλα τα βλαστομερή κατά το στάδιο της αυλάκωσης και περιορίζεται στην ΕΚΜ και τον Ερί στο στάδιο της βλαστοκύστης. Έχει δειχθεί ότι

Gene	sox element	Space	oct element	Orientation	Location
Fgf4	CTTTGTT	3	ATGCTAAT	Forward	3'
Utf1	CATTGTT	0	ATGCTAGT	Reverse	3'
Sox2	CATTGTG	0	ATGCATAT	Forward	3'
Fbx15	CATTGTT	0	ATGATAAA	Reverse	5'
Nanog	CATTGTA	0	ATGCAAAA	Reverse	5'
Pou5f1	CTTTGTT	0	ATGCATCT	Reverse	5'

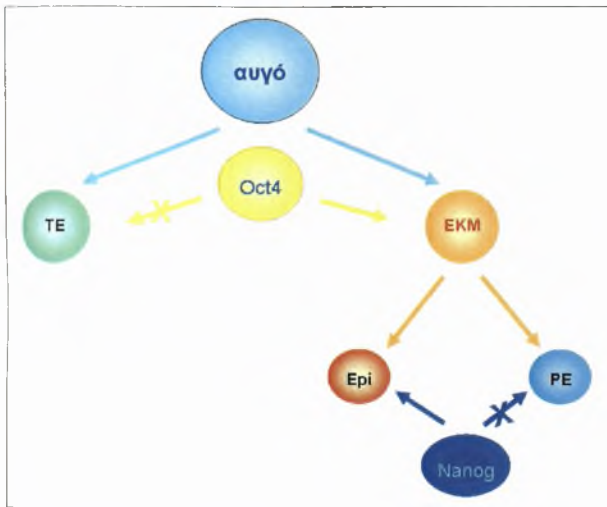
συνεργάζεται με τον Oct4 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων, τα οποία εκφράζονται στην ΕΚΜ. Αυτά τα γονίδια περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τον Oct4 και τον Sox2 σε στενή απόσταση, στις οποίες οι δυο αυτοί παράγοντες

Πίνακας 3: Μοριακά χαρακτηριστικά γνωστών Sox2/Oct4 γονιδίων στόχων (21, 47, 43, 24, 22, 23).

δημιουργούν σύμπλοκο και ενεργοποιούν την μεταγραφή. Χωρίς την συγκρότηση συμπλόκου δεν παρουσιάζεται ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων.

Αν και ο Oct4 και οι πρωτεΐνες με τις οποίες συνεργάζεται είναι θεμελιώδεις για την διατήρηση της πλειοδυναμίας και την καταστολή της διαφοροποίησης, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπ' όψη. Στα EBK, η έκφραση του Oct4 δεν είναι επαρκής, ώστε να διατηρηθεί η βλαστικότητα τους αν απουσιάζει ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor-LIF), προτείνοντας ότι πρέπει να υπάρχουν παράγοντες που ενεργοποιούνται από τον LIF και επηρεάζουν την πλειοδυναμία.

Το Nanog είναι ένα γονίδιο που ανακαλύφθηκε πρόσφατα (50), του οποίου η έκφραση μπορεί να διατηρήσει τα EBK σε αδιαφοροποιημένη μορφή ακόμα και απουσία του LIF (51). Στο έμβρυο, η έκφραση του Nanog αρχίζει στην EKM του ώριμου μοριδίου, διατηρείται στον Epi στο στάδιο της βλαστοκύστης και μετά εξασθενεί. Ένα μοντέλο που θα μπορούσε να περιγράψει την ανάπτυξη των τριών κυτταρικών τύπων της βλαστοκύστης βασίζεται στην προοδευτική δράση του Oct4 και του Nanog (Εικόνα), για καταστολή της ανάπτυξης του

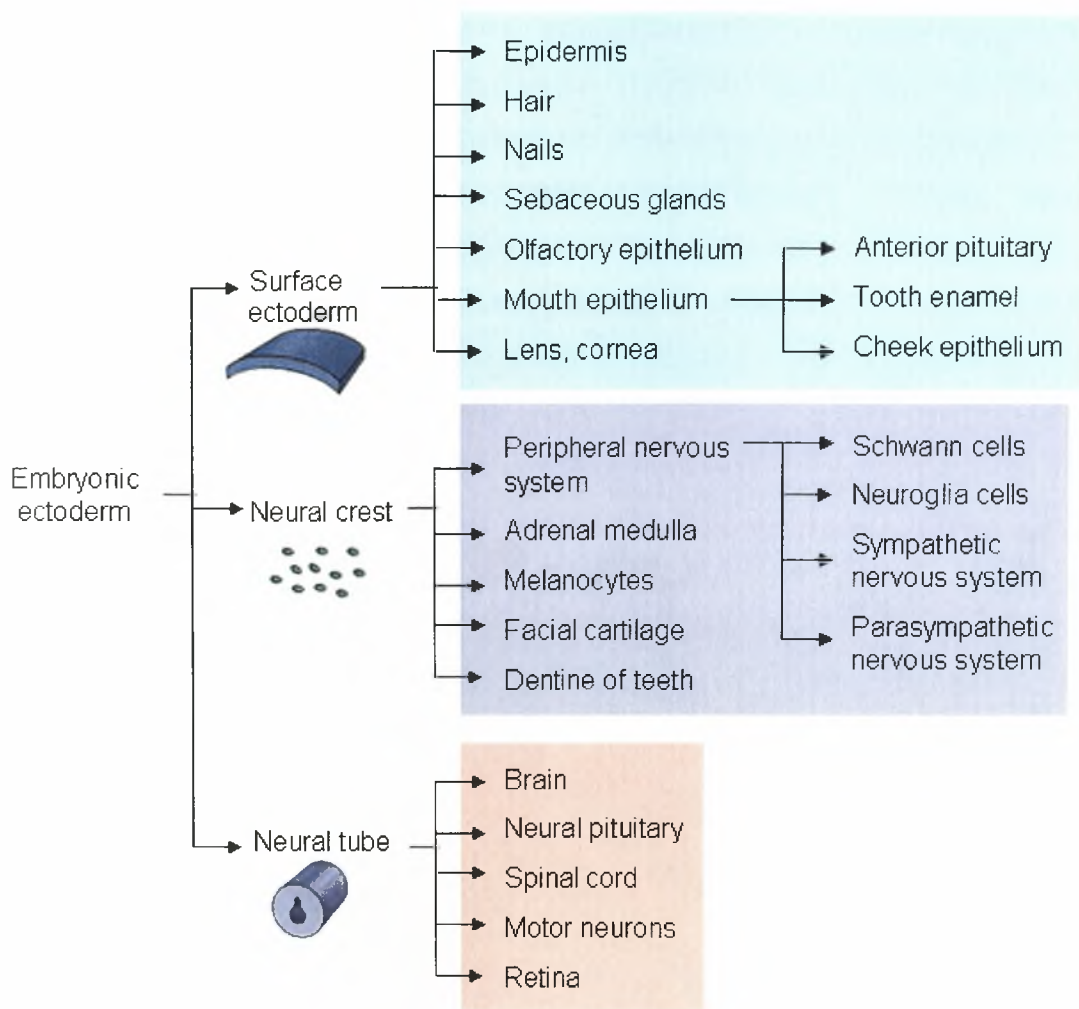


Εικόνα 13: Τα βλαστομερή του αυγού αρχικά δίνουν κύτταρα της EKM ή κύτταρα του TE, γεγονός που εξαρτάται από τα επίπεδα της έκφρασης του Oct4. Κατόπιν, τα κύτταρα της EKM διαφοροποιούνται περαιτέρω σε Epi ή PE ανάλογα με την έκφραση του Nanog.

τροφοεξωδέρματος (TE) και του αρχέγονου ενδοδέρματος (PE) και προώθηση της ανάπτυξης του επιβλάστη

(Epi). Εντούτοις, αυτό το μοντέλο γεννά την απορία το πώς περιορίζεται η έκφραση του Oct4 και του Nanog στην EKM (20).

Την E8.0 το αρχέγονο εξώδερμα την εμφυτευμένης βλαστοκύστης έχει δημιουργήσει το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα του γαστριδίου. Το εμβρυϊκό εξώδερμα είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό της επιδερμίδας και του νευρικού συστήματος. Το ενδόδερμα θα δώσει γένεση στο πεπτικό σύστημα και το μεσόδερμα σε μυς, οστά και κυκλοφοριακό σύστημα.



Εικόνα 14: Στο τέλος της γαστριδιοποίησης έχει σχηματιστεί το εμβρυϊκό εξώδερμα, από το οποίο θα σχηματιστεί το κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα και η επιδερμίδα (19, διασκευή)

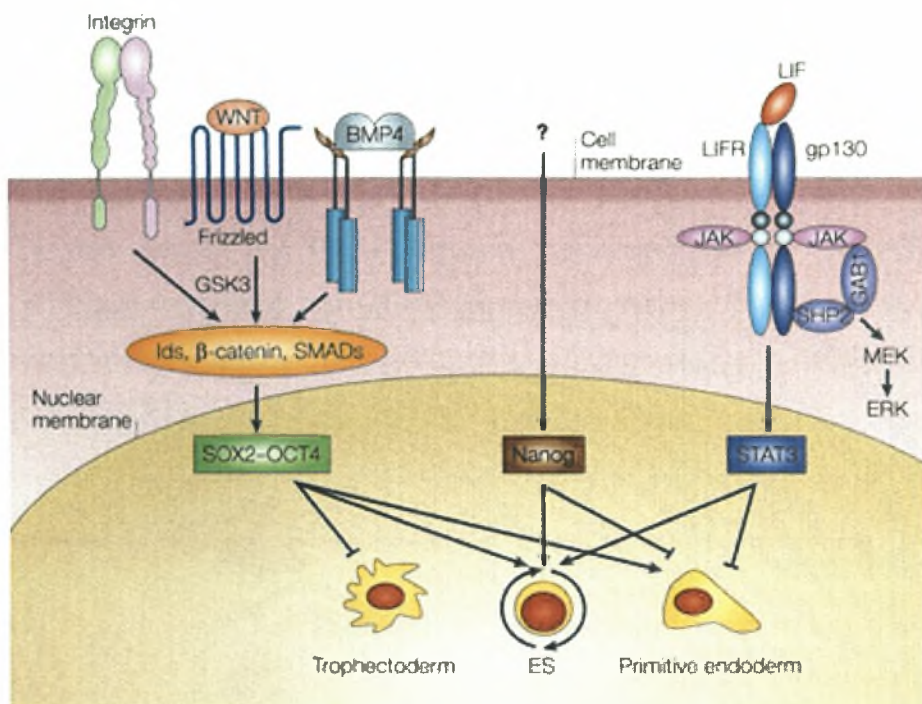
2.2.2 Σηματοδότηση στα βλαστικά κύτταρα

Αρκετοί εξωγενείς παράγοντες, οι οποίοι είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την μεταγραφή, βρέθηκε από *in vitro* και *in vivo* μελέτες ότι συντονίζουν την πλειοδυναμία των βλαστικών κυττάρων. Αξιόλογα αποτελέσματα, δείχνουν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε σηματοδότηση και μεταγραφική ρύθμιση, κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταγράφων στα EBK και αποτελούν το 17% των γονιδίων που υπερ-εκφράζονται στα πλειοδύναμα σε σχέση με τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (26). Από τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια το καλύτερα μελετημένο, μέχρις στιγμής, είναι αυτό του LIF υποδοχέα (LIFR)-STAT3.

Ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF) είναι απαραίτητος *in vitro* για την διατήρηση των EBK του ποντικού σε αδιαφοροποίητη μορφή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει

το γεγονός ότι ο LIF είναι ικανός να υποστηρίξει αυτήν την λειτουργία μόνο παρουσία ορού, προτείνοντας ότι πρέπει να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που απαιτούνται. Ο LIF ασκεί την δράση του όταν δεσμεύεται στον ετεροδιμερή υποδοχέα LIFR–gp130 στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς μεταβιβάζουν σήματα από το περιβάλλον του κυττάρου προς τον πυρήνα (Εικόνα 15: λεπτά μαύρα βέλη) και διεγείρουν θεμελιώδης μεταγραφικούς παράγοντες που επηρεάζουν την πλειοδυναμία —όπως ο Oct4, ο Sox2 και ο Nanog— και μεταγραφικούς παράγοντες αυτό-ανανέωσης όπως ο STAT3 (25).

Εικόνα 15: Συνδυασμός των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην διατήρηση της πλειοδυναμίας των EBK του ποντικού (25).



Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες έχουν εστιαστεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση των τριών αυτών μεταγραφικών παραγόντων —Oct4, Sox2 και Nanog— και την σειρά με την οποία εμφανίζονται στην ρύθμιση της πλειοδυναμίας. Τα δεδομένα, τα οποία αυξάνονται σταδιακά, ενισχύουν την πεποίθηση ότι το σύμπλοκο Oct4/Sox2 βρίσκεται στην κορυφή της ιεραρχίας στην ρύθμιση της πλειοδυναμίας των EBK.

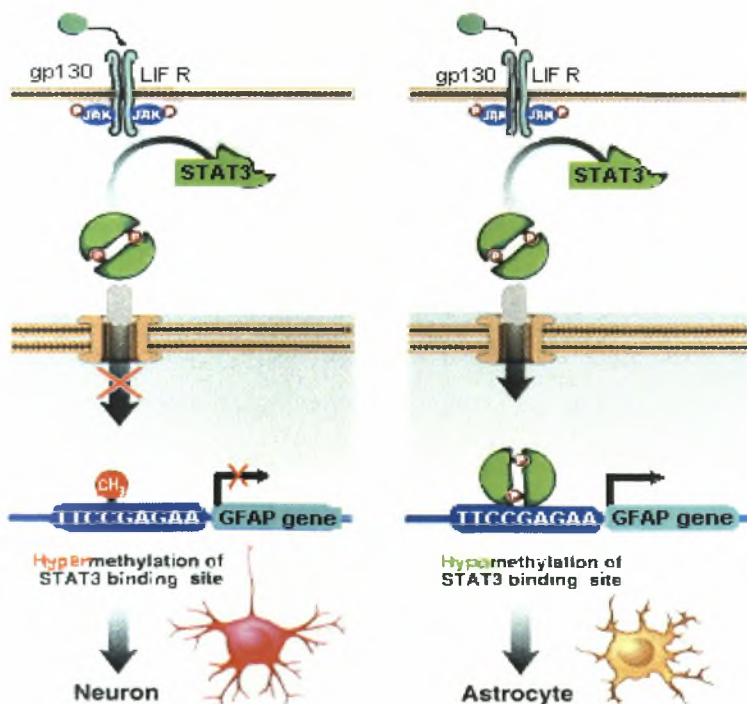
2.3 Επιγενετική και βλαστικά κύτταρα

Μέχρι πρόσφατα η βιολογία βλαστικών κυττάρων και η έρευνα στην επιγενετική παρουσίαζαν διαφορετικές πορείες ανάπτυξης. Τα τελευταία χρόνια όμως, έγινε κατανοητό ότι η μετάβαση από το πλειοδύναμο στάδιο προς τα πιο καθορισμένα

αναπτυξιακά στάδια, σχετίζεται με γενικές αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση, το οποίο είναι αποτέλεσμα της ρύθμισης μέσω μεταγραφικών παραγόντων σε συνδυασμό με επιγενετικές τροποποιήσεις. Τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι στιγμής είναι περιορισμένα και ανεπαρκή, ώστε να εξαχθεί ένα γενικό συμπέρασμα, ωστόσο είναι χρήσιμα για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την μεταγραφική ρύθμιση σε κρίσιμα αναπτυξιακά γεγονότα.

