

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Σύγχρονες απόψεις για τη συμβολή του μεταγραφικού παράγοντα που επάγεται από την υποξία (HIF) κατά τη μορφογένεση του εμβρύου»**

**ΚΟΚΚΑΛΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ**  
**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ**

**Σεπτέμβριος 2011**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Λιάκος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Λιάκος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

Νταφόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζιντζαράς Ηλίας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιομαθηματικών- Βιομετρίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
<b>1. O<sub>2</sub> και HIFs.....</b>	<b>5</b>
1.1 Hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α).....	6
1.2 Hypoxia inducible factor 1β (HIF-1β).....	6
1.3 Ισομορφές των HIFα.....	7
1.4 Γονίδια που ενεργοποιούνται από τους HIFs.....	8
1.5 Ρύθμιση των HIFs.....	10
<b>2. Μορφογένεση του εμβρύου.....</b>	<b>12</b>
2.1 Αυλάκωση.....	12
2.2 Διαφοροποίηση και ανακατατάξεις βλαστικών κυττάρων κατά τη βλαστοκύστη και τη γαστριδίωση.....	13
2.3 Οργανογένεση.....	15
2.4 Μοριακοί μηχανισμοί κατεύθυνσης της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.....	16
2.4.1 Ανάπτυξη της βλαστοκύστης.....	16
2.4.2 Εξειδίκευση των πρωτογενών γεννητικών στρωμάτων και τα παράγωγα τους.....	17
2.4.2.1 Εξώδερμα.....	17
2.4.2.2 Μεσόδερμα.....	19
2.4.2.3 Ενδόδερμα.....	20
<b>3. O<sub>2</sub>, HIFs και μορφογένεση.....</b>	<b>21</b>
3.1 Ανάπτυξη συστημάτων.....	21
3.1.1 Η διακλάδωση στην τραχειακή ανάπτυξη.....	21
3.1.2 Μορφογένεση του αγγειακού συστήματος.....	22
3.1.3 Η πλακουντοποίηση.....	23
3.1.4 Η καρδιοαγγειακή και πνευμονική ανάπτυξη.....	23
3.1.5 Η μορφογένεση των οστών.....	25
3.1.6 Η λιπογένεση.....	25
3.2 Τα βλαστικά κύτταρα.....	26

3.2.1 Υποξικός έλεγχος της συμπεριφοράς των βλαστικών κυττάρων.....	28
3.2.2 Οι HIFs στη διαφοροποίηση των βλαστικών και των προγεννητικών κυττάρων.....	28
3.2.3 Η δραστικότητα του Notch, η διαθεσιμότητα του O <sub>2</sub> και οι HIFs.....	29
3.2.4 Η δραστικότητα του Wnt.....	31
3.2.5 Ρύθμιση του OCT4.....	31
3.2.6 Επίδραση στον «αναπρογραμματισμό» των ενήλικων κυττάρων.....	33
<b>4. Συνεργαζόμενοι με τον HIF μηχανισμοί στη μορφογένεση των εμβρύων.....</b>	<b>33</b>
Συμπεράσματα- Συζήτηση.....	35
Βιβλιογραφία.....	38

## Περίληψη

Το έμβρυο κατά τη μορφογένεσή του, δηλαδή τη διαδικασία της έντονης κινητικότητας και μετατόπισης κυτταρικών στρωμάτων, που προκαλεί μεταβολές στη δομική οργάνωση και την εξωτερική όψη του εμβρύου και έχει ως αποτέλεσμα τον τελικό σχηματισμό του οργανισμού, παρουσιάζει μεταβολές της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Τα κύτταρα του εμβρύου αντιδρούν στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου διεγείροντας την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία (HIFs). Οι HIFs με τη σειρά τους επάγουν τη μεταγραφή σε περισσότερα από 70 γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, τη μεταφορά γλυκόζης, τη γλυκόλυση, την πρόσληψη του σιδήρου, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη τους.

Η σύγχρονη βιβλιογραφία παρουσιάζει τη λειτουργία των HIFs σε πολλά είδη, και στον άνθρωπο, και υποστηρίζει τη σημαντικότητά τους, μαζί με τις μεταβολές του O<sub>2</sub>, ως ρυθμιστές-κλειδί στα βασικά στάδια της μορφογένεσης του εμβρύου. Πιο συγκεκριμένα, οι HIFs υποστηρίζεται ότι ρυθμίζουν πολλαπλά αναπτυξιακά στάδια, όπως η μορφογένεση των αγγείων, η διακλάδωση της τραχείας, η διαμόρφωση του καρδιαγγειακού και του πνευμονικού συστήματος, η πλακουντοποίηση, η λιπογένεση και η μορφογένεση των οστών. Επίσης, οι HIFs έχει δείχθει ότι είναι υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση και τη συμπεριφορά των βλαστικών κυττάρων μέσω διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης, όπως αυτό του Notch, του Wnt και του μεταγραφικού παράγοντα OCT4.

Μελέτες σε διαγονιδιακούς ποντικούς με απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τις διάφορες ισομορφές της HIFα έδειξαν ότι τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας HIFα επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες που είναι σημαντικές για την ιστοειδική απόκριση στην υποξία. Πιο συγκεκριμένα, στην καρδιαγγειακή και πνευμονική ανάπτυξη, οι HIF-1α και HIF-2α ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο τα συστήματα αυτά. Συνεπώς οι δύο αυτές πρωτεΐνες, πιθανόν, να ρυθμίζουν επικαλυπτόμενες, και όχι πανομοιότυπες κατευθύνσεις διαφοροποίησης του εμβρύου.

Τέλος, αν και οι HIFs ρυθμίζονται από την υποξία, παρατηρείται ότι συνεργάζονται με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια ώστε να παρέχουν τις ιδανικές προσαρμογές για την ομαλή διαμόρφωση και οργανογένεση του εμβρύου στην υποξία.

## 1. O<sub>2</sub> και HIFs

Στα αναπτυσσόμενα έμβρυα, φυσιολογικά, υπάρχουν χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Τα κύτταρα αντιδρούν στο υποξικό μικροπεριβάλλον τους με τη διέγερση των μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία (HIFs). Οι HIFs αποκρίνονται στις αλλαγές του διαθέσιμου οξυγόνου στο κυτταρικό περιβάλλον και, ειδικά, σε καταστάσεις υποξίας και συντονίζουν την ανάπτυξη του αγγειακού, του νευρικού, του πλακουντιακού συστήματος, καθώς και πολλών άλλων οργάνων.

Για την ιστορία, πρώτος ο Joseph Priestley, το 1774, απέδειξε πόσο σημαντικό είναι το μοριακό οξυγόνο για την επιβίωση, όταν τοποθέτησε ένα αναμμένο κερί σε ένα γυάλινο δοχείο παραπλεύρως ενός ποντικιού. Η κατανάλωση οξυγόνου από το κερί είχε εμφανή δηλητηριώδη επίδραση στο ποντικό, υπογραμμίζοντας, έτσι, τον κίνδυνο της έκθεσης σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Ακόμη και η μέτρια υποξία αποσπά άμεσες, παροδικές απαντήσεις, που εκτείνονται από ταχείες αλλαγές στο μεταβολισμό υδατανθράκων των ιστών έως μόνιμες αλλαγές στα τοπικά αγγειακά δίκτυα. Οι περισσότεροι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ζυμών, των ασπόνδυλων και των σπονδυλωτών, απαιτούν O<sub>2</sub> για την επιβίωσή τους. Το O<sub>2</sub> είναι βασικός δέκτης ηλεκτρονίων σε πολλές ενδοκυττάριας βιοχημικές αντιδράσεις και αξιοποιείται από τα μιτοχόνδρια για να παράγουν ATP μέσω αερόβιου μεταβολισμού.

Η σύνδεση της μορφογένεσης των θηλαστικών και των επιπέδων του οξυγόνου, αρχικά, εκτιμήθηκε το 1970, όταν οι Morris και New απέδειξαν ότι η επιτυχής ανάπτυξη της νευρικής πτυχής *ex utero* εμβρύων ποντικών εξαρτιόνταν από τη δημιουργία καλλιεργείων με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου<sup>[1]</sup>. Η γενετική ανάλυση της λειτουργίας των HIFs σε πολλά είδη και πολλαπλές αναπτυξιακές δυσλειτουργίες σε έμβρυα ποντικών με ελλείμματα στα γονίδια του HIF, αποκάλυψαν τη σημαντικότητα του O<sub>2</sub> ως ρυθμιστής-κλειδί στη μορφογένεση του εμβρύου. Επίσης, οι μοριακοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων τα επίπεδα O<sub>2</sub> ρυθμίζουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη, έγιναν προσπάθειες να διερευνηθούν με την κλωνοποίηση και τον καλύτερο χαρακτηρισμό των HIFs<sup>[2,3]</sup>.

Ο HIF είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από μια α και μια β υπομονάδα, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια basic helix–loop–helix (bHLH)/ PER–ARNT–SIM (PAS) των μεταγραφικών παραγόντων. Και οι δυο υπομονάδες του HIF περιέχουν δυο PAS περιοχές, τις PAS-A και PAS-B, οι οποίες έχουν βρεθεί σε πολλά είδη, ακόμη και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και οι οποίες συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ

πρωτεϊνών<sup>[4]</sup>. Οι περιοχές bHLH, που βρίσκονται σε μια πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων είναι υπεύθυνες για το διμερισμό των υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$  και την πρόσδεσή τους στο DNA. Η υποξία επάγει την υπομονάδα  $\alpha$ , ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση της υπομονάδας  $\beta$ .