Μεθυλίωση του DNA

Η έκφραση του γονιδίου GFAP (ενός γενετικού δείκτη των αστροκυττάρων) είναι ελεγχόμενη μέσω μεθυλίωσης του DNA. Ο εκκινητής του GFAP περιέχει μια θέση πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3. Τα πρόδρομα κύτταρα του τελεγκέφαλου (E11.5) δεν εκφράζουν GFAP, ακόμα και παρουσία του STAT3. Αργότερα, κατά την E14.5, ο εκκινητής του GFAP μπορεί να ενεργοποιηθεί από τον STAT3 (Εικόνα). Ο προτεινόμενος μηχανισμός για αυτό το φαινόμενο είναι η μεθυλίωση της θέσης πρόσδεσης του STAT3.



Εικόνα 16: Αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης της θέσης πρόσδεσης του Stat3 ρυθμίζουν την μετάβαση από την νευρογένεση στην γλιογένεση στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο. Στα πρόδρομα νευροεπιθηλιακά κύτταρα του τελεγκέφαλου (E11.5), η ενεργοποίηση της GFAP καταστέλλεται μέσω μεθυλίωσης CpG δινουκλεοτιδίων. Αργότερα κατά την E14.5, η απομεθυλίωση της θέσης πρόσδεσης του STAT3 οδηγεί στην ενεργοποίηση του εκκινητή της GFAP στα νευροεπιθηλιακά κύτταρα και διαφοροποίηση τους σε αστροκύτταρα (6).

Ακετυλίωση των ιστονών

Υπάρχουν τουλάχιστον 11 HDACs (αποακετυλάσες των ιστονών-histone deacetylases) στους ανθρώπους, οι οποίες χωρίζονται σε δυο τάξεις —την τάξη I και την II. Η τάξη I των HDACs εκφράζεται ευρέως, ενώ η τάξη II HDACs εκφράζεται εκ των πλείστων στην καρδιά, τους σκελετικούς μυς και τον εγκέφαλο. Πειράματα με Northern blot σε πρόδρομα κύτταρα ιππόκαμπου από έμβρυα αρουραίων απεκάλυψαν ότι η έκφραση των HDACS της τάξης II αυξανόταν όταν τα κύτταρα άρχιζαν να διαφοροποιούνται. Η έκφραση των HDACs της τάξης I παρέμενε αμετάβλητη, προτείνοντας έναν ρυθμιστικό ρόλο για τις HDACs της τάξης II κατά την νευρική διαφοροποίηση (6).

Αποσιώπηση που μεσολαβείται από RNA

Έχει δειχθεί ότι η μεταγραφή πληθώρας μορίων miRNAs αυξάνεται συγχρονισμένα κατά την διαφοροποίηση προδρόμων νευρικών κυττάρων σε νευρώνες και αστροκύτταρα *in vitro* και *in vivo*. Ο Kosik και οι συνεργάτες του (27) περιγράψανε ότι τα μόρια miR-124a και miR-9 —ειδικά για τον εγκέφαλο— επηρεάζουν την διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων *in vitro*. Επιπλέον, αποκάλυψαν στοιχεία για την εμπλοκή του STAT3 σε αυτή την διαδικασία.

Ο Gage και οι συνεργάτες του (28) ταυτοποίησαν ένα μη-κωδικό μόριο RNA, το οποίο περιλαμβάνει μια NRSE αλληλουχία η οποία σχηματίζει δίκλωνο RNA (dsRNA) μεγέθους περίπου 20 bp και μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση γονιδίων που περιέχουν NRSE/RE1 κατά τα πρώιμα στάδια της νευρογένεσης. Τα NRSE dsRNA μόρια διαμορφώνουν τον NRSE/RE1 DNA-NRSF/REST πρωτεϊνικό μηχανισμό ώστε να ενεργοποιηθεί η νευρωνική γονιδιακή έκφραση στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα. Τα NRSE dsRNA μόρια είναι απαραίτητα και επαρκή ώστε να κατευθύνουν τα πολυδύναμα νευρικά βλαστικά κύτταρα προς την νευρωνική κατεύθυνση, προτείνοντας ότι μπορούν να δράσουν ως ενδογενής παράγοντες που προωθούν την διαφοροποίηση. Η λειτουργία αυτή —ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης— τα διακρίνει από τα μέχρι στιγμής γνωστά μόρια miRNA/siRNAs και εισάγει ένα καινούργιο ρόλο για τα μη-κωδικά μόρια RNA σε επίπεδο μεταγραφής.

2.4 Γονίδια Sox

Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να κατανοούνται. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών δεν είναι μόνο αναγκαία για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά κατέχει ύψιστη πρακτική σημασία στο πεδίο της αναγέννησης ιστών, με χρήση των βλαστικών κυττάρων. Με αυτό το κίνητρο, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός θεμελιωδών μοριακών παραγόντων είναι το κύριο και πρωτεύων μέλημα της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων. Τα Sox γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί για τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK). Η έκφρασή τους στα βλαστικά κύτταρα, αλλά όχι στους νευρώνες και η λειτουργία τους στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση παρουσιάζουν εντυπωσιακή διατήρηση στο κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα. Τα βιοχημικά και γενετικά συστήματα με τα γονίδια Sox στο επίκεντρο είναι πιθανόν αυτό που χρειάζεται να κατανοήσουμε ώστε να χειριστούμε τα νευρικά βλαστικά κύτταρα για θεραπευτικούς σκοπούς.

Τα SOX (SRY-related HMG-box) γονίδια κωδικοποιούν μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες διαθέτουν μια HMG (high mobility group) περιοχή πρόσδεσης στο DNA (79aa). Όλες οι SOX πρωτεΐνες έχουν ένα μοναδικό, υψηλά διατηρημένο HMG box και είναι ικανές να προσδεθούν στην μείζων αύλακα του DNA —με τρόπο που εξαρτάται από την αλληλουχία. Το συντηρημένο μοτίβο πρόσδεσης έχει ταυτοποιηθεί ως 5'- (A/T) (A/T) CAA (A/T) G -3'. Η πρόσδεση στο DNA έχει ως αποτέλεσμα κάμψη μέσω μεταβαλλόμενου μεγέθους γωνίας ($30^\circ - 113^\circ$). Η κάμψη αναγκάζει την έλικα του DNA να αποδιαταχθεί τοπικά, το οποίο μπορεί να επηρεάσει την πρόσδεση και την αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η πρωτεΐνη SRY (Sex determining Region Y) είναι ο πρώτος SOX μεταγραφικός παράγοντας που ανακαλύφθηκε και παρουσιάστηκε να είναι κρίσιμος για τον φυλοκαθορισμό των αναπτυσσόμενων γονάδων. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας SOX έχουν δομή όμοια του SRY, αλλά η λειτουργία τους δεν είναι απαραίτητα σχετική με αυτή του Sry. Απαντώνται σε όλα τα είδη μεταζώων και εκφράζονται σε μυριάδες στάδια κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (56).

Group A	SRY
Group B1	Sox1, Sox2, Sox3
Group B2	Sox14, Sox21
Group C	Sox4, Sox11, Sox12
Group D	Sox5, Sox6, Sox13
Group E	Sox8, Sox9, Sox10
Group F	Sox7, Sox17, Sox18
Group G	Sox15
Group H	Sox30

Πίνακας4: Ταξινόμηση των Sox πρωτεϊνών των θηλαστικών. Η ομάδα B χωρίζεται περαιτέρω στις υποομάδες B1 και B2.

Η οικογένεια SOX των θηλαστικών περιλαμβάνει 20 γονίδια —τα οποία μπορούν να χωριστούν σε 8 ομάδες με βάση την αλληλουχία— ενώ η μύγα των φρούτων *Drosophila* διαθέτει 7 γονίδια (57). Τα SOX γονίδια εμπλέκονται στην ρύθμιση διαφόρων αναπτυξιακών διαδικασιών —όπως σχηματισμός του γενετικών κυττάρων, οργανογένεση και κυτταρική εξειδίκευση. Ως εκ τούτου, απαλοιφή ή μεταλλαγή των SOX γονιδίων οδηγεί συχνά σε αναπτυξιακές ελλείψεις και εκ γενετής ασθένειες στον άνθρωπο (32, 34, 33, 35). Η ρύθμισή τους πραγματοποιείται σε πολλά επίπεδα —συμπεριλαμβανομένης της trans-ενεργοποίησης, της συνεργασίας με POU μεταγραφικούς παράγοντες και της αυτό-ρύθμισης.

Οι ομάδες που παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος είναι η SoxB1 και η SoxE. Τα μέλη της ομάδας SoxB1 — Sox1, Sox2 και Sox3— εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ, ενώ τα μέλη της ομάδας SoxE — Sox8, Sox9 και Sox10— εκφράζονται στα παράγωγα της νευρικής ακρολοφίας. Μια στενά συγγενής ομάδα της SoxB1 είναι η SoxB2, η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια Sox21 και Sox14, τα οποία πιθανόν προσδένονται στις ίδιες αλληλουχίες στόχους, αλλά αντί της C-τελικής περιοχής trans-ενεργοποίησης διαθέτουν μια κατασταλτική περιοχή. Τα γονίδια της ομάδας SoxC —Sox4 και Sox11— εκφράζονται στα ολιγοδενδροκύτταρα.

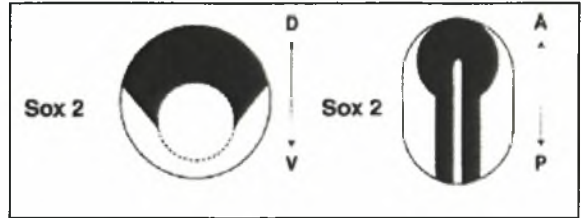
2.4.1 Γονίδιο Sox2

Τα γονίδια Sox1, Sox2 και Sox3 παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ομολογία προς το SRY. Αυτά τα γονίδια μοιράζονται σημαντική ομολογία και εκτός της HMG box περιοχής και είναι υψηλά διατηρημένα κατά την εξελικτική τους πορεία. Ο Sox2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος είναι κρίσιμος για την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και της μη-διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (EBK).

Η έκφραση του Sox2 ρυθμίζεται και χρονοταξικά και χωροταξικά. Αρχικά εκφράζεται στην εσωτερική κυτταρική μάζα (EKM) της βλαστοκύστης, κατόπιν περιορίζεται στο αρχέγονο εξώδερμα και τέλος στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Επίσης, εκφράζεται αργότερα στα κύτταρα των φακών. Γονίδια όπως ο ινοβλαστικός παράγοντας 4 (FGF-4) και ο μεταγραφικός παράγοντας αδιαφοροποίητων κυττάρων 1 (UTF1), περιέχουν αλληλουχίες ενισχυτών με θέσεις πρόσδεσης για τον Sox2 (21, 42). Εκτός του γεγονότος ότι ο Sox2 είναι ένας από τους κύριους παράγοντες για την ρύθμιση της πρώιμης ανάπτυξης, τα δεδομένα για την ρύθμιση του ίδιου είναι λιγοστά.

2.4.2 Η έκφραση του Sox2 σε διάφορα είδη σπονδυλωτών

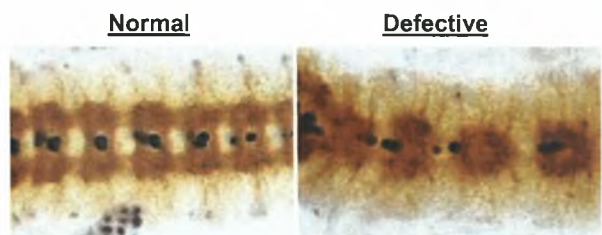
Στον *Xenopus* (30), το γονίδιο *XeSox2* εκφράζεται στο νευροεξώδερμα του προχωρημένου γαστριδίου. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από τον Chd και τον BMP4. Όταν ο οργανωτής των Spemann-Mangold αρχίζει να είναι λειτουργικός —στο στάδιο του πρώιμου γαστριδίου— το *Sox2* παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Η έκφρασή του σε αυτό το στάδιο είναι περιορισμένη στο κοιλιακό εξώδερμα. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη δύο ξεχωριστών σηματοδοτικών μοντέλων για



Εικόνα 17: Κατά το στάδιο του πρώιμου γαστριδίου (αριστερά), το *Sox2* εκφράζεται στο ραχιαίο εξώδερμα. Κατά το στάδιο του νευριδίου (δεξιά), το γονίδιο εκφράζεται ειδικά στα κύτταρα που θα δώσουν νευρικούς ιστούς (30).

τον καθορισμό του νευροεξωδέρματος: το πρώτο είναι ήδη ενεργό κατά την πρώιμη γαστριδιοποίηση και το δεύτερο ενεργοποιείται κατά το μέσο της γαστριδιοποίησης. Ο *XeSox2* από μόνος του δεν είναι επαρκής ώστε να προκαλέσει νευρωνική διαφοροποίηση, αλλά δρα συνεργειακά με την FGF σηματοδότηση ώστε να αρχίσει η νευρική επαγωγή. Ο *XeSox2* πιθανόν απαιτείται ως δευτερεύον παράγοντας στην νευρική διαφοροποίηση των πρόσθιων και οπίσθιων ιστών.

Στην *Drosophila* (29) υπάρχουν 7 αντιπρόσωποι της οικογένειας των SOX πρωτεϊνών: *Dichaete*, *SoxNeuro*, *SOX50E*, *SOX60B*, *SOX96D*, *SOX100B* και *SOX102D*. Η πρωτεΐνη *Dichaete* είναι στενά συγγενεύων με τα *Sox1* και *Sox2* των σπονδυλωτών. Έχει δειχθεί ότι η γλοία που διαχωρίζει την αριστερή και την δεξιά πλευρά του νευροεξωδέρματος παρουσιάζει δυσμορφία ή χάνεται σε μεταλλάξεις της *Dichaete* και αυτό οδηγεί σε διάρρηξη της φυσιολογικής δομής του

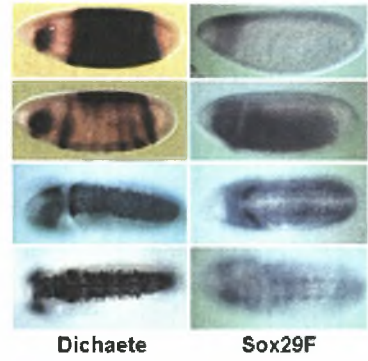


Εικόνα 18: Μεταλλάξεις της *Dichaete* εμφανίζουν ανωμαλίες στο ΚΝΣ (29).