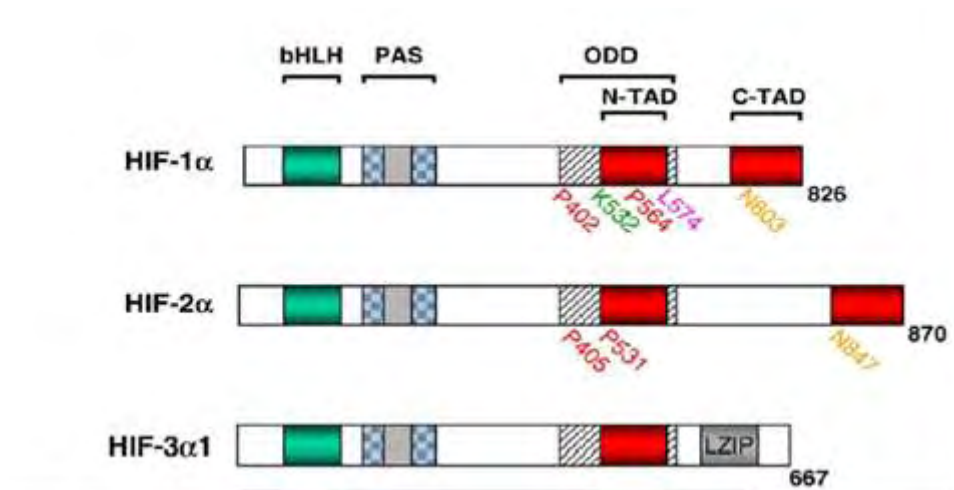
### 1.1 Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )

Η HIF-1 $\alpha$  είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων και με μοριακό βάρος, περίπου, 120kDa. Στο αμινοτελικό της άκρο περιέχει την περιοχή bHLH (αμινοξέα 31-71) και τις περιοχές PAS (αμινοξέα 85-298)<sup>[4]</sup>. Στο καρβοξυλικό της άκρο περιέχει δυο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (transactivation domains, TADs), την N-TAD προς το αμινοτελικό άκρο, η οποία αντιστοιχεί στα αμινοξέα 531-575 και την C-TAD προς το καρβοξυλικό άκρο, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 786-826<sup>[5,6,7]</sup>.

Η υποξία επάγει την έκφραση της HIF-1 $\alpha$ , επειδή εμποδίζει την αποικοδόμησή της. Σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>), ο χρόνος ημιζωής της HIF-1 $\alpha$  είναι, περίπου, 5 λεπτά, ενώ σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας ( $\leq$  6% O<sub>2</sub>). Η αποικοδόμηση της HIF-1 $\alpha$  σε συνθήκες νορμοξίας συμβαίνει μέσω μιας περιοχής αποικοδόμησης εξαρτώμενης από το οξυγόνο ODDD (oxygen dependent degradation domain) (αμινοξέα 401-603). Η περιοχή αυτή περιέχει 2 μοτίβα PEST, δηλαδή αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T), χαρακτηριστικές για πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ημιζωής<sup>[8]</sup>. Τέλος, η HIF-1 $\alpha$  διαθέτει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals, NLS), το N-NLS (αμινοξέα 17-33) και το C-NLS (αμινοξέα 718-721), από τα οποία σημαντικότερο για την είσοδο της HIF-1 $\alpha$  στον πυρήνα φαίνεται να είναι το C-NLS (Εικόνα 1)<sup>[9,10]</sup>.

### 1.2 Hypoxia inducible factor 1 $\beta$ (HIF-1 $\beta$ )

Σε αντίθεση με την HIF-1 $\alpha$ , που απαντάται αποκλειστικά στον HIF-1, η HIF-1 $\beta$ , που είναι γνωστή ως ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), απαντάται και στους HIF-2 και HIF-3. Ο ARNT περιέχει περιοχές bHLH και PAS και εκφράζεται συνεχώς στον πυρήνα. Τα επίπεδά του, σε αντίθεση με την HIF-1 $\alpha$ , δεν επηρεάζονται από την υποξία.



*Εικόνα 1: Απεικόνιση των πρωτεϊνών HIF-α. Οι διαφορετικές ισομορφές της HIF-α φαίνονται με τις χαρακτηριστικές περιοχές τους<sup>[11]</sup>.*

### 1.3 Ισομορφές των HIFα

Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 3 διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες HIFα και ανήκουν στην οικογένεια των bHLH/PAS πρωτεϊνών. Η HIF-2α ή endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) έχει περίπου 50% ομολογία με την HIF-1α, επάγεται από την υποξία και ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το σύμπλοκο HIF-2, το οποίο ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων μέσω πρόσδεσής του σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία<sup>[12,13]</sup>. Η HIF-2α εκφράζεται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, όπως και η HIF-1α. Ωστόσο, η HIF-1α εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και η HIF-2α κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες<sup>[12,13]</sup>.

Η HIF-3α αναγνωρίστηκε από τους Gu et al και ενώ έχει ομοιότητες με την HIF-1α και την HIF-2α ως προς τις περιοχές bHLH (75% και 76% ομολογία αντίστοιχα) και PAS (34% και 36% ομολογία στην PAS-A, 40% και 36% στην PAS-B), δε διαθέτει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD, αλλά μόνο την περιοχή N-TAD. Η HIF-3α ετεροδιμερίζεται με τον ARNT δημιουργώντας το σύμπλοκο HIF-3, αλλά η μεταγραφική ενεργότητά του διαφέρει από αυτή των HIF-1 και HIF-2. Η HIF-3α φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων στόχων που ενεργοποιούνται από την υποξία σε ανθρώπινους νεφρούς, οπότε θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής<sup>[14]</sup>.



Member	Gene	Protein
HIF-1 $\alpha$	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
HIF-1 $\beta$	ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
HIF-2 $\alpha$	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1
HIF-3 $\alpha$	HIF3A	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit

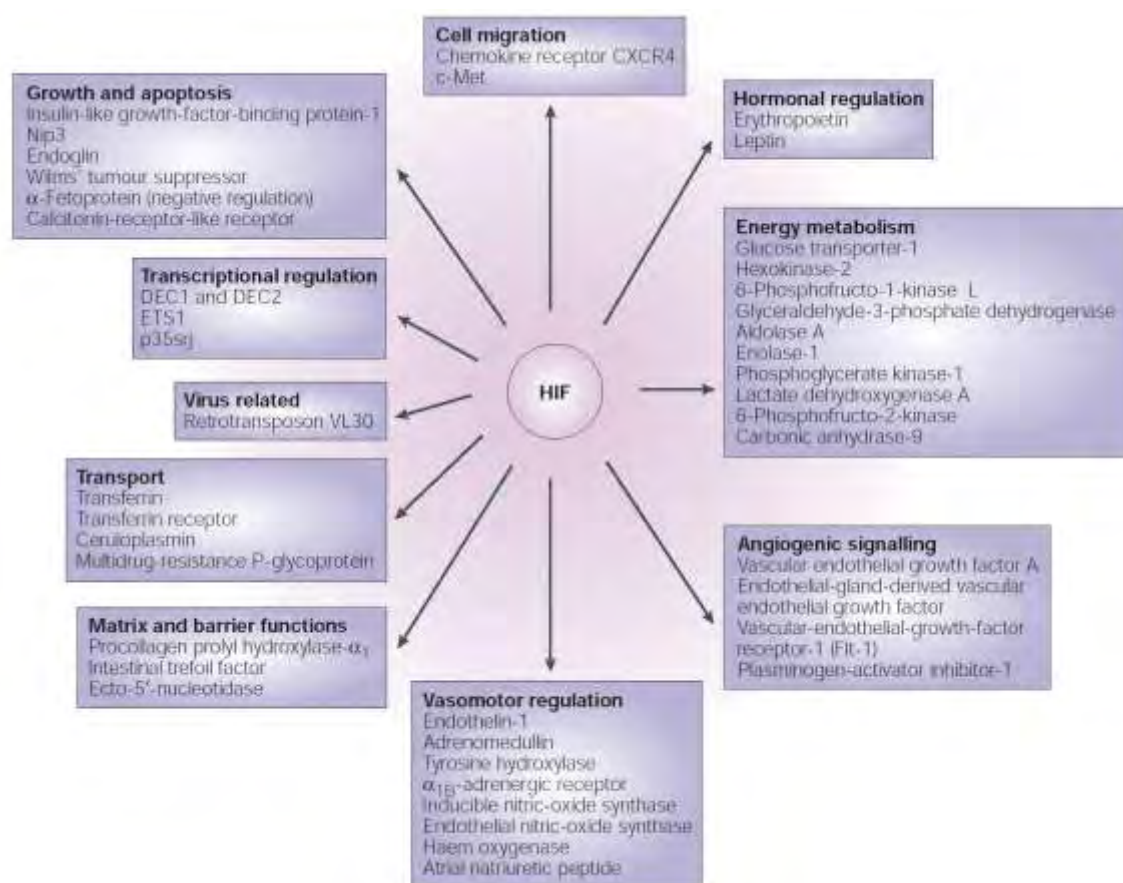
*Πίνακας 1: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται τα μέλη της οικογένειας των HIFs στον άνθρωπο, τα γονίδια από τα οποία προέρχονται και οι πρωτεΐνες που αυτά εκφράζουν <sup>[12,13,14]</sup>.*

Η παρουσία πολλών υπομονάδων της HIF $\alpha$  πιθανόν διασφαλίζει την ενεργοποίηση του HIF ακόμη και αν η HIF-1 $\alpha$  απουσιάζει ή είναι ανενεργή. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας HIF- $\alpha$  να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, πιθανόν σημαντικές στην ιστοειδική απόκριση στην υποξία.