εμβρυικού ΚΝΣ. Τέτοιοι φαινότυποι μπορούν να διασωθούν από το γονίδιο *Sox2* του ποντικού, προτείνοντας ότι αυτά τα γονίδια πρέπει να είναι λειτουργικά συντηρημένα. Στον ποντικό, το *Sox2* εκφράζεται νωρίς στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα με τρόπο ανάλογο με αυτόν της *Dichaete*.

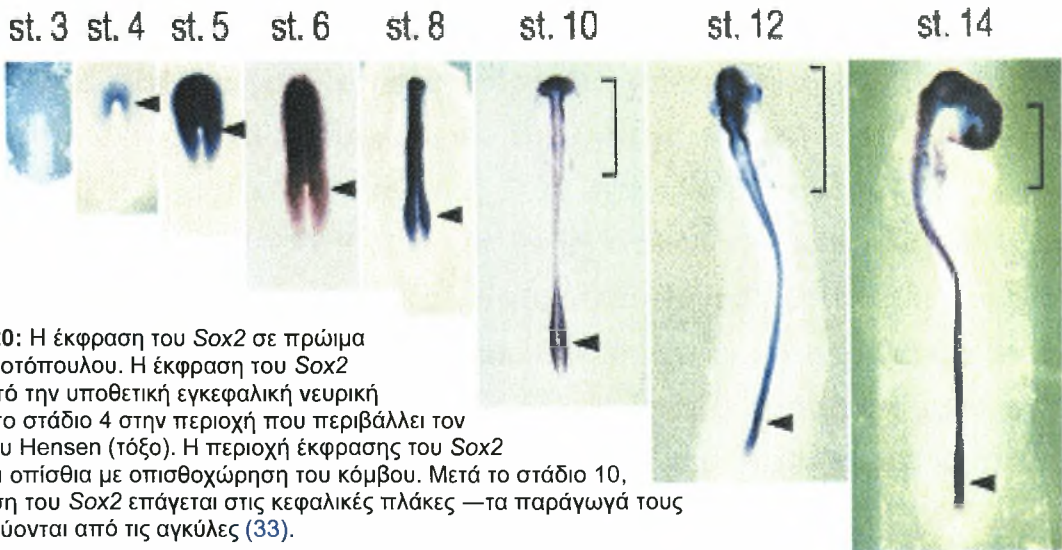
Το *SoxNeuro*, επίσης γνωστό ως *Sox29F*, εντοπίζεται στο 2ο χρωμόσωμα. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της ομάδας Β των Sox πρωτεϊνών με περιοχή πρόσδεσης

στο DNA στενά συγγενική με αυτή των *Sox1* και *Sox2*, όπως και της *Dichaete*. Ανάλυση της έκφρασης του *SoxNeuro* προτείνει ότι συνεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό με την *Dichaete* στο ΚΝΣ. Η έκφραση του *SoxNeuro* ανιχνεύεται αρχικά στο στάδιο πρόδρομου νευροεξωδέρματος (NE). Στην πραγματικότητα, ενώ το *SoxNeuro* εκφράζεται παντού στο νευροεξώδερμα, η *Dichaete* εκφράζεται μόνο στις κοιλιακές και ενδιάμεσες περιοχές των NE και στο κοιλιακό midline (Εικόνα).



Εικόνα 19: Η *Dichaete* και το *Sox29F* συν-εκφράζονται στο ΚΝΣ (29).

Στο **κοτόπουλο** (32, 33), ο *Sox2* αναγνωρίστηκε ως ένας θεμελιώδης παράγοντας που ενεργοποιεί το γονίδιο της β-κρυσταλλίνης στα κύτταρα του φακού και αργότερα βρέθηκε να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *FGF4* σε κύτταρα τερατοκαρκινώματος. Αναλύσεις σε πρώιμα έμβρυα απεκάλυψαν ότι ο *Sox2* εκφράζεται ευρέως στο νευρικό σύστημα του κοτόπουλου και η έκφραση του φαίνεται να σχετίζεται με την νευρική επάρκεια του εξωδέρματος.



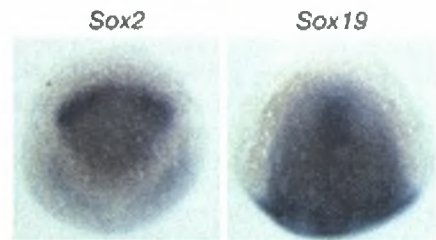
Εικόνα 20: Η έκφραση του *Sox2* σε πρώιμα έμβρυα κοτόπουλου. Η έκφραση του *Sox2* ξεκινά από την υποθετική εγκεφαλική νευρική πλάκα στο στάδιο 4 στην περιοχή που περιβάλλει τον κόμβο του Hensen (τόξο). Η περιοχή έκφρασης του *Sox2* εκτείνεται οπίσθια με οπισθοχώρηση του κόμβου. Μετά το στάδιο 10, η έκφραση του *Sox2* επάγεται στις κεφαλικές πλάκες —τα παράγωγά τους υποδεικνύονται από τις αγκύλες (33).

Η έκφραση του *Sox2* στο ΚΝΣ αρχικά ενεργοποιείται από την νευρική επαγωγή που υποκινείται από σήματα του οργανωτή. Στα έμβρυα κοτόπουλου, η έκφρασή του ξεκινά στο αναπτυξιακό στάδιο 4 (st.4) στην υποθετική εγκεφαλική νευρική πλάκα —οδοντωτή οπίσθια περιοχή, σχήματος πετάλου— που περιβάλλει τον κόμβο του Hensen (Εικόνα). Καθώς ο κόμβος του Hensen κινείται οπίσθια, σχηματίζεται μια καινούργια περιοχή που εκφράζει *Sox2* και προστίθεται στην περιοχή όπου προηγουμένως είχε ενεργοποιηθεί ο *Sox2* (Εικόνα 20, st.5–8). Στα στάδια της

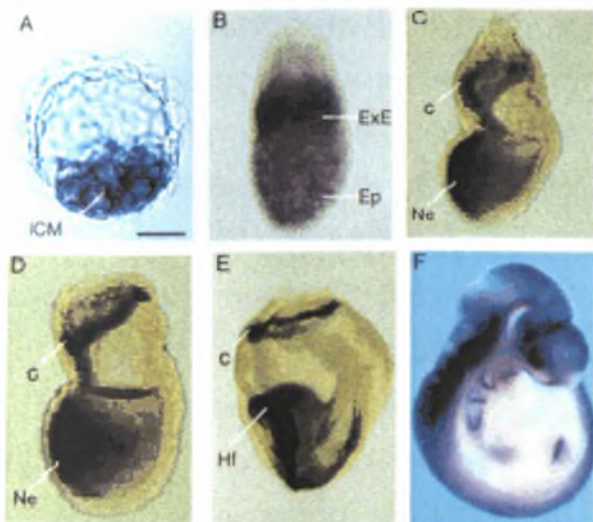
νευριδιοποίησης, όταν η επιφάνεια των κύτταρων που εκφράζουν Sox2 συγκλίνει (Εικόνα 20, st.8) και σχηματίζει τον νευρικό σωλήνα, συνεχίζονται να πρωτοεμφανίζονται κύτταρα στην οπίσθια περιοχή που εκφράζουν Sox2 (Εικόνα 20, st.8–14).

Το Sox19 στο **zebrafish** είναι στενά συγγενεύων με την υποομάδα SoxB1, με ομολογία 95.3% εντός της περιοχής HMG box. Ανάλυση της έκφρασης του Sox19 με *in situ* υβριδοποίηση κατά την εμβρυογένεση απεκάλυψε ενδιαφέροντα στοιχεία. Στο στάδιο του πρώιμου γαστριδίου, τα μετάγραφα του Sox19 ανιχνεύονται εντός της περιοχής του μελλοντικού κεντρικού νευρικού συστήματος.

Στο **ποντίκι** (31), η έκφραση του Sox2 ανιχνεύεται αρχικά σε ολόκληρο τον επιβλάστη κατά την 6.5η εμβρυονική μέρα (E6.5). Στην απαρχή του σχηματισμού της νευρικής πλάκας ο Sox2 εκφράζεται σε μια περιοχή του πρόσθιου εξωδέρματος, η οποία δίνει γένεση σε νευροεξώδερμα και πρόσθιο επιδερμικό εξώδερμα. Καθώς προχωρά η ανάπτυξη του ΚΝΣ, η έκφραση του Sox2 γίνεται περισσότερο ορατή, ειδικά στον εγκέφαλο. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 έχει επίσης ενοχοποιηθεί για την γονιδιακή ρύθμιση του FGF-4 (21). Βρέθηκε ότι υπάρχει απαίτηση για την έκφραση του γονιδίου στον επιβλάστη και το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα, οι πολυδύναμοι πρόδρομοι όλων των εμβρυϊκών και τροφοβλαστικών κυτταρικών τύπων, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, πρέπει να υφίσταται ένας πρώιμος ρόλος εντός της εσωτερικής κυτταρικής μάζας από την παρουσία της μητρικής πρωτεΐνης, αν και η έλλειψη του Sox2 αρχίζει να γίνεται κρίσιμη μόνο στο χώρο (η εξωτερική εμβρυϊκή μεμβράνη) μετά από E7.5. Πολλά δεδομένα προτείνουν ότι θα μπορούσαν να εμπλέκονται μητρικά συστατικά στην εγκαθίδρυση των πρώιμων κυτταρικών σειρών και ότι υπάρχει ένας συνδυαστικός κώδικας —ο οποίος απαιτεί Sox2 και Oct4— και καθορίζει τις τρεις πρώτες κυτταρικές σειρές παρούσες κατά την εμφύτευση.



Εικόνα 21: Η έκφραση του zeSox σε έμβρυα 100% epiboly stage. Η έκφραση του Sox19 —μέλος της ομάδας B1 των Sox γονιδίων, το οποίο είναι απαντάται μόνο στα ψάρια— είναι επικρατέστερη. Η έκφραση του zeSox2 είναι περιορισμένη στην πρόσθια περιοχή του ΚΝΣ (33).



Εικόνα 22: In situ υβριδοποίηση σε ολόκληρα έμβρυα. Το *mSox2* mRNA εντοπίζεται στην ΕΚΜ της βλαστοκύστης (ICM) of the blastocyst (A), στον επιβλάστη (Ep) και το εξωεμβρυϊκό εξώδερμα (ExE) κατά την E6.5 (B), στο χώριον (c) και στην πρόσθια περιοχή του μελλοντικού νευροεξωδέρματος (Ne) κατά την E7.5 (C) και κατά την E7.5-8.0 (D). (E) κατά την E8.5 dpc, η έκφραση του *mSox2* εμφανίζεται στο χώριον, στην εγκεφαλική πτυχή (Hf) και τον νευρικό σωλήνα (31).

Στον **άνθρωπο**, το *Sox2* εκφράζεται στους νευρικούς και τους αισθητήριους επιθηλιακούς ιστούς από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου της β-κρυσταλλίνης και ότι εμπλέκεται στην διαδικασία διαφοροποίησης του φακού και άλλων νευρικών ιστών. Η πρώτη διαπίστωση της σημαντικότητας του είναι η παθολογική κατάσταση που επιδείχθηκε μετά από απαλοιφή ή μεταλλαγή του γονιδίου: αναλύσεις μεταλλάξεων σε 5 παιδιά που έπασχαν από αμφίπλευρη ανοφθαλμία οδήγησαν στην ανακάλυψη *de novo* σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο του *Sox2* που είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης. Το *Sox2* είναι επίσης υπεύθυνο για την ανάπτυξη των τριχοειδών και των στηρικτικών κυττάρων στο εσωτερικό του αυτιού. Έχουν επίσης δημοσιευτεί περιπτώσεις όπου σημειακές μεταλλάξεις του *Sox2* προκαλούν δυσλειτουργίες του υποθαλάμου και του ιπποκάμπου, μικροφθαλμία και κώφωση (32, 34, 33, 35).

3. Σχεδιασμός πειραματικού μέρους

Ο εκκινητής του *Sox2* στον ποντικό (*Mus musculus*)

Ο Rizzino και οι συνεργάτες του (36) κατέδειξαν μια περιοχή στο 5' άκρο του γονιδίου (-528 to +238), η οποία είναι ικανή να υποστηρίξει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς σε EC κύτταρα (in vitro σύστημα, αντιστοιχία στα κύτταρα του επιβλάστη), ειδικά όταν αυτά βρίσκονται στην αδιαφοροποιημένη μορφή τους. Απομόνωση αυτής της περιοχής αποκάλυψε αρκετά cis-ρυθμιστικά στοιχεία που θα μπορούσαν να

Η αλληλουχία στο -50 —όπως και αυτή στο -460— είναι παρόμοια με θέσεις πρόσδεσης παραγόντων που ανήκουν στην οικογένεια Ets. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης στο DNA, μέσω των οποίων προσδένονται σε αλληλουχίες πλούσιες σε πουρίνες —GGA(A/T)— και ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων σε συνεργασία με άλλους παράγοντες και συν-παράγοντες. Τα μέλη της Ets οικογένειας ενεργοποιούνται εκ των πλείστων από το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-MAP κινασών. Αρκετές Ets πρωτεΐνες εκφράζονται κυτταροειδικά και εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση, ενεργοποιώντας γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και μέλη της υπεροικογένειας των ιντερκρινών (40).

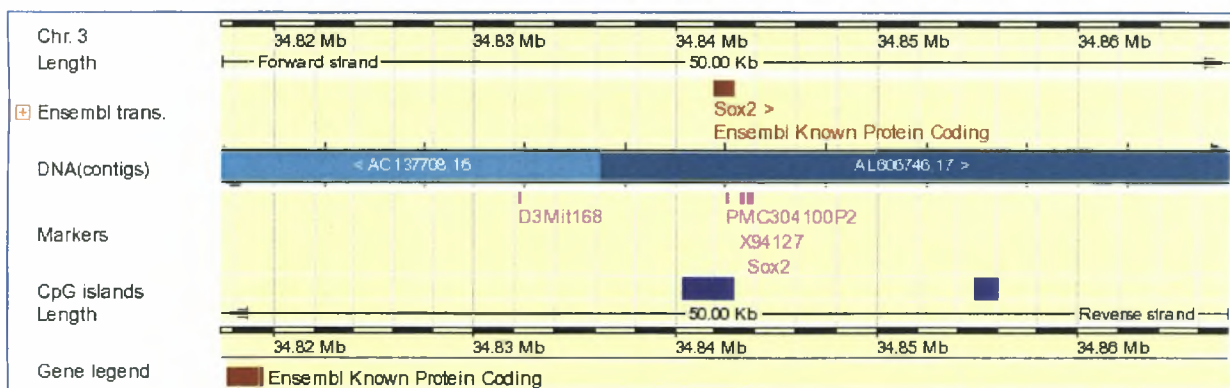
Η αλληλουχία στο -125 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την θέση πρόσδεσης του παράγοντα Sp1. Ο Sp1 είναι ένα από τα κύρια μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων που διαθέτουν δακτύλους ψευδαργύρου. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες κατέχουν σημαντικούς ρόλους σε ποικιλία φυσιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της ορμονικής ενεργοποίησης, της απόπτωσης, της αγγειογένεσης κ.τ.λ. μεταξύ των Sp μεταγραφικών παραγόντων ο Sp1 εκφράζεται ευρέως στους ιστούς και προσδένεται σε GC boxes (41). Τα GC boxes εντοπίζονται συχνά σε περιοχές εκκινητών και ενισχυτών.