#### 1.4 Γονίδια που ενεργοποιούνται από τους HIFs

Η ανακάλυψη των HIFs ως κύριων ρυθμιστών της ομοιοστασίας του οξυγόνου στους πολυκύτταρους οργανισμούς ήρθε από την ανάλυση του μηχανισμού ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης στην υποξία. Το 1991, οι Semenza et al ανακάλυψαν μια αλληλουχία 50 βάσεων στον ενισχυτή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, που λειτουργεί ως στοιχείο απόκρισης στην υποξία (HRE, Hypoxia Response Element), στην οποία προσδένονται οι HIFs <sup>[15]</sup>. Τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία έχουν την αλληλουχία 5'(A/G)CGTG 3' και, μέχρι σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 70 γονίδια που ενεργοποιούνται από τους HIFs και παίζουν ρόλο στην ερυθροποίηση, την αγγειογένεση, τη μεταφορά γλυκόζης, τη γλυκόλυση, την πρόσληψη του σιδήρου, την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την απόπτωση. Οι αποκρίσεις αυτές είναι απαραίτητες για την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου.

Οι HIFs επάγουν την αγγειογένεση κυρίως μέσω της επαγωγής του γονιδίου του VEGF (vascular endothelial growth factor) με σκοπό την αύξηση των αγγείων και την αποτελεσματικότερη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Επιπλέον, επάγουν την πρόσληψη της γλυκόζης και τη γλυκόλυση μέσω της επαγωγής πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή, με σκοπό την αναερόβια παραγωγή ενέργειας [16,17]. Τέλος, οι HIFs επάγουν διάφορες άλλες διεργασίες, που επηρεάζουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, αλλά και τον κυτταροσκελετό και τον εξωκυττάριο χώρο [10,18]. Πιο ειδικά, στην HIF-1α αποδίδεται η ερυθροποίηση μέσω της επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) και των γονιδίων της τρανσφερίνης, καθώς και του υποδοχέα της τρανσφερίνης, πιθανόν, με σκοπό την αύξηση της μεταφοράς του σιδήρου στα κέντρα ερυθροποίησης, με αποτέλεσμα την αύξηση των ερυθροκυττάρων και της αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 2).



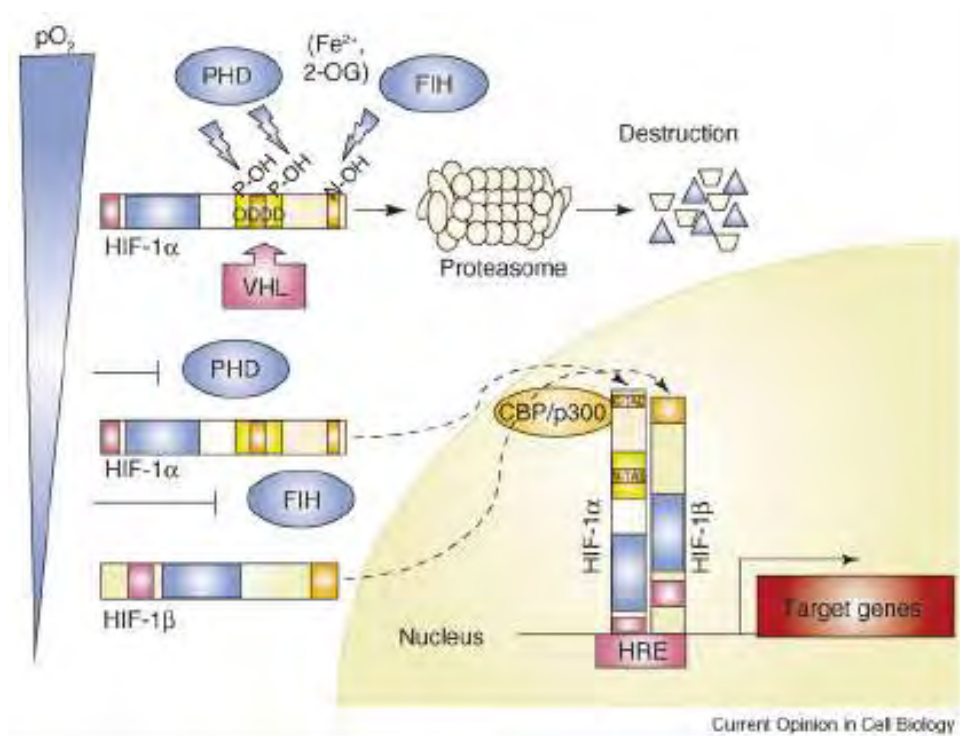
*Εικόνα 2: Γονίδια στόχοι των HIFs (Schofield and Ratcliffe, 2004).*

## 1.5 Ρύθμιση των HIFs

Αρχικές μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων είχαν δείξει ότι, σε συνθήκες νορμοξίας (21% O<sub>2</sub>), η HIFα παράγεται και στη συνέχεια αποικοδομείται, ενώ η υποξία αναστέλλει την αποικοδόμησή της, οδηγώντας σε σταθεροποίηση της πρωτεΐνης <sup>[19,20]</sup>. Με τη χρήση αναστολέων του πρωτεασώματος αποδείχθηκε ότι η HIFα ουβικιτινώνεται και αποικοδομείται στο 26S πρωτεάσωμα <sup>[21]</sup>. Σε επόμενες μελέτες, χαρτογραφήθηκε μια περιοχή περίπου 200 αμινοξέων, που ονομάστηκε περιοχή οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD), η οποία σχετίζεται με αστάθεια της HIFα παρουσία οξυγόνου <sup>[22]</sup>. Οι Maxwell et al έδειξαν ότι σε καρκινικά κύτταρα από ασθενείς με το σύνδρομο Von Hippel-Lindau, τα οποία δεν παράγουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL και χαρακτηρίζονται από έντονη αγγειογένεση, η HIFα δεν αποικοδομείται και σταθεροποιείται ακόμη και σε συνθήκες νορμοξίας <sup>[23]</sup>. Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι η pVHL συνδέεται άμεσα, μέσω της β περιοχής της, με την περιοχή ODD της HIFα και την ουβικιτινώνει <sup>[23,24]</sup>. Η pVHL αποτελεί συστατικό του συμπλόκου μιας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και, έπειτα από την πρόσδεσή του στην HIFα προσδένονται οι πρωτεΐνες ελογκίνη B και C (elongins B and C), η κουλίνη 2 (cullin 2) και η Rbx1 <sup>[25]</sup>. Σ' αυτό το σημείο η ουβικιτινωμένη HIF-1α κατευθύνεται στο πρωτεάσωμα (Εικόνα 3).

Η αλληλεπίδραση της pVHL με την HIFα εξαρτάται από μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση της HIFα, που είναι η υδροξυλίωση δύο προλινών <sup>[26,27]</sup>. Σε συνθήκες υποξίας, η υδροξυλίωση και η σύνδεση του VHL στην HIFα δε γίνονται, οδηγώντας συνεπώς σε σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη ότι η τροποποίηση της HIF-1α εξαρτάται από τον σίδηρο και το οξυγλουταρικό, όπως και στην περίπτωση των υδροξυλασών του προκολλαγόνου, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι προλυλο-υδροξυλάσες της HIF-1α θα ανήκουν στην ίδια οικογένεια ενζύμων. Χρησιμοποιώντας την αλληλουχία του egl-9, αναγνωρίστηκαν 3 ομόλογα γονίδια στα θηλαστικά, που ονομάστηκαν PHDs (Prolyl Hydroxylase Domain-containing proteins) 1,2 και 3 ή HPHs (HIF-1 prolyl hydroxylases) 3, 2, and 1 αντίστοιχα.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τελευταία έχουν ανακαλυφθεί μονοπάτια αποικοδόμησης της HIF-1α ανεξάρτητα του VHL. Η αλληλεπίδραση της μοριακής συνοδού πρωτεΐνης Hsp90 με την HIF-1α αποτελεί ένα διαφορετικό επίπεδο ρύθμισης της HIF-1α, καθώς έχει βρεθεί ότι αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε αποικοδόμηση της HIF-1α σε κύτταρα όπου λείπει ο VHL <sup>[28]</sup>. Επιπλέον, αλληλεπίδραση της HIF-1α με τη λιγάση της ουβικιτίνης του p53, την mdm2, οδηγεί σε αποικοδόμησή της ανεξάρτητα του VHL <sup>[29]</sup>.



*Εικόνα 3: Επίδραση της μερικής πίεσης οξυγόνου ( $pO_2$ ) στη σταθερότητα της HIFα και την ενεργότητα των HIF, PHD και FIH. Σε συνθήκες νορμοξίας, οι PHDs και ο FIH, ανασταλτικός παράγοντας του HIF-1, είναι λειτουργικοί. Αυτές οι  $Fe^{2+}$ -εξαρτώμενες δεοξυγενάσες χρησιμοποιούν οξυγόνο και 2-οξυγλουταρικό (2-OG) για την υδροξυλίωση, αντίστοιχα, δύο καταλοίπων προλίνης στην ODD περιοχή (κίτρινη) και ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στην C-TAD περιοχή (πορτοκαλί), στην α υπομονάδα του HIF-1. Η προλυλο-υδροξυλίωση προάγει τη σύνδεση του συμπλόκου VHL, που κατέχει την ενεργότητα της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και ουβικιτινώνει την HIFα και την καθοδηγεί στην πρωτεασωματική αποικοδόμηση. Η υδροξυλίωση του ασπαραγινικού εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τον συνενεργοποιητή CBP/p300, οδηγώντας σε μεταγραφική αναστολή της υπολειπόμενης σταθερής HIFα. Σε συνθήκες υποξίας, οι πρωτεΐνες-αισθητήρες οξυγόνου PHD και FIH είναι ανενεργές λόγω της έλλειψης διαθέσιμου οξυγόνου. Η α υπομονάδα του HIF είναι σταθερή, ετεροδιμερίζεται με τη β υπομονάδα και δεσμεύεται στο DNA στα HREs (στοιχεία αποκρινόμενα στην υποξία), στον ενισχυτή ή τον υποκινητή των γονιδίων. Σ' αυτό το σημείο ο συνενεργοποιητής CBP/p300 συνδέεται στην C-τελική περιοχή της HIFα και ενεργοποιεί ή καταστέλλει τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων που εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες <sup>[24]</sup>.*

Η σταθεροποίηση της HIF-1α εντοπίζεται και σε μη υποξικές συνθήκες μέσω ενός, έως πρόσφατα, αγνώστου μηχανισμού. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι ο NF κB (nuclear factor κB) είναι ένας άμεσος ρυθμιστής της έκφρασης της HIF-1α παρουσία φυσιολογικής πίεσης οξυγόνου <sup>[30]</sup>.

## 2. Μορφογένεση του εμβρύου

Πιο πάνω περιγράψαμε και αναλύσαμε τους HIFs και τη σχέση τους με το O<sub>2</sub>. Πιο συγκεκριμένα, περιγράψαμε τη δομή, τα γονίδια που ενεργοποιούν, αλλά και τους μηχανισμούς ρύθμισης των HIFs. Στη συνέχεια, θα περιγραφεί η μορφογένεση του εμβρύου, στην οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο οι HIFs, καθώς και τα βασικά στάδιά της.

Οι πιο θεαματικές αλλαγές συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης του εμβρύου, στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, όπου το αναπτυσσόμενο έμβρυο αποκτά τα κύρια όργανά του. Η διαδικασία της έντονης κινητικότητας και μετατόπισης κυττάρων, καθώς και κυτταρικών στρωμάτων, που προκαλεί μεταβολές στην εξωτερική όψη και τη δομική οργάνωση του εμβρύου, με αποτέλεσμα τον τελικό σχηματισμό του οργανισμού, είναι η μορφογένεση <sup>[31]</sup>.

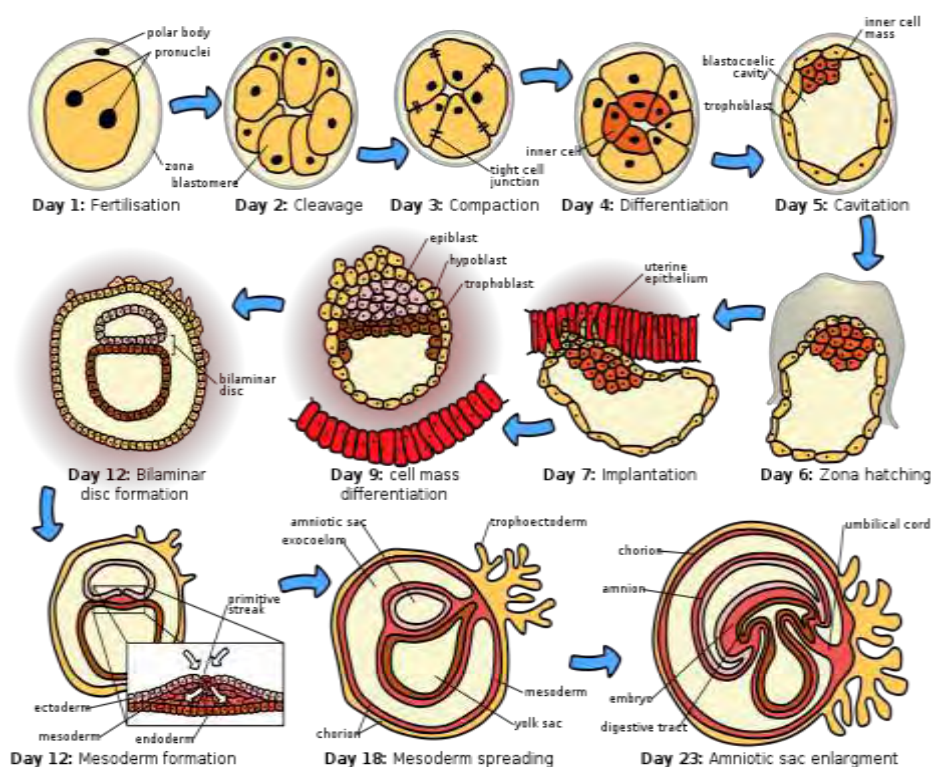
Η διαδικασία αυτή της μορφογένεσης περιλαμβάνει τα στάδια της αυλάκωσης, της γαστριδίωσης, της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων στη βλαστοκύστη, αλλά και τις ανακατατάξεις αυτών, καθώς και την οργανογένεση <sup>[32]</sup>.

### 2.1 Αυλάκωση

Πριν ξεκινήσει το στάδιο της αυλάκωσης, διακόπτεται η αναστολή της μείωσης, δηλαδή ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αποικοδόμησης του παράγοντα CSF και των κυκλινών και ακολουθεί η επανέναρξη του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια, το γονιμοποιημένο ωάριο προετοιμάζεται για την αυλάκωση (2<sup>η</sup> ημέρα) και αρχίζει να διαιρείται σε πολλά επιμέρους κύτταρα. Μετά το στάδιο των οκτώ κυττάρων, το έμβρυο υποβάλλεται στη διαδικασία της σύμπληξης (3<sup>η</sup> ημέρα), όπου τα κύτταρα συνδέονται στενά το ένα με το άλλο, σχηματίζοντας μια συμπαγή σφαίρα <sup>[31]</sup>.

Μετά τη σύμπληξη, το έμβρυο προχωρά στο στάδιο του μοριδίου. Το μορίδιο αποτελείται από ένα μικρό αριθμό εσωτερικών κυττάρων που περιβάλλονται από πολλά εξωτερικά κύτταρα, τα περισσότερα από τα οποία θα σχηματίζουν την τροφοβλάστη (4<sup>η</sup> ημέρα). Η τροφοβλάστη σχηματίζει το χόριο και το εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα. Τα εσωτερικά κύτταρα και κάποια από τα εξωτερικά κύτταρα του μοριδίου σχηματίζουν την εσωτερική κυτταρική μάζα, από την οποία θα προέλθουν ο λεκιθικός σάκος, η αλλαντοΐδα και το άμνιο (18<sup>η</sup> ημέρα) <sup>[31]</sup> (Εικόνα 4).

Η εσωτερική κυτταρική μάζα εκκρίνει μια σειρά αυξητικών παραγόντων, όπως ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 4 (FGF4), που ενισχύει τη διαίρεση της τροφοβλάστης. Η ίδια η τροφοβλάστη συνθέτει τον μεταγραφικό παράγοντα Eomesodermin που συμβάλλει στη διατήρηση του τροφοβλαστικού στρώματος. Επιπρόσθετα, η έσω κυτταρική μάζα διατηρεί την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Oct4 και Foxd3 που ευθύνονται για τη διατήρηση πολυδύναμων κυττάρων, δηλαδή κυττάρων που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους [31].