Επιπλέον, βρέθηκε μια μη κοινή θέση πρόσδεσης για τους παράγοντες E2F site (TTTGGAGC) στο +134. Η E2F οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων παίζει κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αποτελείται από πέντε μέλη (E2F1-5) και μπορεί να χωριστεί σε καταστολείς (E2F4 and E2F5) και ενεργοποιητές της μεταγραφής (E2F1, E2F2, and E2F3) με βάση σειράς ανακαλύψεων. Οι E2Fs θεωρείται ότι δρουν ενεργοποιώντας σειρά γονιδίων που εμπλέκονται στην είσοδο της φάσης G1 όπως και στην αντιγραφή του DNA. Μια από τις σημαντικές λειτουργίες τους είναι η στρατολόγηση των μελών της οικογένειας του Ρετινοβλαστώματος (Rb), η οποία περιλαμβάνει την p107 και την p130. Τα μέλη της οικογένειας Rb αναστέλλει με την σειρά της την μεταγραφή των E2F και άλλων γονιδίων μέσω στρατολόγησης HDAC πρωτεϊνών (42). Οι παράγοντες E2F δεσμεύονται εκ των πλείστων στη νουκλεοτιδική αλληλουχία TTT(G/C)(G/C)CG(G/C), η οποία είναι παρούσα στους εκκινητές πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA και τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης.

Η ρύθμιση πολλών γονιδίων που εκφράζονται κατά την πρώιμη εμβρυογένεση πραγματοποιείται στο επίπεδο της μεταγραφής. Το πρότυπο έκφρασης του Sox2 σε EC

κύτταρα ποντικού φαίνεται ότι ακολουθεί αυτή την κατεύθυνση, αφού τα επίπεδα του mRNA γίνονται μη ανιχνεύσιμα κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι θεωρητικές HMG, POU και Ets θέσεις πρόσδεσης που εμφανίζονται στο 5' άκρο του Sox2 γονιδίου μπορεί να δεσμεύουν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετική ρύθμιση στα EC κύτταρα.

Η μεθυλίωση των CpG δινουκλεοτιδίων σε περιοχές πλούσιες σε GC (νησίδες CpG) αναπαριστά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έναν άλλον μηχανισμό ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση. Οι μεθυλιωμένες νησίδες CpG μπορούν να αποτελέσουν θέση πρόσδεσης κατασταλτικών συμπλόκων, τα οποία διατηρούν τις ιστόνες σε μια από-ακετυλιωμένη μορφή, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση ενός γονιδίου μέσω συμπύκνωσης της χρωματίνης. Στο γονίδιο Sox2 στον ποντικό, η περιοχή -1907 έως -1200 bp —σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής— και η 3' αμετάφραστη περιοχή περιέχουν 3% CpG. Αντιθέτως, τα πρώτα 1200 bp άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής καλύπτονται από μια εκτενές CpG νησίδα (7% CpG), όπως η κωδική περιοχή και η 5' αμετάφραστη περιοχή (από 9% CpG). Το υψηλότερο ποσοστό CpG εντοπίζεται γύρω από το σημείο έναρξης της μετάφρασης (15% CpG εντός μιας περιοχής 300 bp) και ακριβώς πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής (11% CpG εντός μιας περιοχής 300 bp) (36).

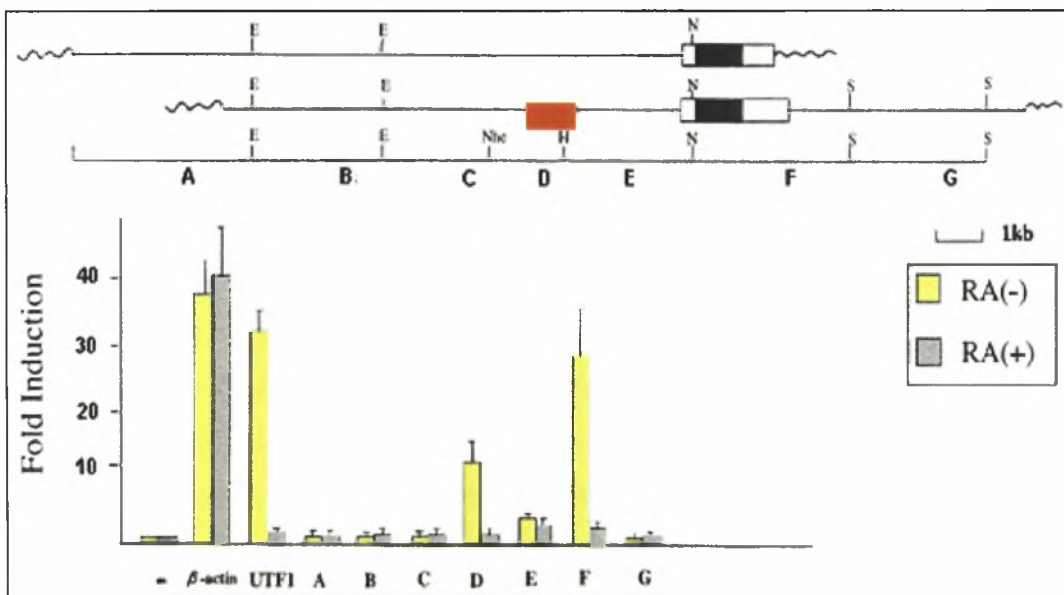


Εικόνα 23: Τα πρώτα 1200 bp άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής καλύπτονται από μια εκτενές CpG νησίδα (7% CpG), όπως η κωδική περιοχή και η 5' αμετάφραστη περιοχή (από 9% CpG). Το υψηλότερο ποσοστό CpG εντοπίζεται γύρω από το σημείο έναρξης της μετάφρασης (15% CpG εντός μιας περιοχής 300 bp) και ακριβώς πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής (11% CpG εντός μιας περιοχής 300 bp)

(http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?c=3:34842446.5;w=50000)

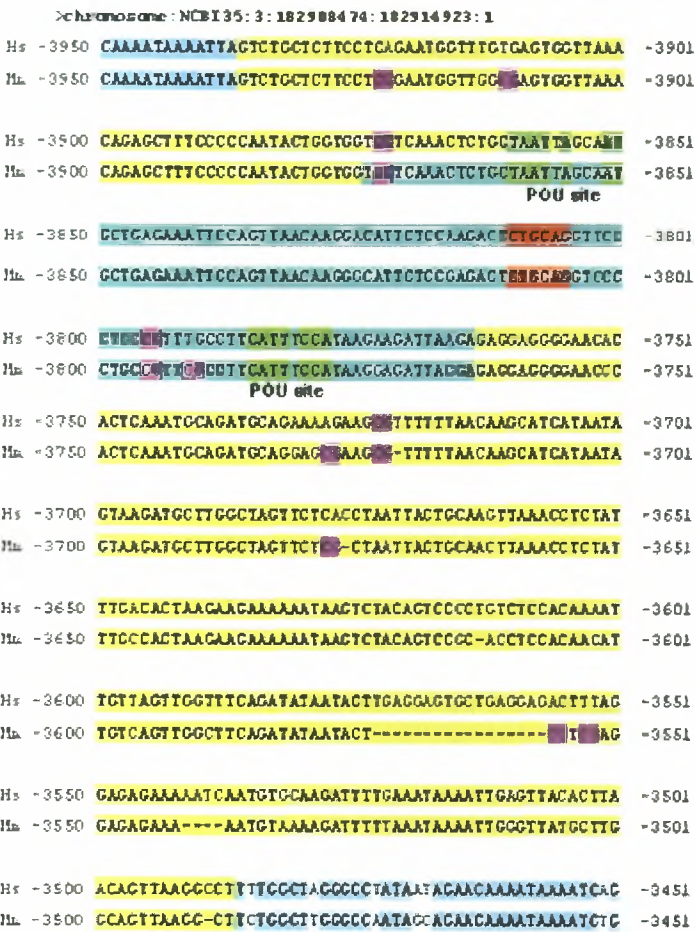
Sox2 Ρυθμιστικές περιοχές 1 και 2 (SRR 1 and 2)

Ο Okuda και οι συνεργάτες του (44) βρήκαν ότι η 5' συνορεύων περιοχή του γονιδίου (-528 to +238), η οποία αναλύθηκε προηγουμένως παρουσιάζει σημαντική ενεργότητα ακόμα και όταν τα EC και τα ES κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται. Υπέθεσαν λοιπόν, ότι το γονίδιο Sox2 πρέπει να διαθέτει επιπλέον ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες ευθύνονται για την έκφρασή του σε πλειοδύναμα εμβρυονικά κύτταρα. Για να ταυτοποιήσουν τέτοιες περιοχές, απομόνωσαν χρωμοσωμικό DNA που περιέχει το γονίδιο Sox2 συμπεριλαμβανομένων των 5' και 3' συνορεύων περιοχών και πραγματοποίησαν μελέτες έκφρασης με χρήση του UTF1 ως γονίδιο αναφοράς. Όπως φαίνεται στην εικόνα, υπάρχουν τουλάχιστον δυο τμήματα DNA (D και F), τα οποία είναι ικανά να υποστηρίξουν την ιδιότητα ενός ενισχυτή ακόμα και μετά από επώαση με ρετινοϊκό οξύ, το οποίο είναι παράγοντας που επάγει την διαφοροποίηση. Τα ρυθμιστικά αυτά τμήματα ονομάστηκαν SRR1 και 2, αντίστοιχα. Τα SRR1 και SRR2 επηρεάζουν την μεταγραφή πιο αποτελεσματικά από την περιοχή που ανακάλυψε ο Rizzino και οι συνεργάτες του (-528 έως +238) (36), η οποία βρίσκεται εντός του τμήματος E στην Εικόνα 24.



Εικόνα 24: Ταυτοποίηση δύο ρυθμιστικών περιοχών, οι οποίες δρουν κυρίως σε F9 EC κύτταρα ιδίως όταν αυτά βρίσκονται σε αδιαφοροποίητη κατάσταση (44). Τα μαύρα κουτιά (επάνω) αναπαριστούν την κωδική περιοχή του Sox2 γονιδίου. Το Sox2 γονίδιο και οι εκατέρωθεν χρωμοσωμικές περιοχές (A-G) κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά σε φορείς που έφεραν το γονίδιο της λουσιφεράσης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε παρουσία ή απουσία ρετινοϊκού οξέος (RA). Το κόκκινο κουτί (μεταξύ Nhe και H) είναι η περιοχή που απαιτείται για την έκφραση του γονιδίου στον τελεγκέφαλο (46) B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII, N: NotI, Nhe: NheI, S: Sall

Η SRR1 περιοχή χάνει την δραστηριότητά της όταν τα F9 κύτταρα επάγονται για διαφοροποίηση με ρετινοϊκό οξύ (RA). Συνεπώς, θεωρήθηκε ότι η έκφραση του *Sox2*



Εικόνα 25: Η περιοχή SRR1 (-3937 to -3487—ως προς την αρίθμηση στον *Mus musculus*, κίτρινο) εμπλέκεται στην έκφραση του *Sox2* σε πλειοδύναμα EBK. Επιπλέον, είναι ικανή να δράσει σε πολυδύναμα NBK. Η περιοχή που είναι χρωματισμένη με τριχουάζ είναι αυτή που ανακαλύφθηκε από τους Catena et al. (46) να κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου στον τελεγκέφαλο.

γονιδίου στα EC κύτταρα υποστηρίζεται κυρίως από την SRR1 και η συνεισφορά της περιοχής -528 έως +238 είναι πιθανόν ελάχιστη. Η έκφραση του *Sox2* δεν παρατηρείται μόνο σε πρώιμους εμβρυϊκούς ιστούς—όπως η εσωτερική κυτταρική μάζα— αλλά και σε όλο το νευρικό σύστημα. Ταυτοποιήθηκε μια περιοχή (45) άνωθεν του γονιδίου —5.7 έως -3.3 kb— η οποία στηρίζει την έκφραση του *Sox2* στον τελεγκέφαλο και είναι συντηρημένη στο zebrafish, στο κοτόπουλο, στον ποντικό και τον άνθρωπο (38). Αργότερα αυτή η περιοχή περιορίστηκε σε ένα τμήμα 400 bp, το οποίο περιλαμβάνει δύο συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης για POU μεταγραφικούς παράγοντες και

μια θέση υπερευαίσθησίας HSI. Η δραστηριότητα της SRR1 στα EBK και του ενισχυτή που παρουσιάζει ειδικότητα για τον τελεγκέφαλο (46) προέρχεται από την ίδια περιοχή, δηλαδή την SRR1. Η συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης για POU παράγοντες είναι κρίσιμες για την έκφραση του *Sox2* και σε εμβρυϊκά και νευρικά πρόδρομα κύτταρα. Με χρήση της τεχνικής EMSA (ανάλυση κινητικότητας σε πηκτή) και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (46) εξακριβώθηκε ότι ο Oct4 —POU παράγοντας— δεσμεύεται στην SRR1 in vivo. Μετάλλαξη των συντηρημένων θέσεων πρόσδεσης είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της έκφρασης του *Sox2* σε διαγονιδιακά ποντίκια. Οι ίδιες μεταλλάξεις επηρέασαν την έκφραση του γονιδίου και σε EBK. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο που κατέχουν οι POU

παράγοντες —και ειδικότερα ο Oct4— στην ρύθμιση του Sox2 σε πλειοδύναμα κύτταρα και πρώιμους νευρικούς προδρόμους.

Μετά την ανακάλυψη των δύο ενισχυτών του Sox2 —ρυθμιστικές περιοχές SRR1 και SRR2—, οι οποίοι εμπλέκονται στην έκφραση του γονιδίου σε πλειοδύναμα EBK, εξετάστηκε το ενδεχόμενο της δραστικότητας αυτών των περιοχών σε πολυδύναμα νευρικά βλαστικά κύτταρα (44). Πειράματα φθορισμού αποκάλυψαν ότι η SRR1 και η SRR2 εμφανίζουν δραστικότητα ισοδύναμη με αυτή του ενισχυτή της νεστίνης. Από αυτά τα αποτελέσματα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και οι δύο ενισχυτές είναι λειτουργικοί σε NBK. Επίσης, επιβεβαιώθηκε ότι αυτές οι ρυθμιστές περιοχές —όπως ο ενισχυτής της νεστίνης— δεν παρουσιάζουν δραστικότητα όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συνθήκες που επάγουν την διαφοροποίηση, καταδεικνύοντας ότι και η SRR1 και η SRR2 δρουν κατά προτίμηση σε πολυδύναμα νευρικά κύτταρα και πληθυσμούς πρόδρομων κυττάρων.