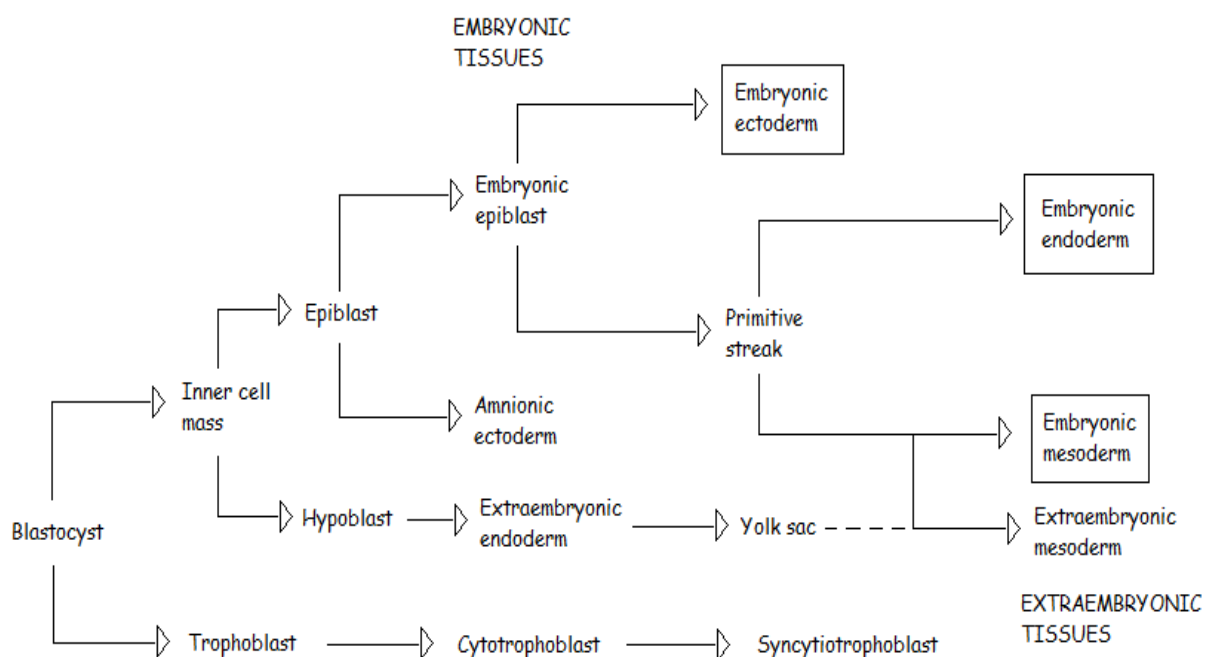
*Εικόνα 4: Τα αρχικά στάδια της μορφογένεσης του ανθρώπου [33].*

## 2.2 Διαφοροποίηση και ανακατατάξεις βλαστικών κυττάρων κατά τη βλαστοκύστη και τη γαστρίδωση

Η βλαστοκύστη αποτελείται από την εσωτερική κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη, την τροφοβλάστη και τη βλαστοκοίλη. Η τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε δύο στρώματα, την κυτοτροφοβλάστη και τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Η κυτοτροφοβλάστη είναι το εσωτερικό στρώμα και αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα. Το εξωτερικό στρώμα είναι η συγκυτιοτροφοβλάστη, η οποία βοηθά ολόκληρη τη βλαστοκύστη να εμφυτευτεί στο

εσωτερικό επιθήλιο του ενδομητρίου μέσω των χοριακών λαχνών. Η συγκυτιοτροφοβλάστη, επίσης, παράγει ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), μια ορμόνη που είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της λειτουργίας του ωχρού σωματίου. Οι λάχνες διακλαδίζονται και περιέχουν αιμοφόρα αγγεία του εμβρύου που επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων μεταξύ αυτού και της μητέρας <sup>[31]</sup>.

Ενώ η συγκυτιοτροφοβλάστη αρχίζει να διεισδύει στο τοίχωμα της μήτρας, αναπτύσσεται και η εσωτερική κυτταρική μάζα. Από την εμβρυοβλάστη θα προκύψουν δύο στρώματα, η επιβλάστη και η υποβλάστη (9η ημέρα). Η επιβλάστη είναι παρακαείμενη της τροφοβλάστης και αποτελείται από κυλινδροειδή κύτταρα, ενώ η υποβλάστη είναι πιο κοντά στην κοιλότητα της βλαστοκύστης και αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα (Εικόνα 4). Η επιβλάστη, που ονομάζεται και πρωτογενές εξώδερμα θα εκτελέσει τη γαστριδίωση, περίπου κατά την 16η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Με αυτή τη διαδικασία δημιουργούνται οι τρεις βλαστικές στιβάδες του εμβρύου: το εξώδερμα, το μεσοδερμα και το ενδόδερμα. Η υποβλάστη ή πρωτογενές ενδόδερμα, θα οδηγήσει σε εξωεμβρυϊκές δομές, όπως ο πρωτογενές λεκιθικός σάκος (Εικόνα 5) <sup>[31]</sup>.



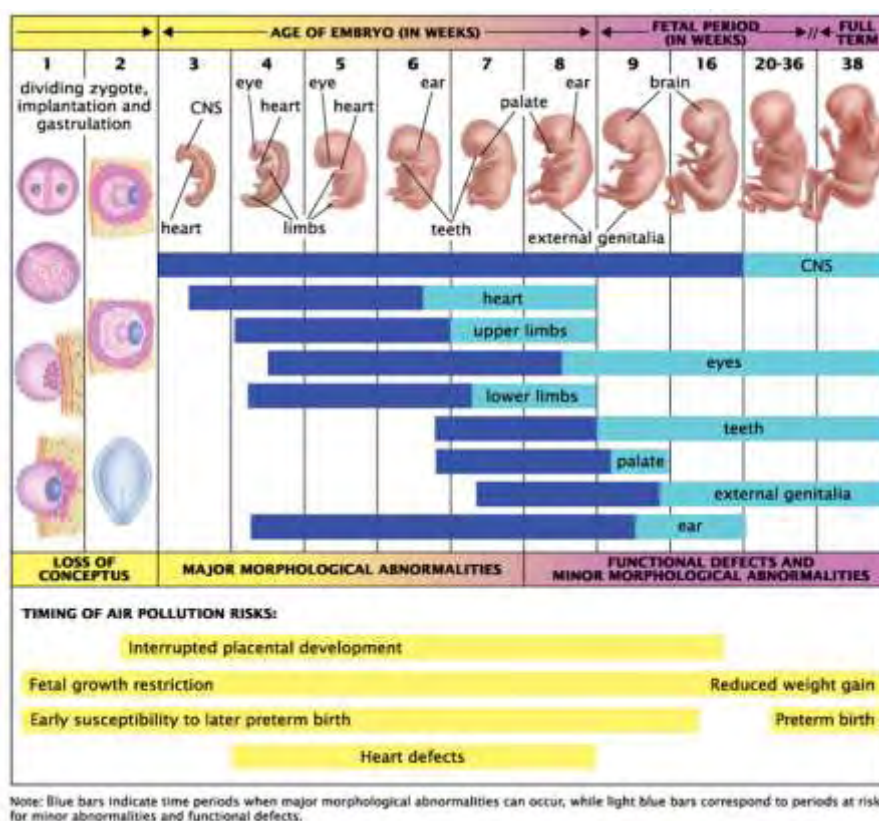
*Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα που παρουσιάζει την προέλευση των ανθρώπινων ιστών. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει μια πιθανή διπλή προέλευση του εξωεμβρυϊκού μεσοδέρματος <sup>[31]</sup>.*



## 2.3 Οργανογένεση

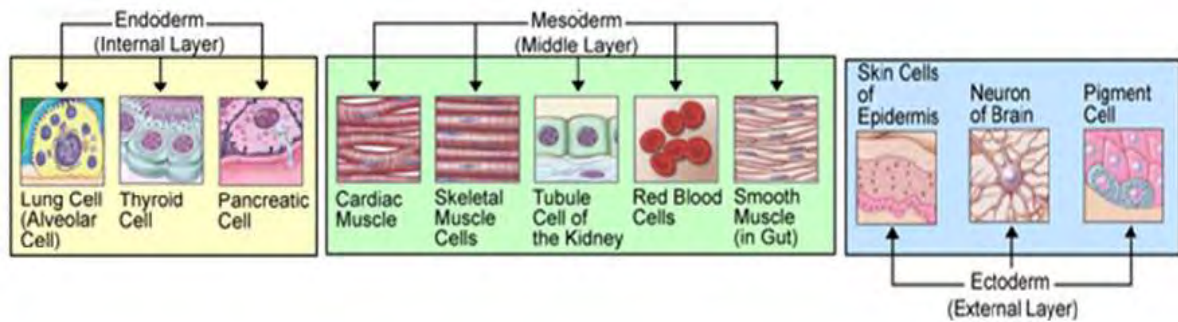
Η διαδικασία μέσω της οποίας το ενδόδερμα, το εξώδερμα και το μεσόδερμα αναπτύσσουν τα εσωτερικά όργανα του οργανισμού είναι η οργανογένεση. Η ανάπτυξη των εσωτερικών οργάνων στον άνθρωπο συμβαίνει μεταξύ 3ης και 8ης εβδομάδας της κύησης. Οι τρεις βλαστικές στιβάδες, στην οργανογένεση, διαφοροποιούνται μέσω αναδιπλώσεων, διασπάσεων και συμπύκνωσης <sup>[34]</sup>.

Πιο συγκεκριμένα, από το ενδόδερμα προκύπτουν οι πνεύμονες, ο θυροειδής αδένας και το πάγκρεας. Το μεσόδερμα είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του άξονα του εμβρύου, των οστών, την παραγωγή του καρδιακού, των σκελετικών και λείων μυών, καθώς και το σχηματισμό των νεφρών και των ερυθροκυττάρων. Από το εξώδερμα προκύπτει η επιδερμίδα, τα μελανοκύτταρα και το νευρικό σύστημα (Εικόνα 7) <sup>[34]</sup>.



*Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των ευαίσθητων ή κρίσιμων περιόδων της εμβρυϊκής ανάπτυξης του ανθρώπου. Το σκούρο μπλε χρώμα δείχνει τις περιόδους αυξημένης ευαισθησίας, ενώ το ανοικτό μπλε υποδεικνύει τα στάδια τα οποία είναι λιγότερο ευαίσθητα σε τερατογόνα (W.B. Saunders Co., 1973).*





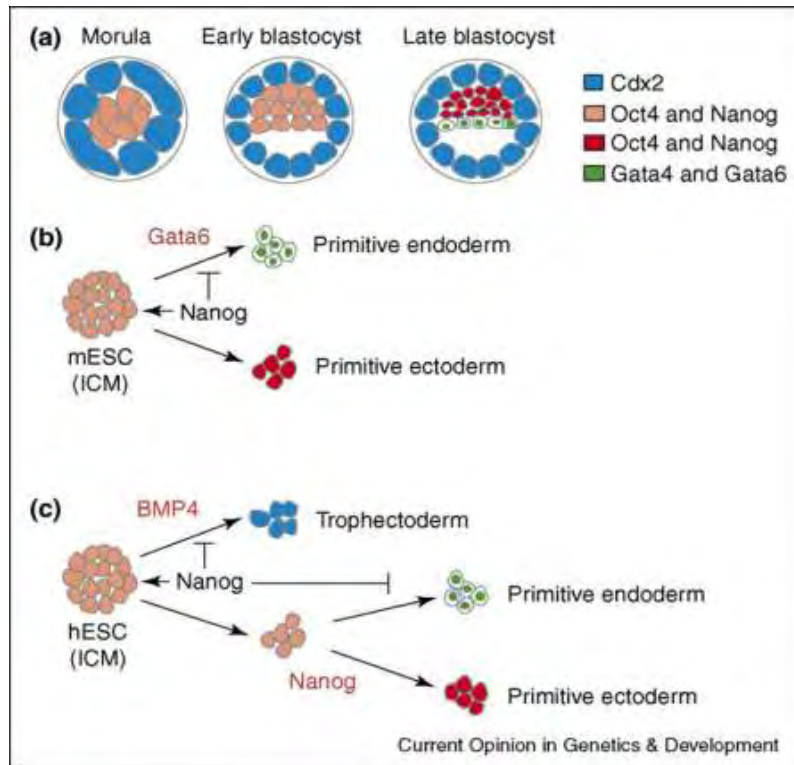
Εικόνα 7: Οι τρεις βλαστικές στοιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) και οι ιστοί που προκύπτουν από αυτές <sup>[35]</sup>.

## 2.4 Μοριακοί μηχανισμοί κατεύθυνσης της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων

### 2.4.1 Ανάπτυξη της βλαστοκύστης

Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης στα έμβρυα των θηλαστικών συμβαίνει στο τελικό στάδιο του μοριδίου, δηλαδή όταν έχει σχηματιστεί το τροφεκτόδερμα <sup>[36]</sup>. Συγκεκριμένα, επάγεται η έκφραση δεικτών του πρώιμου τροφεκτοδέρματος, όπως ο Cdx2 (caudal-related homeobox 2) <sup>[37]</sup>, στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα κατά την αυθόρμητη διαφοροποίηση, τόσο in vivo όσο και in vitro, στα εμβρυοειδή σώματα και στην παρουσία της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών 4 (BMP4) <sup>[38,39,40]</sup>. Μία αμοιβαία αναστολή μεταξύ του Oct4 και του Cdx2 πιθανόν να ενισχύει, επίσης, το διαχωρισμό του τροφεκτοδέρματος και της εσωτερικής κυτταρικής μάζας.

Το δεύτερο γεγονός διαφοροποίησης στα θηλαστικά συμβαίνει στη βλαστοκύστη, όταν η εσωτερική κυτταρική μάζα διαφοροποιείται στην επιβλάστη και στο πρωτογενές ενδόδερμα <sup>[40]</sup>. Πρόσφατες μελέτες σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικού υποστηρίζουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog δρα ως «γονίδιο επιλογής» της επιβλάστης <sup>[41,42,43]</sup>. Ο Nanog, όταν υπερεκφράζεται, δείχνει να συμπεριφέρεται και ως ενεργοποιητής και ως καταστολέας της μεταγραφής. Ως ενεργοποιητής επάγει την έκφραση των δεικτών του πρωτογενούς εξωδέρματος, όπως ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 5 (Fgf5) και, ως καταστολέας, ρυθμίζει αρνητικά τους δείκτες του πρωτογενούς ενδοδέρματος Gata4 και Gata6, καθώς και της εσωτερικής κυτταρικής μάζας Rex1 και Gbx2 <sup>[43]</sup>. Επιπλέον, η αρνητική ρύθμιση του Nanog στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα οδηγεί σε αύξηση των δεικτών του τροφεκτοδέρματος (Εικόνα 8) <sup>[42]</sup>.



*Εικόνα 8: Ανάπτυξη της βλαστοκύστης. (a) Γονίδια που εκφράζονται κατά το σχηματισμό της βλαστοκύστης. (b) Αναπτυξιακά δυναμικά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του ποντικού in vitro. Ο Nanog αναστέλλει τη διαφοροποίηση σε πρωτογενές ενδόδερμα, ενώ ο Gata6 την επάγει. (c) Αναπτυξιακά δυναμικά των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων in vitro. Ο BMP4 προάγει τη διαφοροποίηση του τροφεκτοδέρματος, ενώ ο Nanog αναστέλλει τη διαφοροποίηση σε τροφεκτόδερμα και πρωτογενές ενδόδερμα και επάγει το πρωτογενές εκτόδερμα (F.M Spagnoli and A. Hemmati-Brivanlou, 2006).*

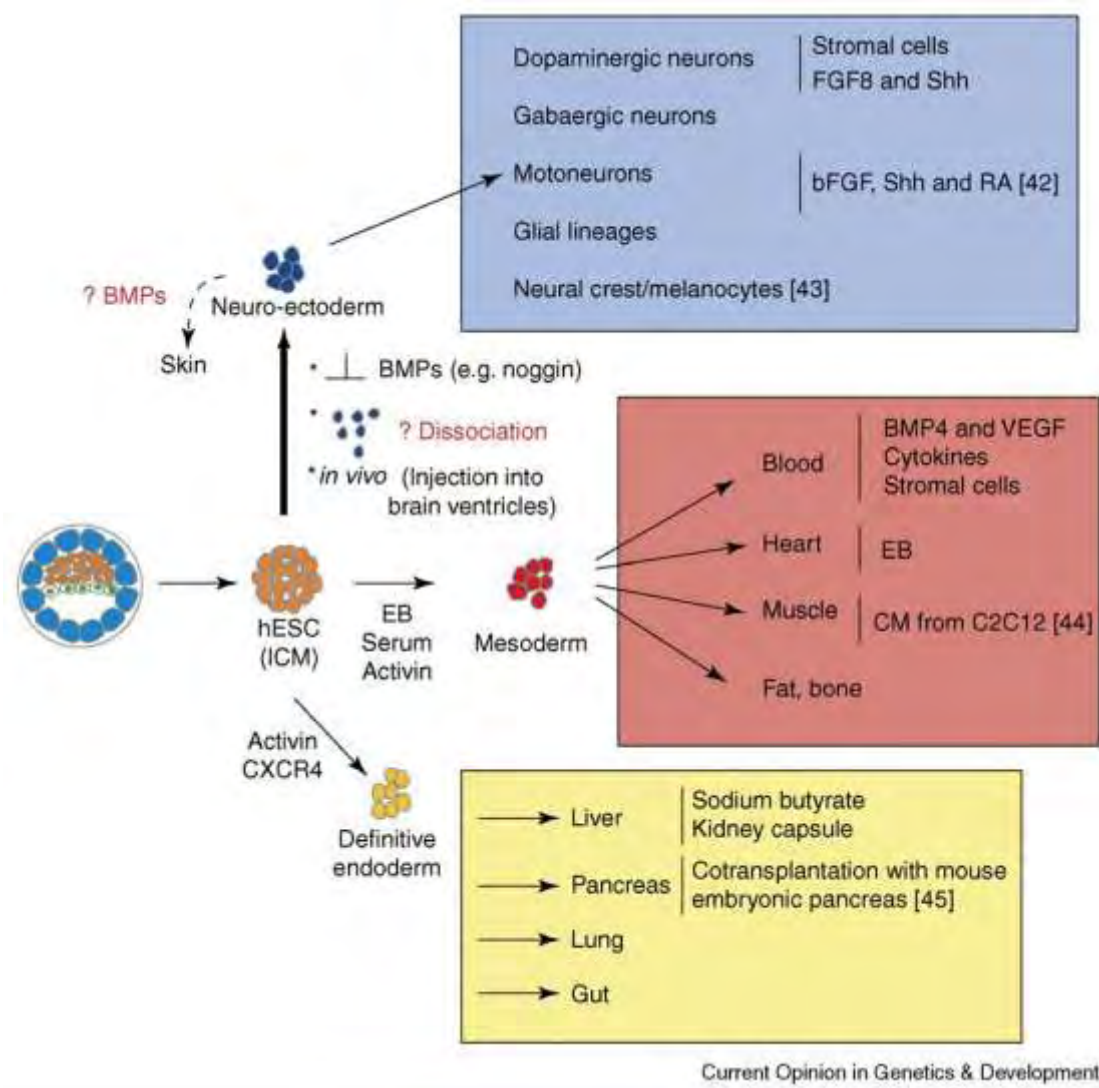
## 2.4.2 Εξειδίκευση των πρωτογενών γεννητικών στρωμάτων και τα παράγωγα τους

Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης στο έμβρυο, τα πλειοτροπικά κύτταρα της επιβλάστης διαχωρίζονται στα πρωτογενή γεννητικά στρώματα (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα) <sup>[44]</sup>. Τα πρωτογενή στρώματα είναι οι πρόγονοι όλων των ιστών τους σώματος, με εξαίρεση τα γεννητικά κύτταρα. Τα γεννητικά κύτταρα προέρχονται από έναν πληθυσμό κυττάρων της επιβλάστης, που βρίσκεται δίπλα στο εξωεμβρυϊκό εξώδερμα, και από αυτά προκύπτουν τα ώριμα ωάρια και σπερματοζώαρια των ενηλίκων <sup>[45]</sup>.

### 2.4.2.1 Εξώδερμα

Οι μοριακοί μηχανισμοί διαφοροποίησης του νευρικού συστήματος στο εξώδερμα περιγράφονται από τις παρακάτω μελέτες.

Μελέτες σε ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα έδειξαν ότι εκφράζουν τους νευροεξωδερμικούς δείκτες Pax και Nestin, όταν καλλιεργούνται σε χημικά καθορισμένο μέσο και, επιπλέον, όταν έρθουν σε επαφή με τον Noggin, ο οποίος είναι ανταγωνιστής των BMPs [46,47].



*Εικόνα 9: Εξειδίκευση των πρωτογενών γεννητικών στρωμάτων και τα παράγωγα τους. Το παχύ βέλος δείχνει την τύχη των νευρώνων, ως η «προτιμότερη» τύχη των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, απουσία της επαγωγικής διέγερσης. Τα ερωτηματικά δηλώνουν ότι υπάρχουν θέματα στο “Default model” που πρέπει να απευθύνονται ευθέως στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Στο μπλε κουτί παρουσιάζονται τα παράγωγα του νευροεξωδερμικού γεννητικού στρώματος και πρωτόκολλα διαφοροποίησης. Στο κόκκινο κουτί παρουσιάζονται τα παράγωγα του μεσοδερμικού γεννητικού στρώματος και πρωτόκολλα διαφοροποίησης και, στο κίτρινο κουτί, τα παράγωγα του ενδοδερμικού στρώματος και πρωτόκολλα διαφοροποίησης (F.M Spagnoli and A. Hemmati-Brivanlou, 2006).*

Επιπλέον, δύο *in vivo* μελέτες απέδειξαν ότι τα πλειοτροπικά ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες. Όταν πλειοτροπικά ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα εμβολιάστηκαν ευθέως σε έμβρυα ποντικών, πλευρικά της κοιλιάς, απάντησαν κατάλληλα στο νευρογενές περιβάλλον του ξενιστή και δύο μήνες μετά την εμφύτευση ενσωματώθηκαν σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου του δέκτη και, στη συνέχεια, διαφοροποιήθηκαν κατά μήκος των νευρικών και νευρογλοιακών σειρών. Έπειτα αποδείχτηκε ότι οι νευρώνες που προήλθαν από τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ήταν λειτουργικοί<sup>[48]</sup>.

Όμοια στην άλλη μελέτη, ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, που είχαν διαφοροποιηθεί σε πρόδρομους νευρώνες σε καλλιέργεια, εμφυτεύτηκαν σε φυσιολογικούς και επιβλαβείς εγκεφάλους ενήλικων ποντικών. Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, που παρήγαγαν πρόδρομα νευρώνων, ολοκληρώθηκαν στον εγκέφαλο του ξενιστή και διαφοροποιήθηκαν σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα<sup>[49]</sup>. Και στις δύο μελέτες δεν υπάρχει στοιχείο για σύντηξη κυττάρων, προτείνοντας ότι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να απαντούν κατάλληλα στις απαιτήσεις του ξενιστή. Αυτό υποδηλώνει συντήρηση των σημάτων διαφοροποίησης των νευρώνων από τα τρωκτικά στους ανθρώπους<sup>[50]</sup>.

#### 2.4.2.2 Μεσόδερμα

Πολλές μελέτες ασχολήθηκαν με τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε αιματοποιητικά κύτταρα<sup>[51]</sup>. Εκτός των BMP4 και VEGF, ένα μίγμα κυτοκινών στα εμβρυοειδή σώματα, που σχηματίστηκαν από ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, προκάλεσαν την τελική διαφοροποίηση των ερυθροειδών και μυελοειδών προγόνων<sup>[52]</sup>. Σε εκτενή καλλιέργεια κυττάρων του στρώματος, τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είχαν το δυναμικό να αναπτύξουν σειρές λεμφοκυττάρων<sup>[53]</sup>. Παρ' όλα αυτά, αυτός ο αιματοποιητικός ιστός είχε περιορισμένη ικανότητα στο να εμφυτεύεται σε ζώα-μοντέλα που εμβολιαζόταν, προτείνοντας ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που παράγουν αιματοποιητικά κύτταρα δεν είναι, ακριβώς, ανάλογα των «πραγματικών» μακράς διάρκειας αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων<sup>[54]</sup>.

Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν τον Nodal, έναν TGFβ προσδέτη που μοιράζεται το ίδιο ενδοκυττάριο μονοπάτι με την ακτιβίνη, αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν σε μεσόδερμα ή τελικό ενδόδερμα, είτε σε μονοστοιβιακή είτε σε

καλλιέργεια εμβρυοειδών σωμάτων <sup>[46]</sup>. Επίσης, κάτω από ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη των αδιαφοροποίητων ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, οι TGFβ προσδέτες προάγουν τη διατήρηση της πλειοτροπικότητας <sup>[55]</sup>. Οι λειτουργίες άλλων σηματοδοτικών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του μεσοδέρματος, όπως οι Wnt και FGF <sup>[44]</sup>, δεν έχουν ακόμη μελετηθεί στον άνθρωπο.

### 2.4.2.3 Ενδόδερμα

Ως γενικός κανόνας ισχύει ότι κάθε προσπάθεια να παραχθούν τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα πρέπει να συνυπολογίζει και την περιοχή όπου βρίσκεται ο επιθυμητός κυτταρικός τύπος στο έμβρυο. Αυτό είναι πιο σημαντικό όσον αφορά τα ενδοδερμικά παράγωγα, όπως οι πνεύμονες, το ήπαρ και το πάγκρεας. Συγκεκριμένα, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα όταν καλλιεργούνται παράγουν εύκολα ένα σπλαχνικό ενδόδερμα, που είναι ένας εξωεμβρυϊκός κυτταρικός πληθυσμός <sup>[36,56]</sup>. Παρ' όλο που το σπλαχνικό και το τελικό ενδόδερμα έχουν διαφορετικές περιοχές και κατάληξη, μοιράζονται όμοιους μοριακούς μηχανισμούς. Έτσι είναι σχεδόν αδύνατη η διάκρισή τους σε καλλιέργεια, διότι κανένας μοριακός δείκτης, που να είναι μοναδικός για έναν από τους δύο πληθυσμούς, δεν είναι γνωστός <sup>[44,57,58]</sup>. Κάποιες μελέτες ασχολήθηκαν με τη διελεύκανση αυτού του θέματος σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού <sup>[57,58,59]</sup>.

Πρόσφατα αναφέρθηκε η παραγωγή τελικού ενδοδέρματος από γενετικά μη τροποποιημένα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, με τη χρήση συγκεκριμένων συνθηκών καλλιέργειας και δεικτών <sup>[57]</sup>. Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που παράγουν τελικό ενδόδερμα, επιλέχθηκαν από τα υπόλοιπα χρησιμοποιώντας τον υποδοχέα CXCR4 της κυτταρικής επιφάνειας. Αυτός ο δείκτης επιλέχθηκε με βάση εμβρυολογικά στοιχεία του ποντικού και εκφράζεται στο τελικό ενδόδερμα και μεσόδερμα, αλλά όχι στο σπλαχνικό ενδόδερμα <sup>[58]</sup>.

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και του ποντικού, που παράγουν το τελικό ενδόδερμα, μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε ηπατοκύτταρα και να εκφράσουν κάποιους εντερικούς δείκτες <sup>[57,58]</sup>, αλλά η διαφοροποίηση σε παγκρεατική σειρά δεν παρατηρείται ποτέ. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες καλλιέργειας, που πρέπει να επανακαθοριστούν. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να υποδεικνύουν το πιο ασφαλές μονοπάτι για τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε ηπατικά και κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη <sup>[50]</sup>

### 3. O<sub>2</sub>, HIFs και μορφογένεση

Τα κύτταρα του εμβρύου αντιδρούν στην υποξία με τη διέγερση των HIFs, με αποτέλεσμα να συντονίζουν την ανάπτυξη συστημάτων, όπως η διακλάδωση της τραχείας, η μορφογένεση των αγγείων, η καρδιαγγειακή και πνευμονική ανάπτυξη, καθώς και τη διαφοροποίησή τους.