Η έρευνα επικεντρώθηκε περισσότερο στον ενισχυτή SRR2 (43), αφού αυτή η περιοχή παρουσιάζει υψηλότερη δραστικότητα από την SRR1. Όπως μπορούμε να

Hs	4151	TTCCCCCTTAATTAAATGCCACAGACTCTAAAAGCAATTTCGGTAGCCTGGC	4200
Mm	4151	TTCCCCCTTAATTAAATGCCACAGACTCTAAAAGCAATTTCGGGGCTGGG	4200
Hs	4201	TAGCCATTCTAATGCATATACCGCATTTATTCACCTGCTAATCAGCACATTTC	4250
Mm	4201	TAGCCATTCTAATGCATATACCGCATTTATTCACCTGCTAATCAGCACAGTTC	4250

Sox-like Oct-like

Εικόνα 26: Η περιοχή SRR2 (+3931 to +4011—ως προς την αρίθμηση στον *Mus musculus*) διαθέτει μια σύνθετη θέση πρόσδεσης για το σύμπλοκο Sox2/Oct4.

δούμε στην Εικόνα 24, ο SRR2 παρουσιάζει σχεδόν ισοδύναμη δραστικότητα με την ρυθμιστική περιοχή του UTF1 γονιδίου. Ο UTF1 είναι ένας συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής, ο οποίος απομονώθηκε πρόσφατα (47) και βρέθηκε ότι εκφράζεται κυρίως σε πλειοδύναμα EBK. Τα αποτελέσματα των ερευνών αποκάλυψαν ότι η SRR2 περιέχει μια σύνθεση θέση πρόσδεσης για POU και Sox παράγοντες. Μέσω παροδικού ανασυνδυασμού με μεταλλαγμένα τμήματα της SRR2 εξακριβώθηκε ότι η περιοχή βρίσκεται υπό τον έλεγχο του συμπλόκου Oct4–Sox2. Το σύμπλοκο Oct4–Sox2 κατέχει ρόλο ζωτικής σημασίας στην έκφραση του γονιδίου σε πρώιμα εμβρυϊκά κύτταρα. Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Sox2 εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασής της είναι σημαντικού ενδιαφέροντος. Η θετική αυτό-ρύθμιση του Sox2 γονιδίου μπορεί εν μέρει να ευθύνεται για μερικές από τις ιδιότητες των πλειοδύναμων EBK.

Ρύθμιση του Sox2 κατά την ανάπτυξη των φακών

Η απομόνωση του εκκινήτη του ανθρώπινου Sox2 κατέδειξε ότι υπάρχουν υψηλά συντηρημένες περιοχές (>75% ομολογία) μεταξύ του ανθρώπου και του ποντικού. Με χρήση της σειράς HEK293 —Human embryonic kidney epithelial— ως κύτταρα αποδέκτες (48) δημοσιεύτηκαν αρκετές αλληλουχίες οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες: AP2, Msx2, Pax6 και Prox1 κατά την ανάπτυξη των φακών. Ο AP2, ο Pax6 και ο Prox1 μπορούν να δράσουν ως ενεργοποιητές, ενώ ο Msx2 ως καταστολέας.

Στην πραγματικότητα, το πρότυπο έκφρασης του Sox2 παρουσιάζει σημαντικές επικαλύψεις με τα πρότυπα έκφρασης των AP2, Msx2, Pax6 και Prox1. Το Pax6 είναι το κυρίαρχο γονίδιο κατά την ανάπτυξη του οφθαλμού και ανιχνεύεται στο νευρικό και επιδερμικό εξώδερμα ακόμα και πριν τον σχηματισμό της οπτικής πλάκας. Κατά την E9.5, ο Prox1 είναι παρών στην οπτική πλάκα και κατά την E10 στο οπτικό κυστίδιο. Στα μετέπειτα στάδια, παράγεται από τα κύτταρα του φακού και τα οριζόντια και αμακρινή κύτταρα του αμφιβληστροειδή χιτώνα. Ομοίως, ο AP2 εκφράζεται στην αναπτυσσόμενη οπτική πλάκα και αργότερα στην οπτική κοιλότητα. Κατά την E12.5, εκφράζεται στο πρόσθιο επιθήλιο του φακού και κατά την E15.5 ο AP2 είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας των AP2 μεταγραφικών παραγόντων που είναι παρών στους αναπτυσσόμενους φακούς. Η έκφραση του Msx2 παρατηρείται στο επιδερμικό εξώδερμα, in the lens placode και στο εγγύς τμήμα του οπτικού κυστιδίου (E9.5). Αργότερα, μεταγράφεται στα κύτταρα του φακού. Η μερική χρονική και χωρική επικάλυψη της έκφρασης του Sox2 με τους AP2,

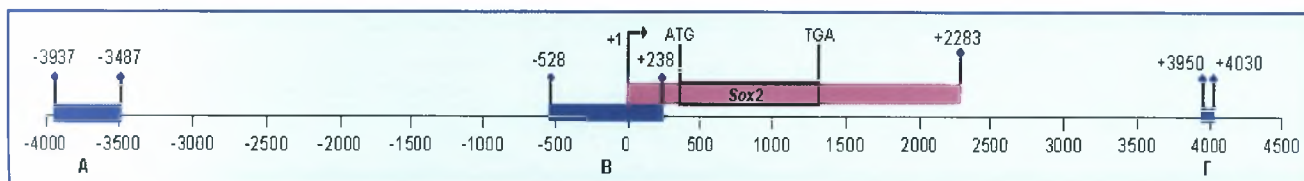
Hs	-450	TCCAGAAATAAGTTGCACAGC	CCCTGACCCACCCACTGTGCCCTGC	-401
Mm	-450	TCCTGAAATACTAGTTGCACAGT	CCCTGAACCACCCA-TGGGCCTTGC	-401
			AP2	
Hs	-400	CCCACCCCTCACCTTAGCTGCTTCC	TCCCATCTCATTTAAGTAC	-351
Mm	-400	CCCACCCCTGGCCCA-----GCTTCC	TCCCATCCACCCTTATGTAT	-351
		Pax6		
Hs	-350	CCTGCACCAAAAAGTAAATCAATATTAAGT	TAAAGAAAAAAACCAC	-301
Mm	-350	CC-----AAGAGAGAGCCAATATTC	TACCATGGGCAACAGCAGC-T	-301
Hs	-300	GTACTCTTAGTGTCTTTACCCACTTCCTTCGAA	AAGGCCTGTGCTGTGA	-251
Mm	-300	GTCTCTTGTGCTCTTTACCCACTTCCTTCGAA	CAGGCCTGCGCCCTGA	-251
Hs	-250	CCTGTTGCTGAGAGGGGATACAAAGCTTTCT	CAGTGGCTGGCAGCCTG	-201
Mm	-250	CCTGTTGCTGAGGGGGGATACAAAGCTTCC	CAGTGGCTGGC-----	-201
Hs	-200	GCTCTGGGAGCCTCCTCCCGTCTCT	CCCTGCCCTCCTCCCGTGCCT	-151
Mm	-200	---TGGGCCCTCCTCCCGTCTTGCACAG	CTCTGCTGG---	-151
Hs	-150	CCCTGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	-101
Mm	-150	-----GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	-101
			Prox1	
Hs	-100	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	-51
Mm	-100	CCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	-51
			Msx2	
Hs	-50	CTACAAACCATTATTCCTGACAGCCCTG	TCACATGGATGCTTCT	-1
Mm	-50	CTACAAACCATTATTCCTGACAGCCCTG	TCACATGGATGCTTCT	-1
		Prox1	Msx2	
Hs	1	CTATTAACCTTCTTCAAAAAGTATCAGGACT	TGTCAAGGCAGAGAAGAGA	50
Mm	1	CTATTAACCTTCTTCAAAAAGTATCAGGACT	TGTCAAGGCAGAGAAGAGA	50
		Msx2		

Εικόνα 27: Εντός της περιοχής -426 έως +6 εντοπίζονται αρκετές θέσεις στις οποίες θα μπορούσαν να προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες κρίσιμοι για την ανάπτυξη των φακών. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα, δύο από αυτές τις θέσεις παρουσιάζουν επικάλυψη με το CCAAT box.

Msx2, Pax6 και Prox1 προτείνει ότι οι τέσσερις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στην ρύθμιση του Sox2.

Χαρτογράφηση του γονιδίου Sox2 στον ποντικό

Η έλλειψη ύπαρξης μεταγραφικών, μέτα-μεταγραφικών και μεταφραστικών τροποποιήσεων στο γονίδιο του Sox2 μας ώθησε να μελετήσουμε την πιθανότητα ύπαρξης επιγενετικών τροποποιήσεων, οι οποίες ευθύνονται για το διαφορετικό πρότυπο έκφρασής του. Σκοπός μας είναι η σύγκριση του επιγενετικού προτύπου των ρυθμιστικών περιοχών του Sox2 ανάμεσα στα EBK και αναπτυξιακών παραγώγων τους, όπως το αρχέγονο εξώδερμα-ΑΕ (primitive ectoderm). Ενδιαφερθήκαμε για τους ενισχυτές του Sox2 που αναφέρθηκαν προηγουμένως, λόγω της ύπαρξης λειτουργικών στοιχείων που προσδένουν Oct4 και Sox2. Αρχικά, συγκεντρώσαμε όλες τις υπάρχουσες μέχρι στιγμής πληροφορίες και προβήκαμε στον σχεδιασμό εκκινητών για χρήση σε αντίδραση PCR (Πίνακας 5).



Εικόνα 28: Χαρτογράφηση του γονιδίου Sox2 στον ποντικό (*M. musculus*)

-4026 tggaaaccac agttgacatt tttcagaaaa tggagttatc aaggcagtaa ttatttctcg
 -3966 gggagataaa actctcatag ccctaactg

```

-3937          t caaatagggc ccttttcaga tttaattac
-3906 aaaataaaat tagtctgctc ttctctggaa tggttggcga gtggttaaac agagctttcc
-3846 cccaataactg gtggtcgtca aactctgcta attagcaatg ctgagaaatt ccagttaaca
          POU site 1
-3786 agggcattct ccgagactct gcaggtcccc tgccgttcgc cttcatttcc ataaggagat
          HS 1          POU site 2
-3726 taggagagga ggggaaccca ctcaaatgca gatgcaggag cgaagcgttt ttaacaagca
-3666 tcataatagt aagatgcttg gctagttctc gctaattact gcaacttaaa cctctatttg
-3606 ccactaagaa gaaaaaata agtctacagt ccgcacctcc acaacattgt cagttggcct
-3546 cagatataat actcgtcgag gagagaaaaa tgtaaaagat tttaataata aattgggcta
-3486 tgcttggcag ttaaggcttc tggccttgggc caatagcaga acaaaataaa atctgattac
    
```

Α. 5' πλειο- / πόλυ- δύναμο ρυθμιστικό στοιχείο

Ο Oct4 συμβάλλει στην πλειοδύναμη κίτταρα πιθανών συνεργιακά με τον 3' ενισχυτή που χαρακτηρίστηκε από τους Tomioka *et al.* (43). Στα νευρικά κύτταρα, οι ίδιες θέσεις πρόσδεσης για POU παράγοντες δεσμεύουν διαφορετικούς POU παράγοντες —όπως τον Brn1 και τον Brn2— και ρυθμίζουν την έκφραση του Sox2 (46).

-606 acggtgagaa gaggggtga gtgggtgctg gcgacaaggt tggaaagagg gctgacag
 -546 agcgagctgc cgcgatg

-528 ag cgcaaaaca atggcacac acctcgggt ctgccagctt
 Sox/SRY Ets
 -486 cctgaaatac tagttggaca gtcgccctga acacccatg ggccttgccc cacccctggcc
 AP2 Pax6
 -426 ccagcttccc gcgccccatc cacccttatg tatccaagag agagccaata ttccgtagca
 -366 tgggggaaag gagctgtcgt cttggtgctg tttaccact tccttcgaac aggcgtgcgc
 -306 ggtgacctgt tgctgaaaac ggggggcggg ggggggggat acaaaggttc ccagcggcc
 -246 ggctgcgggc ccgcctccc cgcgcggttc ggggcacagc gctctgctgg gctcggctcg
 -186 gggcgccggc agcccggcc ccttttc atg caaaaaccctc tggcgaggct gggctcgggc
 Sp1 POU site
 -126 gcaggagccg gcgctgcctg attggccgccc ggaaacccat ttattccctg acagcccaca
 Prox1 CCAAT box Ets Msx2
 -66 tcacatggat ggtgtctat taactgttc aaaaaagat caggagttgt caaggcagag
 Msx2
 -6 aagaga
 1 gtgt ttgcaaaaag gaaaagtac tttgtgcct cttaagact aggcctggga
 55 gaaagaagag gagagagaaa gaaaggagag aag tttggag ccgaggctt aagccttcc
 E2F
 115 aa aactaat caacaactc gcggcggccc gaggaggaga gcgctggtt tttcatccca
 Sox/SRY Sox/SRY
 175 attgcacttc gccctgtctg agctccgctt cccccaact attctccgcc agatctccgc
 235 gcag

B. Ευρύτερη περιοχή του ΕΚΚΙΝΗΤΗ

Υποστηρίζει την έκφραση του γονιδίου στα EC κύτταρα—in vitro σύστημα για τα κύτταρα του επιβλάστη— ειδικά όταν βρίσκονται σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Έχουν χαρακτηριστεί έξι θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων: ένα CCAAT box/ NF-Y, δύο Ets θέσεις και μια θέση Sp1. Επιπλέον, υπάρχει μια POU θέση και μια Sox/SRY θέση. Εντός της 5' αμετάφραστης περιοχής υπάρχει μια ακόμα Sox/SRY θέση. Επίσης, υπάρχει μια E2F θέση (36).

239 ggccgt gcacgccag gcccccgcc gcggcccctg catcccggcc cccgagcgcg
 295 gccccacag tcccgcccg gccaggggtt ggccggccgc gcggggccgc gcccccag
 355 cgcccgatg tataacatga tgagacgga gctgaagccg ccgggccgcg agcaagcttc

415 gggggggcgc gcggaggag gcaacgccac ggccggcggc accggcgcca accagaagaa
 475 cagcccggac cgcgtcaaga ggccatgaa cgccttcctg gtatggctcc gggggcagcg
 535 gcgtaagatg gcccaggaga accccaagat gcacaactcg gagatcagca agcgcctggg
 595 cgcggagtg aaacttttgt ccgagaccga gaagcggcgc ttcatcgacg aggcacaagcg
 655 gctgcgcgct ctgcacatga aggagcacc ggattataaa taccggccgc gcgggaaaac
 715 caagacgctc atgagaagg ataagtacac gcttcccgga ggcttgctgg ccccggcggc
 775 gaacagcatg gcgagcggg ttgggtggtg ccgcggcctg ggtgcggcg tgaaccagcg
 835 catggacagc tacgcgcaca tgaacggctg gagcaacggc agctacagca tgatgcagga
 895 gcagctgggc taccgcgac acccggcct caacgctcac ggcgccgac agatgcaacc
 955 gatgcaccgc tacgagctca gcgccctgca gtacaactcc atgaccagct cgcagacctc
 1015 catgaaccgc tegcccact acagcatgct ctactcgcag cagggcacc ccggtatggc
 1075 gctgggctcc atgggctctg tggtaagtc cgaggccagc tccagccccc ccgtggttac
 1135 ctcttctcc cactccaggg cgcctgccca ggccggggac ctccgggaca tgatcagcat
 1195 gtacctccc ggccgcgagg tgcgggagc cgtcgcgcc agtagactgc acatggccca
 1255 gcactaccag agcggcccgg tgcggccac ggccattaac ggcacactgc cctgtcgca
 1315 catgtgaggg ctggactgct aactggagaa ggggagagat ttcaaaagag atacaagga
 1375 attgggaggg gtgcaaaaag aggagagtag gaaaaactcg ataagtctca aaaggaaaa
 1435 aaatctccgc agcgaacga cagctgcgga aaaaaaccac caatcccac caaattaacg
 1495 caaaaaccgt gatgccgact agaaaaacttt tatgagagat cttgggactt cttttgggg
 1555 gactattttt gtacagagaa aacctgaggg cggcggggag ggcgggggaa tccgaccatg
 1615 tatagatctg gaggaaaaaa actacgcaa actttttttt aaagtcttag tggtagctta
 1675 ggccgtctgc agggagtctc caaaagtctt taccagtaat atttagagct agactccggg
 1735 cgatgaaaaa aaagtctttaa ttttgcaag caacttttgt acagtattta tcgagataaa
 1795 catggcaatc aaatgtccat tgtttataag ctgagaattt gccaatattt ttcgaggaaa
 1855 gggttctctc tgggttttga ttctgcagct taaatttagg accgttacaa acaaggagg
 1915 agttttatct gatttgaaca ttttagtttt aaaattgtac aaaggaaaa catgagagca
 1975 agtactggca agaccgtttt cttggtcttg ttaaggcaa acgttctaga ttgtactaaa
 2035 tttttaactt actgttaaag gcaaaaaaaa aatgtccatg caggttgata tcgttggtaa
 2095 tttataatag cttttgttca atcctaccct ttcattttgt tcacataaaa aatattggaat
 2155 tactgtgttt gaaatatttt cttatggttt gtaatatctc tgtaaatgt gatattttaa
 2215 ggtttttccc cccttttttt tccgtagtt ttattttaaa agattcggct ctgttatg
 2275 aatcagctg ccgagaatcc atgtatata ttgaactaat accatcctta taacagctac

3835 tcttttcatt tcaggtgtag agttggttgt ttgattcttt attttcgttt ttagggtaag

3895 gtactgggaa gggacattta ttcagttccc agtccaagct aggcaggttc ccctc

3950 taatt

3955 aatgcagaga ctctaaaaga atttcccggg ctcgggcagc cattgtgatg catabaggat

Sox/Oct like

4015 tattcacgtg gtaatg

4031 agca cagtcgacag ttcttgetca cacataggaa taaaagaac

Γ. 3' πλείο-/πόλυ-δύναμο ρυθμιστικό στοιχείο

Η ίδια αλληλουχία δρα ως ενισχυτής σε πλειοδύναμα EBK και σε πολυδύναμα NBK. Όλοι οι POU παράγοντες της τάξης III, όπως ο Brn1 και ο Brn2, που εκφράζονται στον εγκέφαλο μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκο με τον Sox2 και να ενισχύσουν την δραστικότητα της περιοχής (44). Μέσω πειραμάτων ανοσο-κατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP assay) επιβεβαιώθηκε ότι ο Brn1 και ο Brn2 δημιουργούν σύμπλοκο με τον Sox2, το οποίο προσδένεται σε αυτήν την περιοχή (49).

■ Ρυθμιστικές αλληλουχίες aaaa Εκκινήτες για αντίδραση PCR

■ Εξώνια ■ mRNA

▣ Θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων

□ Υποθετικές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων

* Η αλληλουχία έχει αριθμηθεί θέτοντας το σημείο έναρξης της μεταγραφής ως +1.

Πίνακας 5: Εκκριντές για τις ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου Sox2.

Προσέχ	Κριτήριο	Μήκος (nt)	Αλληλουχία 5'→3'	Συμπληρωματική αλληλουχία 3'→5'	Οίση πρόεέσης	GC%	Melt °C	Sidimes (bp)	Hidimes (bp)
SRR1 proximal	Forward	22	GGA GAT AAA ACT CTC ATA GCC C	GGG CTA TGA GAG TTT TAT CTC C	-3965 έως -3946	45.5	52.5	4	
	Reversed	19	GCC AGA AGC CTT AAC TGC C	GGC AGT TAA GGC TTC TGG C	-3481 έως -3463	57.9	56.5	4	4
SRR1 minimal	Forward	18	GCT TTC CCC CAA TAC TGG	CCA GTA TTG GGG GAA AGC	-3853 έως -3836	55.6	53.1	3	
	Reversed	18	GCA TTT GAG TGG GTT CCC	GGG AAC CCA CTC AAA TGC	-3715 έως -3698	56.6	53.9	3	4
Prox. Prom. 1/3	Forward	19	CGA CAA GGT TGG AAG AGG G	CCC TGT TCC AAC CTT GTC G	-575 έως -557	57.9	56.5	3	
	Reversed	20	GTT TTC AGC AAC AGG TCA CG	CGT GAC CTG TTG CTG AAA AC	-304 έως -285	50.0	54.6	3	4
Prox. Prom. (C-CAAT box)	Forward	20	GTG ACC TGT TGC TGA AAA CG	CGT TTT CAG CAA CAG GTC AC	-305 έως -286	50.0	54.6	3	
	Reversed	18	CTC TGC CTT GAC AAC TCC	GGA GTT GTC AAG GCA GAG	-34 έως -7	56.6	52.9	3	4
Prox. Prom. 3/3	Forward	18	GGA GTT GTC AAG GCA GAG	CTC TGC CTT GAC AAC TCC	-24 έως -7	56.6	52.9	3	
	Reversed	20	CCG TCT CCA TCA TGT TAT AC	GTA TAA CAT GAT GGA GAC GG	+364 έως +383	45.0	50.0	4	4
Prox. Prom. 1/2	Forward	19	CGA CAA GGT TGG AAG AGG G	CCC TGT TCC AAC CTT GTC G	-575 έως -557	57.9	55.5	3	
	Reversed	23	GTC AGG GAA TAA ATG GGT TTC CG	CGG AAA CCC ATT TAT TCC CTG AC	-97 έως -75	47.8	56.0	4	4
Prox. Prom. 2/2	Forward	20	CCA TTT ATT CCC TGA CAG CC	GGC TGT CAG GGA ATA AAT GG	-80 έως -71	50.0	53.4	3	
	Reversed	20	CCG TCT CCA TCA TGT TAT AC	GTA TAA CAT GAT GGA GAC GG	+364 έως +383	45.0	50.0	4	3
SRR2	Forward	21	TCA TTT CAG GTG TAG AGT TGG	CCA ACT CTA CAC CTG AAA TGA	+3840 έως +3870	42.9	52.1	2	
	Reversed	21	CCT ATG TGT GAG CAA GAA CTG	CAG TTC TTG CTC ACA CAT AGG	+4042 έως +4052	40.6	53.3	2	4
Nestin	Forward	20	TTG TCT GTC ACC AGC TCT GG	CCA GAG CTG GTG ACA GAC AA		55.0	57.0	4	5
	Reversed	21	TTC GAT CAG ACT CCT CAG ATC	GAT CTG AGG AGT CTG ATC GAA		47.6	53.3	4	
β-actin	Forward	20	GGT CAG AAG GAC TCC TAT GT	ACA TAG GAG TCC TTC TGA CC		50.0	53.3	4	
	Reversed	20	ATG AGG TAG TCT GTC AGG TC	GAC CTG ACA GAC TAC CTC AT		50.0	53.1	3	4

4. Υλικά και μέθοδοι

Καλλιέργεια κυττάρων

CCE Sox2^{βgeo/+} ESC από *M.musculus* διατηρήθηκαν για μια βδομάδα σε μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Cat. No. 21969-035) που περιείχε 15% ορό εμβρύου από βόδι (Pan Biotech), 0.1mM 2-μερκαπτοαιθανόλη (Gibco, Cat. No. 31350-010), 100units/mL πενικιλίνη, 100mg/mL στρεπτομυκίνη, 292μg/mL γλουταμίνη, 250μg/mL Geneticin (Gibco, Cat. No. 10131-019) και 1000units/mL από ανασυνδυασμένο LIF σε ζελατινοποιημένα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Κατόπιν, δημιουργήθηκαν εμβρυονικά συσσωματώματα σε πιάτα Petri υπό συγκεκριμένες συνθήκες που επιτρέπουν την διαφοροποίηση σε κύτταρα αρχέγονου εξωδέρματος (AE).

Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP)

Πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με χρήση του πρωτοκόλλου που παρέχεται στο διαδίκτυο από την εταιρεία Upstate (www.upstate.com), με ορισμένες τροποποιήσεις. Οι πρωτεΐνες και το DNA από CCE Sox2^{βgeo/+} ECS (2.1x10⁷ κύτταρα) και από κύτταρα αρχέγονου εξωδέρματος-AE (2.7x10⁷ κύτταρα) μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη φορμαλδεΐδης απ' ευθείας στο θρεπτικό μέσο, σε τελική συγκέντρωση 1% και επώαση 10 λεπτών στους 37 °C. Κατόπιν, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (1mM PMSF, 1μg/mL aprotinin and 1μg/mL pepstatin A). Τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια erppendorf 1,5mL. Προστέθηκαν 200μL IP₁₀₀ buffer (0,1% NP-40, 5mM MgCl₂, 10% γλυκερόλη, 25mM Tris-HCl pH=7.9, 0.3mM DTT, 100mM KCl) —που περιείχε αναστολείς πρωτεασών— σε κάθε σωληνάκι και επωάστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο προτού πραγματοποιηθεί τμηματισμός της χρωματίνης με υπερήχους (sonication), ώστε να δημιουργηθούν τμήματα μήκους 200-500 bp. Η εφαρμογή υπερήχων πραγματοποιήθηκε 10 φορές ανά δείγμα, σε ισχύς 10 Watt, για 10 δευτερόλεπτα, με διάλλειμα ενός λεπτού κάθε φορά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 10 λεπτών στους 4 °C σε 13.000 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο επωάστηκε με 40μL μίγματος DNA σπέρματος σολομού/πρωτεΐνη A beads (Upstate Biotechnology) και 40μL DNA σπέρματος σολομού/πρωτεΐνη G (αναλογία 1:1) (Upstate Biotechnology) για 2 ώρες στους 4 °C σε κινούμενη πλατφόρμα, ώστε να απομακρυνθούν όσες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις σφαίρες αγαρόζης. Την ίδια στιγμή πραγματοποιήθηκε επώαση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιούσαμε με 80μL σπέρματος σολομού/πρωτεΐνη G —για μονοκλωνικά αντισώματα— και 80μL σπέρματος σολομού/πρωτεΐνη A —για πολυκλωνικά αντισώματα— σε 50μL διαλύματος IP₁₀₀ για 2 ώρες στους 4 °C σε κινούμενη πλατφόρμα. Ύστερα από μια απαλή φυγοκέντρηση το καθαρό υπερκείμενο μοιράστηκε στα σωληνάκια erppendorf που περιείχαν τα επιθυμητά αντισώματα. Ο όγκος αντίδρασης ρυθμίστηκε στα 250μL και ακολούθησε επώαση

για Ο/Ν στους 4 °C σε κινούμενη πλατφόρμα. Την επόμενη μέρα οι σφαίρες αγαρόζης περιμαζευτήκαν με απαλή φυγοκέντρηση και πραγματοποιήθηκαν πλυσίματα με 1mL από τα ακόλουθα διαλύματα για 5 λεπτά σε κινούμενη πλατφόρμα: ένα πλύσιμο με Low Salt Immune Complex Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH=8.1, 150mM NaCl), ένα πλύσιμο με High Salt Immune Complex Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH=8.1, 500mM NaCl), ένα πλύσιμο με LiCl Immune Complex Wash Buffer [0.25M LiCl, 1% IGEPAL CA630, 1% deoxycholic acid (άλας ασβεστίου), 1mM EDTA, 10mM Tris, pH=8.1] και δύο πλυσίματα με TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH=8.0, 1mM EDTA). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των κατακρημνισμένων τμημάτων από τις σφαίρες αγαρόζης με Elution Buffer (1% SDS, 100mM sodium carbonate) συνολικά για 30 λεπτά. Ο τελικός όγκος ορίστηκε στα 600μL. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αναστροφή της μονιμοποίησης με προσθήκη NaCl τελικής συγκέντρωσης 200mM για 4 ώρες στους 65 °C. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης αναγράφονται στον κάτωθι πίνακα:

#	Cell type	Protein	Lot number	Specie	Concentration	Volume	Incubation
1	Embryonic stem cells	Acetylated Histone 3	06-599	Rabbit (polyclonal)	1 μg/μL	10 μL	Protein A
2	Embryonic stem cells	TIF1α	5T-1E8	Mouse (monoclonal)	6 μg/μL	30 μL	Protein G
3	Embryonic stem cells	HA	631207	Rabbit (polyclonal)	0.1 μg/μL	30 μL	Protein A
4	Primitive ectodem cells	Acetylated Histone 3	06-599	Rabbit (polyclonal)	1 μg/μL	10 μL	Protein A
5	Primitive ectodem cells	TIF1α	5T-1E8	Mouse (monoclonal)	6 μg/μL	30 μL	Protein G
6	Primitive ectodem cells	HA	631207	Rabbit (polyclonal)	0.1 μg/μL	30 μL	Protein A

Αντίδραση με πρωτεΐνωση Κ

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 6μL 10% SDS (τελική συγκέντρωση 0,1%), 12μL 0,5M EDTA, 24μL 1M Tris-HCl, pH 6,5 και 2,5μL από 10mg/mL πρωτεΐνωση Κ. Ύστερα, ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 45 °C.

Καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Προσθέσαμε με ίσο όγκο φαινόλη/χλωροφόρμιο (250μL φαινόλη και 250μL χλωροφόρμιο) και αραιώσαμε την υδατική φάση (~400 μL) σε 2,5 όγκους καθαρής EtOH (1000 μL), 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M (40μL), 1 μL γλυκογόνο 20 mg/mL και επώασαμε για 4 μέρες στους -20 °C. Ξεπλύνουμε το ίζημα με 70% EtOH, ώστε να απομακρύνουμε τα αλάτια και επαναδιαλύσαμε σε 50 μL TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA). Αποθηκεύσαμε τα δείγματα στους -20 °C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR)

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 20μL. Κάθε αντίδραση περιείχε: 100μg/μL BSA (B90015-Biolabs), 1x Buffer Mg²⁺ minus (Hy Test), 1.5mM MgCl₂, 5pmol/μL εκκινητές, 1mM dNTPs (HT Biotechnology LTD) —0,25mM από το καθένα, 1unit Taq πολυμεράση (Hy Test). Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον κάτωθι πίνακα. Στα δείγματα προστέθηκε χρωστική Orange G 10x (0.4 g/mL sucrose, 2mg/mL orange G) και ηλεκτροφορήθηκαν σε 1,5% πηκτή αγαρόζης σε TAE buffer 1x (40mM Tris base, 1,142 v/v glacial acetic acid, 0.744 w/v Na₂EDTA-2H₂O).

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Επεξήγηση
1ο	95 °C	4 min	Ενεργοποίηση Taq πολυμεράσης
2ο	96 °C	30 sec	Αποδιάταξη
3ο	*****	45 sec	Υβριδοποίηση
4ο	72 °C	1 min	Πολυμερισμός
5ο	Βήμα 2 ^ο για 34 φορές		
6ο	72 °C	5 min	Συμπλήρωση άκρων
7ο	16 °C	10 min	Τερματισμός

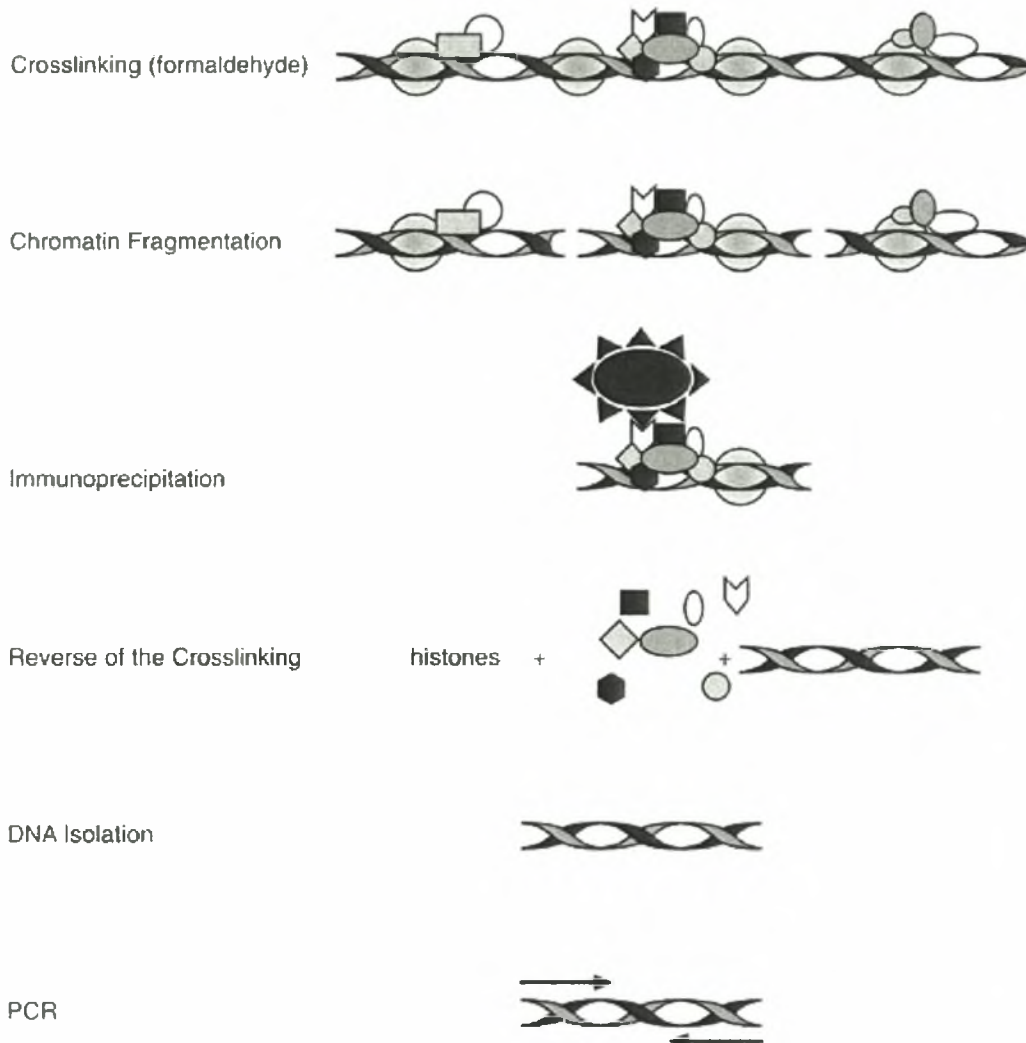
*****Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών και συγκεκριμένα είναι ανάλογη του ποσοστού GC%. Οι θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις είναι:

Εκκινητές	Αλληλουχία	Ποσοστό GC	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος
SRR1-a	F: 5'- GGA GAT AAA ACT CTC ATA GCC C -3' R: 5'- GCC AGA AGC CTT AAC TGC C -3'	45,5% 57,9%	58,3 °C	503 bp
SRR1-b	F: 5'- GCT TTC CCC CAA TAC TGG -3' R: 5'- GCA TTT GAG TGG GTT CCC -3'	55,6% 55,6%	58,3 °C	156 bp
CCAAT box region	F: 5'- GTG ACC TGT TGC TGA AAA CG -3' R: 5'- CTC TGC CTT GAC AAC TCC -3'	50,0% 55,6%	59,5 °C	292 bp
SRR2 region	F: 5'- TCA TTT CAG GTG TAG AGT TGG -3' R: 5'- CCT ATG TGT GAG CAA GAA CTG -3'	52,1% 53,3%	62 °C	223 bp
β-actin	F: 5'- GGT CAG AAG GAC TCC TAT GT -3' R: 5'- ATG AGG TAG TCT GTC AGG TC -3'	53,3% 53,1%	62,8 °C	881 bp

5. Πειραματική προσέγγιση

Αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης ώστε να εξετάσουμε in vivo το επιγενετικό προφίλ της των ρυθμιστικών περιοχών του Sox2. Μελετάμε αν οι μετατροπή των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα αρχέγονου εξωδέρματος οφείλεται σε διαφορές στο επίπεδο της χρωματίνης.

Chromatin Immunoprecipitation



Εικόνα 28: Η ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation-ChIP) αποτελεί μια σημαντική τεχνική που μας επιτρέπει να αναλύσουμε τις αλληλεπιδράσεις του γενωμικού DNA με πρωτεΐνες *in vivo*. Μια σημαντική εφαρμογή αυτής της τεχνικής είναι η ανάλυση των τροποίσεων των ιστονών, στις οποίες βασίζεται η υπόθεση του «κώδικα των ιστονών» (58).

6. Αποτελέσματα και Συζήτηση

Κατά την day post coitum 4 (d.p.c. 4), τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ΕΚΜ) διαφοροποιούνται σε αρχέγονο εξώδερμα, το οποίο είναι ένας πλειοδύναμος πληθυσμός κυττάρων που όμως δεν έχει δυνατότητα να δώσει γένεση σε κύτταρα αρχέγονου ενδοδέρματος, σε αντίθεση με τα κύτταρα της ΕΚΜ (Εικόνα 12). Κατά την φάση αυτή, παρατηρείται έντονη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι τα

γονίδια Fgf5, Rex1 και Gbx2 παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ των κυττάρων της ΕΚΜ και του αρχέγονου εξωδέρματος (59, 60). Ο παράγοντας FGF5 παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα του αρχέγονου εξωδέρματος, ενώ απουσιάζει από τα κύτταρα της ΕΚΜ. Ο παράγοντας Rex-1, ενεργοποιείται από τον Sox2 και τον NANOG (61) και αποτελεί έναν γενετικό δείκτη για αδιαφοροποίητα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Το γονίδιο Gbx2 είναι ένα από τα πέντε γονίδια που παρουσίασαν σημαντική μείωση της έκφρασης τους ύστερα από την απομάκρυνση του παράγοντα LIF από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού. Τα υπόλοιπα τέσσερα γονίδια είναι το Stat3, το Rex-1, το Bmp4 και το Sox2 (62).

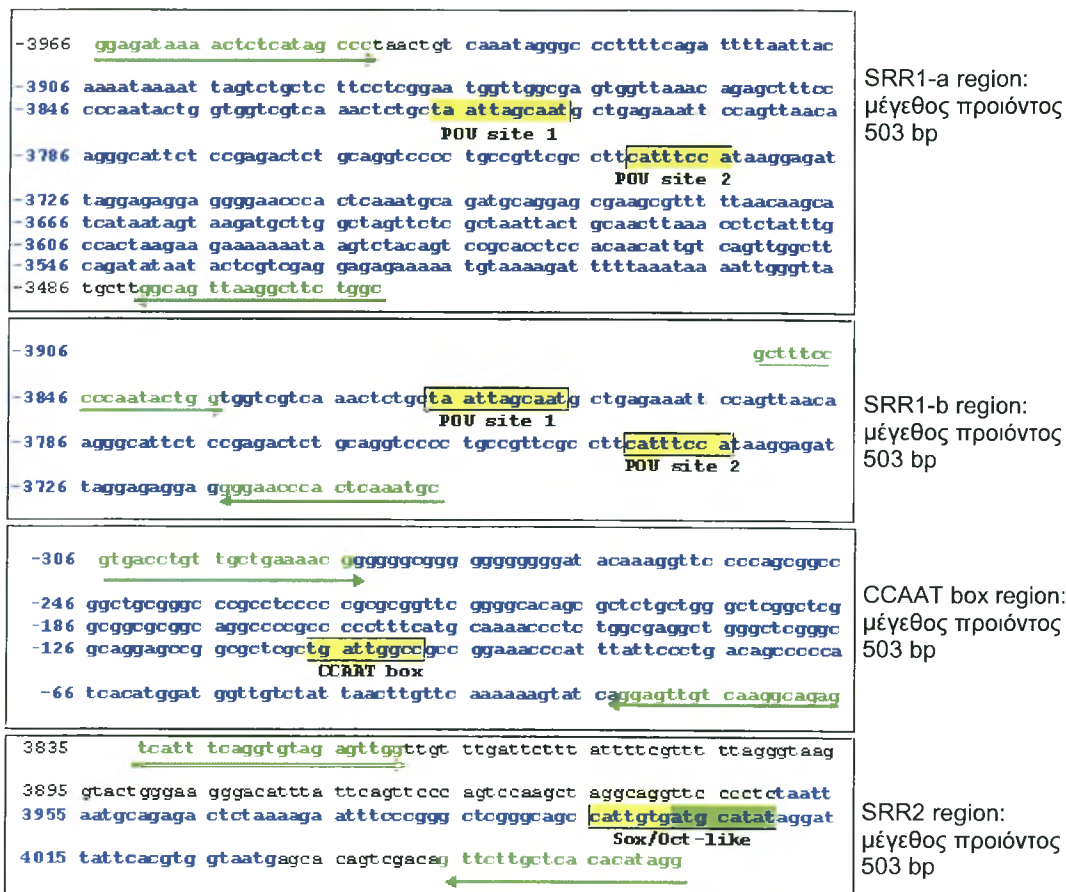
Για να πιστοποιήσουμε την ταυτότητα των κυττάρων που καλλιεργήσαμε, πραγματοποιήσαμε απομόνωση RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις RT-PCR με χρήση εκκινήτων για τα γονίδια: Gbx2, Oct4, Nanog, Fgf5, Pax6, Brachyury και Bmp4 (Κοτσώνη Α., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Γονίδιο	ΕΒ	ΑΕ
Gbx2	+	-
Oct4	++	+
Nanog	++	+++
Fgf5	-	+++
Pax6	-	+
Brachyury	-	+
Bmp4	-	+

Ο Oct4 αποτελεί έναν από τους συνηθέστερους γενετικούς δείκτες για αδιαφοροποίητα ΕΒΚ. Ο Pax6 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται κατά την διαφοροποίηση των ΕΒΚ σε νευροεπιθηλικά. Το Brachyury είναι κρίσιμος παράγοντας για τον σχηματισμό μεσοδέρματος και αποτελεί έναν από τους πρώιμους γενετικούς δείκτες της παρουσίας πρόδρομων μεσοδερμικών κυττάρων (16).

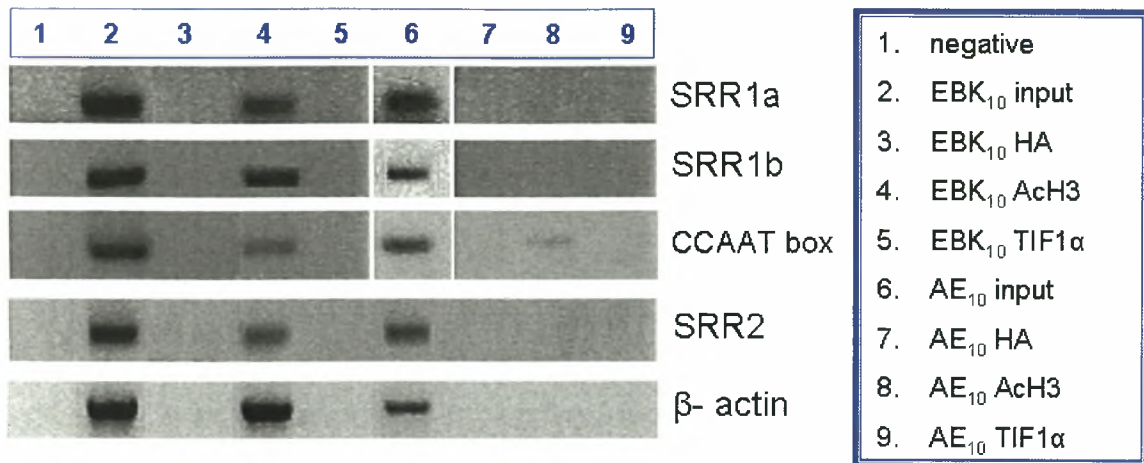
Ακετυλιωμένα Η3

Η ακετυλίωση της ιστόνης 3, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια επιγενετική ρύθμιση η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA με το βασικό αμινο-τελικό άκρο των ιστονών. Η ομοιοπολική αυτή ρύθμιση προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, επιτρέποντας την πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων.



Εικόνα 29: Απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης PCR

Στην Εικόνα 30 βλέπουμε ότι η περιοχή SRR1-a region, όπως και η SRR1-b region στα EBK περιέχει ιστόνη 3 στην ακετυλιωμένη μορφή της (AcK9-H3 ή/και AcK14-H3), υποδεικνύοντας ότι η χρωματίνη βρίσκεται στην μεταγραφικά ενεργή κατάσταση. Αντιθέτως, στο AEK δεν παρατηρείται αυτό. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο συγκεκριμένος ενισχυτής είναι ανενεργός κατά το αναπτυξιακό στάδιο του AE, αφού η χρωματίνη βρίσκεται στην μη ακετυλιωμένη μορφή της εμποδίζοντας την πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων. Για την περιοχή CCAAT box region παρατηρούμε ότι η ακετυλίωση της H3 δεν παρουσιάζει διαφοροποίηση, γεγονός που είναι αναμενόμενο αφού η συγκεκριμένη περιοχή του βασικού προαγωγέα του γονιδίου έχει δείχτει (36, 44) ότι παραμένει ενεργή ακόμα και σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Τέλος, η SRR2 region εμφανίζει παρόμοιο πρότυπο ακετυλίωσης της H3 με την SRR1-a region και την SRR1-b region.



Εικόνα 30: Τα δείγματα 6 (AE₁₀ input) με τους εκκινητές για τις περιοχές SRR1-a, SRR1-b και CCAAT box δώσανε προϊόν σε θερμοκρασία χαμηλότερη από τα υπόλοιπα δείγματα (συγκεκριμένα σε 58,3 °C, 58,3 °C και 59,5 °C, αντίστοιχα). Αυτό μπορεί να συνέβη επειδή τα κύτταρα του αρχέγονου εξωδέρματος, επωαστήκαν με 1% φορμαλδεΐδη (βλ. Υλικά και μέθοδοι-Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης) και ύστερα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C έως ότου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Αυτό μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη σταθερότητα του DNA, ώστε να απαιτείται χαμηλότερη θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών.

Συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του Sox2 στα EBK μπορεί να επαχθεί από το σύνολο των ρυθμιστικών αλληλουχιών, ενώ στα NE επάγεται μόνο από τον βασικό προαγωγέα του γονιδίου. Για να εξακριβωθεί αυτό το συμπέρασμα απαιτείται επανάληψη των πειραμάτων, διευρύνοντας την λίστα των αντισωμάτων, ώστε να μελετήσουμε επιπλέον τροποποιήσεις των ιστονών που εμπλέκονται στην μεταγραφική ρύθμιση, όπως Met-K4H3, Met-K9H3, Phospho-S10H3 κ.τ.λ.

TIF1 α

Ο TIF1 α είναι μια μη-ιστονική χρωμοσωμική πρωτεΐνη, με δράση κινάσης, που θεωρείται δείκτης για ευχρωματινικές περιοχές σε ολοδύναμα και πολυδύναμα κύτταρα (53). Έχει δειχθεί ότι αποτελεί το κύριο μόριο μεσολάβησης στον έλεγχο μεταγραφικής ρύθμισης μέσω πυρηνικών υποδοχέων, όπως του οιστρογόνου (ER α) και του ρετινοϊκού οξέος (RXR α). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη επιδιόρθωσης T:G mismatch-specific thymine-DNA Glycosylase (TDG) ενεργοποιείται από πυρηνικούς υποδοχείς και δρα ως συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής (52). Από πειράματα ανάλυσης δύο υβριδίων στην μαγιά διαπιστώσαμε ότι η πρωτεΐνη TDG συνδέεται με την πρωτεΐνη SOX2 (Ρεμπούτσικα & συνεργάτες, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η αφθονία του παράγοντα TIF1 α στις ευχρωματινικές περιοχές αδιαφοροποίητων κυττάρων, η εμπλοκή του στην ενεργοποίηση της TDG και η ύπαρξη αυτό-ρύθμισης στο γονίδιο Sox2 (43, 44) μας ώθησε να μελετήσουμε την πιθανότητα της πρόσδεσης

του TIF1a στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του Sox2. Μέχρις στιγμής τα αποτελέσματα που έχουμε για τον TIF1a από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης είναι αρνητικά (Εικόνα 30).

7. Γλωσσάριο

Αστροκύτταρο: Ένα από τα μεγαλύτερα κύτταρα της γλοίας στο νευρικό σύστημα.

Ασύμμετρη διαίρεση: Στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων, τα κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα δίνοντας ένα βλαστικό κύτταρο κατά εικόνα και κατά ομοίωση του πατρικού κυττάρου (ιδιότητα αυτό-ανανέωσης) και ένα το οποίο αρχίζει να διαφοροποιείται.

Bromodomain (BMD): Πρωτεϊνική περιοχή που απαντάται σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, η οποία τους καθιστά ικανούς να προσδεθούν σε ακετυλιωμένες λυσίνες των ιστονών.

Βλαστοκύστη: Έμβρυο πριν την εμφύτευση που αποτελείται από 30-150 κύτταρα. Είναι σφαιρικού σχήματος και αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα κυττάρων (το τροφοεξώδερμα), μια κύστη γεμάτη με υγρό (την βλαστοκοίλη) και μια ομάδα κυττάρων στο εσωτερικό (εσωτερική κυτταρική μάζα-EKM)

CBP: CREB (Cre binding protein)-binding protein

Chromodomain (CD): Πρωτεϊνική περιοχή που είναι παρούσα σε αρκετές πρωτεΐνες που ανήκουν σε σύμπλοκα αναδιάταξης και τροποποίησης της χρωματίνης. Εμπλέκονται στην ανάγνωση του «κώδικα των ιστονών», αφού λειτουργούν ως άγκυρα για πρόσδεση σε μεθυλιωμένες ιστόνες. Συνήθως, σχετίζονται με καταστολή της μεταγραφής.

Γενετικό αποτύπωμα: Ένα επιγενετικό φαινόμενο το οποίο επηρεάζει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Η έκφραση εξαρτάται από την προέλευση του γονιδίου, επειδή το μητρικό και το πατρικό γένωμα διαθέτουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους. Στο φαινόμενο αυτό οφείλονται μερικές γενετικές ασθένειες του ανθρώπου, όπως το σύνδρομο Angelman.

dpc: days post coitus

Διαφοροποίηση: Η διαδικασία μέσω της οποίας ένα πρώιμο εμβρυϊκό κύτταρο —το οποίο δεν διαθέτει καμία εξειδίκευση— αποκτά χαρακτηριστικά που του προσδίδουν εξειδίκευση.

Ex vivo: Εκτός οργανισμού.

EKM (Εσωτερική κυτταρική μάζα): Ομάδα κυττάρων στο εσωτερικό της βλαστοκύστης. Αυτά τα κύτταρα δίνουν γένεση σε όλο το έμβρυο.

Εμβρυονικά συσσωματώματα: Συμπαγής κυτταρικές δομές που σχηματίζονται υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας βλαστικών κυττάρων. Τα εμβρυονικά συσσωματώματα

περιέχουν κύτταρα από τα τρία αρχέγονα εμβρυικά στρώματα: ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα.

Εξώδερμα: Το ανώτερο, εξωτερικό στρώμα κυττάρων από τα τρία αρχέγονα στρώματα του εμβρύου. Δίνει γένεση στην επιδερμίδα και το νευρικό σύστημα.

Ετεροχρωματίνη: Δομή της χρωματίνης που παραμένει συμπυκνωμένη καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, σε αντίθεση με το υπόλοιπο γένωμα (**Ευχρωματίνη**). Αποτελείται κυρίως από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, δεν περιέχει μεταγραφικά ενεργά γονίδια και αντιγράφεται κατά το τέλος της φάσης S.

FGF-4 (Fibroblast growth factor 4): Απαραίτητος για την διατήρηση της βλαστικότητας των κυττάρων του επιβλάστη.

Φορμαλδεΰδη: Αντιδραστήριο που διαπερνά ταχύτατα τις βιολογικές μεμβράνες και δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς C-N, με αποτέλεσμα την μονιμοποίηση ιστών σε ανοσοϊστοχημεία ή την μονιμοποίηση συμπλόκων κατά την εκχύλιση κυττάρων.

G418 (Geneticin): Αντιβιοτικό για επιλογή κυττάρων που διαθέτουν το γονίδιο αντίστασης στην νεομυκίνη.

GAL4 binding domain: Περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 της μαγιάς.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein): Δομική πρωτεΐνη που παράγεται ειδικά από τα αστροκύτταρα. Λόγω αυτής της ιδιαιτερότητας χρησιμοποιείται ως δείκτης των αστροκυττάρων.

In utero: Στην μήτρα.

In vitro: Κυριολεκτικά σημαίνει «μέσα σε γυαλί». Στην επιστημονική ορολογία χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός τεχνητού περιβάλλοντος.

KRAB (Krüppel-associated box): Συντηρημένη πρωτεϊνική περιοχή παρούσα σε αρκετούς καταστολείς της μεταγραφής.

LIF (Leukemia inhibitory factor): Αυξητικός παράγοντας απαραίτητος για την διατήρηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων σε κατάσταση πολλαπλασιασμού και αδιαφοροποίησης.

MBD: methyl-CpG-binding domain protein

Ομοιοτική περιοχή: Πρωτεϊνική περιοχή που κωδικοποιείται από μια ομοιοτική αλληλουχία. Αποτελείται από περίπου 60 αμινοξέα. Οι παράγοντες που την διαθέτουν είναι ικανοί να αναγνωρίσουν μια αλληλουχία DNA πλούσια σε AT και να προσδεθούν σε αυτήν.

PEV: Position effect variation

POU domain: Πρωτεϊνική περιοχή η οποία σχετίζεται με ειδικές οχταμερείς αλληλουχίες στο DNA, όπως 5'- ATGCAAAT -3'. Αρχικά ανακαλύφθηκε στους μεταγραφικούς παράγοντες PIT1, Qct1 και 2 και UNC86.

Πλαστικότητα: Η δυνατότητα των βλαστικών κυττάρων από ιστού ενηλίκου να δημιουργήσουν διαφοροποιημένους κυτταρικούς τύπους ενός άλλου ιστού.

SET domain: Πρωτεϊνική περιοχή που χρησιμεύει σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και βρίσκεται συνήθως σε πρωτεΐνες που τροποποιούν την δομή της χρωματίνης. Οι πρωτεΐνες που την διαθέτουν παρουσιάζουν κυρίως δραστικότητα μεθυλ-τρανσφεράσης. Το όνομά της προήλθε από τις πρωτεΐνες που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά: SuVar39H, Ez και Tritrithorax.

STAT3: Signal transducer and activator of transcription-3

Su(Var)s: Suppressors of PEV (position effect variation)

TDG: T:G mismatch-specific thymine-DNA Glycosylase

TIF1α: Transcription Intermediary Factor 1 alpha

VP16 AD: Περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του ερπητοϊού VP16

Τροφοεξώδερμα (TE): Το εξωτερικό κυτταρικό στρώμα της βλαστοκύστης, το οποίο δίνει γένεση στα τροφοβλαστικά κύτταρα του τοιχώματος της μήτρας κατά την εμφύτευση.

8. Αναφορές

1. Roloff TC, Nuber UA., Chromatin, epigenetics and stem cells. Eur J Cell Biol. 2005
2. Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. Mol Endocrinol. 2005
3. Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? Curr Opin Genet Dev. 2005
4. Dillon N. Heterochromatin structure and function. Biol Cell. 2004
5. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. Curr Biol. 2004
6. Hsieh J, Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate. Curr Opin Genet Dev. 2004
7. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev. 2000
8. Biron VL, McManus KJ, Hu N, Hendzel MJ, Underhill DA. Distinct dynamics and distribution of histone methyl-lysine derivatives in mouse development. Dev Biol. 2004
9. Trojer P, Reinberg D. Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. Cell. 2006 Apr 21
10. Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. Trends Genet. 2004
11. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? Genes Dev. 2004
12. Gill G. Something about SUMO inhibits transcription. Curr Opin Genet Dev. 2005
13. Nathan D, Sterner DE, Berger SL. Histone modifications: Now summoning sumoylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003
14. Hiragami K, Festenstein R. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. Cell Mol Life Sci. 2005
15. Eissenberg JC, Elgin SC. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. Curr Opin Genet Dev. 2000
16. <http://stemcells.nih.gov/>
17. Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000
18. <http://embrvology.ch>

19. Gilbert, Scott F. *Developmental Biology*. 6th edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates 2000
20. Rossant J. Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Semin Cell Dev Biol*. 2004
21. Ambrosetti DC, Scholer HR, Dailey L, Basilico C. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem*. 2000
22. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano SY, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*. 2005
23. Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2005
24. Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama M, Takahashi K, Mitsui K, Maeda M, Niwa H, Yamanaka S. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol*. 2003
25. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005
26. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005
27. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate ES cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*. 2005
28. Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage FH. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*. 2004
29. Cremazy F, Berta P, Girard F. Sox neuro, a new Drosophila Sox gene expressed in the developing central nervous system. *Mech Dev*. 2000
30. Sasai Y. Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution? *Int J Dev Biol*. 2001
31. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003
32. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest*. 2006
33. Zenteno JC, Perez-Cano HJ, Aguinaga M. Anophthalmia-esophageal atresia syndrome caused by an SOX2 gene deletion in monozygotic twin brothers with markedly discordant phenotypes. *Am J Med Genet A*. 2006
34. Sisodiya SM, Ragge NK, Cavalleri GL, Hever A, Lorenz B, Schneider A, Williamson KA, Stevens JM, Free SL, Thompson PJ, van Heyningen V, Fitzpatrick DR. Role of SOX2 mutations in human hippocampal malformations and epilepsy. *Epilepsia*. 2006 Mar
35. Hagstrom SA, Pauer GJ, Reid J, Simpson E, Crowe S, Maumenee IH, Traboulsi EI. SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am J Med Genet A*. 2005
36. Wiebe MS, Wilder PJ, Kelly D, Rizzino A. Isolation, characterization, and differential expression of the murine Sox-2 promoter. *Gene*. 2000
37. Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell*. 2003
38. Uchikawa M, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. *Mech Dev*. 2004

39. Mantovani R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*. 1999
40. Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*. 2003
41. Chu S, Ferro T.J. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene*. 2005
42. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, Dynlacht BD. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*. 2002
43. Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4—Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res*. 2002
44. Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Mol Cell Biol*. 2004
45. Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De Biasi S, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SK. Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development*. 2000
46. Catena R, Tiveron C, Ronchi A, Porta S, Ferri A, Tatangelo L, Cavallaro M, Favaro R, Ottolenghi S, Reinbold R, Scholer H, Nicolis SK. Conserved POU binding DNA sites in the Sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells. *J Biol Chem*. 2004
47. Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol*. 1999
48. Lengler J, Bittner T, Munster D, Gawad Ael-D, Graw J. Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression. *Ophthalmic Res*. 2005
49. Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, Ninomiya M, Sawamoto K, Okano H, Muramatsu M, Oguro H, Iwama A, Okuda A. The Sox2 Regulatory Region 2 Functions as a Neural Stem Cell-specific Enhancer in the Telencephalon. *J Biol Chem*. 2006
50. Cavaleri F, Scholer HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*. 2003
51. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. 2006
52. Um S, Harbers M, Benecke A, Pierrat B, Losson R, Chambon P. Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*. 1998
53. Niederreither K, Remboutsika E, Gansmuller A, Losson R, Dolle P. Expression of the transcriptional intermediary factor TIF1alpha during mouse development and in the reproductive organs. *Mech Dev*. 1999
54. Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*. 2002
55. Verger A, Perdomo J, Crossley M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*. 2003
56. Weiss MA. Floppy SOX: mutual induced fit in hmg (high-mobility group) box-DNA recognition. *Mol Endocrinol*. 2001
57. Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*. 1999
58. Remboutsika E, Yamamoto K, Harbers M, Schmutz M. The bromodomain mediates transcriptional intermediary factor 1alpha -nucleosome interactions. *J Biol Chem*. 2002
59. Pelton TA, Sharma S, Schulz TC, Rathjen J, Rathjen PD. Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. *J Cell Sci*. 2002

60. Rathjen J, Lake JA, Bettess MD, Washington JM, Chapman G, Rathjen PD. Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *J Cell Sci.* 1999
61. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem.* 2006
62. Palmqvist L, Glover CH, Hsu L, Lu M, Bossen B, Piret JM, Humphries RK, Helgason CD. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem Cells.* 2005