#### 3.1 Ανάπτυξη συστημάτων

Η ανάπτυξη των συστημάτων διανομής οξυγόνου εξαρτάται άμεσα από τις λεπτές διαφορές των επιπέδων του O<sub>2</sub> στους ιστούς και διασφαλίζει ότι τα κύτταρα διατηρούν κατάλληλη μεταβολική δραστηριότητα <sup>[60]</sup>.

##### 3.1.1 Η διακλάδωση στην τραχειακή ανάπτυξη

Το τραχειακό σύστημα της *D. melanogaster* αποτελείται από ένα σωληνώδες επιθηλιακό δίκτυο, που διανέμει το O<sub>2</sub> στους εσωτερικούς ιστούς και αναπτύσσει τις διακλαδώσεις, από τον επιθηλιακό θύλακα, στην προνύμφη <sup>[61]</sup>. Η κύρια τραχειακή διακλάδωση είναι απλή, στερεότυπη και ελέγχεται από προκαθορισμένα αναπτυξιακά σήματα που περιλαμβάνουν το Branchless (ομόλογο του ανθρώπινου FGF), το Breathless (ομόλογο του υποδοχέα του FGF) και το Pointed (ένας ETS μεταγραφικός παράγοντας). Οι τερματικές-ακραίες διακλαδώσεις ποικίλουν και είναι πιο περίπλοκες <sup>[62]</sup>. Ο Krasnow έδειξε ότι η ακραία τραχειακή διακλάδωση ρυθμίζεται από ένα τοπικό σήμα που προέρχεται από κύτταρα που στερούνται O<sub>2</sub> <sup>[63]</sup>. Αυτό το σήμα είναι το Branchless. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη του O<sub>2</sub> διεγείρει τα κύτταρα της προνύμφης να εκκρίνουν το Branchless, το οποίο δρα χημειοτακτικά και οδηγεί τις νέες ακραίες διακλαδώσεις στα κύτταρα που εκφράζουν το Branchless (Εικόνα 10A). Έτσι, περιβαλλοντικά σήματα, όπως η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub>, ελέγχουν την έκφραση του Branchless και την ιδιότητά του να προάγει ένα βέλτιστο τραχειακό δίκτυο, που διανέμει αποτελεσματικά O<sub>2</sub> στον οργανισμό. Η γενετική αυτή ρύθμιση των αποκρίσεων έχει διατηρηθεί και στα θηλαστικά.

### 3.1.2 Μορφογένεση του αγγειακού συστήματος

Κατά τη διάρκεια της αγγειακής ανάπτυξης στα θηλαστικά (Εικόνα 10B), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι ο κύριος αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας που παράγεται από κύτταρα που στερούνται  $O_2$  [64,65]. Όπως ο FGF, έτσι και ο VEGF, χρησιμοποιείται επανειλημμένα κατά τη διάρκεια της αγγειακής μορφογένεσης των σπονδυλωτών, που περιλαμβάνει την αγγειογένεση νέων αγγείων από ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και την αναδιαμόρφωση ήδη υπαρχόντων αγγείων [66,67]. Ο VEGF, ο FGF2 και πολλοί άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο TGF- $\beta$  και η αγγειοποιητίνη 1 και 2, είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του HIF [68,69,70].

Πριν την ανάπτυξη του κυκλοφορικού συστήματος, η ανάπτυξη των θηλαστικών συμβαίνει σε ένα σχετικά φτωχό σε  $O_2$  περιβάλλον (3%  $O_2$ ) [71,72]. Θα ήταν λογικό, το μοντέλο της αγγειακής ανάπτυξης να συντονίζεται από ένα τοπικό υποξικό μικροπεριβάλλον, που συναντάται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της οργανογένεσης, κατά τις οποίες τα υπάρχοντα αγγεία θα αναπτύσσονταν σε περιοχές που περιέχουν κύτταρα που στερούνται  $O_2$ . Αυτή η υπόθεση ελέγχθηκε παράγοντας διαγονιδιακούς ποντικούς με απαλοιφή του γονιδίου της HIF-1 $\beta$ . Αυτοί οι ποντικοί εμφάνιζαν θνησιμότητα από την εμβρυϊκή ημέρα (E) 10.5, εξαιτίας των αγγειακών ελαττωμάτων στο λεκιθικό σάκο, το κρανίο, τους σωμίτες και τον πλακούντα [73,74]. Όπως συμβαίνει στη μορφογένεση της τραχείας, η ανάπτυξη εκ νέου των αγγειακών βάσεων δεν υπάρχει σε  $Arnt^{-/-}$  έμβρυα, αλλά η αγγειακή αναδιαμόρφωση είναι δυνατή. Επιπλέον, τα  $Arnt^{-/-}$  έμβρυα έχουν μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών VEGF, με αποτέλεσμα η έκκριση του VEGF να ρυθμίζεται από φυσικό μικροπεριβάλλον χαμηλού  $O_2$  στο πρώιμο έμβρυο [73,74,75]. Συνεπώς, με αυτά τα αποτελέσματα, οι Iyer et al απέδειξαν ότι η HIF-1 $\alpha$  μπορεί να ανιχνευτεί σε έμβρυα ποντικών E8-E18. Οι ποντικοί με απαλοιφή της HIF-1 $\alpha$  έδειξαν όμοιο φαινότυπο με τους  $Arnt^{-/-}$  ποντικούς [76,77].

Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μοιράζονται μία χωρική και λειτουργική σχέση με τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs). Ανάλυση σε  $Arnt^{-/-}$  έμβρυα αποκάλυψε μειωμένο αριθμό προγεννητικών αιμοποιητικών κυττάρων στο λεκιθικό σάκο [78]. Ο αρχικός αριθμός των αιμοποιητικών κυττάρων είναι μειωμένος στο έμβρυο στην επικράτεια αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος (AGM επικράτεια). Μερικά από τα αγγειακά ελαττώματα στην AGM επικράτεια, πιθανόν, συμβαίνουν λόγω της μείωσης των HSCs στα  $Arnt^{-/-}$  έμβρυα [74]. Έτσι, ο αιμοποιητικός φαινότυπος του λεκιθικού σάκου και οι αιμοποιητικές/αγγειακές ανωμαλίες, που σχετίζονται με την AGM επικράτεια, αποδίδονται στον ελλειμματικό VEGF [74,78], ο οποίος ρυθμίζεται από το υποξικό εμβρυϊκό μικροπεριβάλλον.

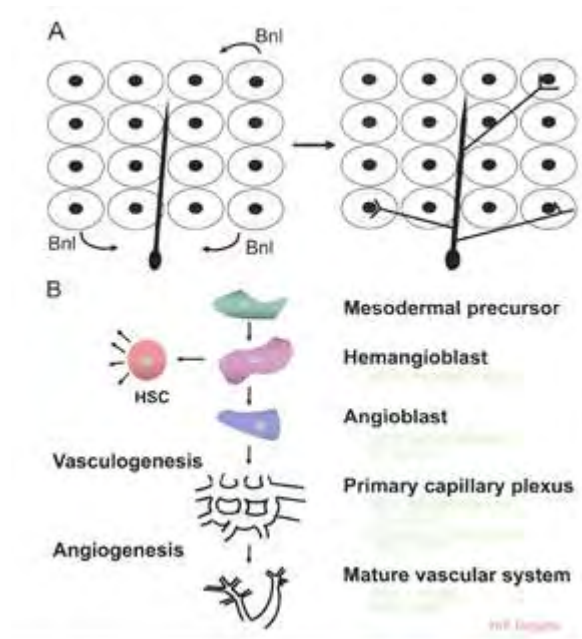
### 3.1.3 Η πλακουντοποίηση

Η βιβλιογραφία <sup>[79-82]</sup> περιγράφει ότι η ανάπτυξη του πλακούντα είναι άμεσα εξαρτώμενη από την πίεση του O<sub>2</sub> και τον HIF. Πιο συγκεκριμένα, πριν την E9.5, το έμβρυο του ποντικού καλύπτει τις μεταβολικές του απαιτήσεις σε ATP μέσω της γλυκόλυσης. Η ολοκλήρωση της πλακουντιακής κυκλοφορίας την E10.5-E11.5 επιτρέπει τη διανομή O<sub>2</sub> και θρεπτικών συστατικών στο ταχέως αναπτυσσόμενο έμβρυο. Σε ποντικούς στους οποίους τα Arnt, Vhl (το γονίδιο που κωδικοποιεί την von Hippel-Lindau, μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αγγειογένεση και λειτουργεί ως αισθητήριο του O<sub>2</sub>), Phd2, ή ένας συνδυασμός των Hif-1α και Hif-2α έχουν απαλειφεί, επιδεικνύουν ανώμαλη πλακουντιακή αρχιτεκτονική λόγω της μείωσης των λαβυρινθωδών στρωμάτων και των αισθητά λιγότερων εμβρυϊκών αιμοφόρων αγγείων. Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν, επίσης, την υπόθεση ότι περισσότερα από ένα βήματα της πλακουντοποίησης ρυθμίζονται από τα επίπεδα του O<sub>2</sub> και τους HIFs.

### 3.1.4 Η καρδιαγγειακή και πνευμονική ανάπτυξη

Η καρδιαγγειακή και πνευμονική ανάπτυξη έχουν μελετηθεί καλύτερα ως αναφορά της σχέσης τους με τους HIFs. Οι στοχευμένες μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την HIF-1α ή HIF-1β έχουν ως αποτέλεσμα την πρόωμη (E9.5-E10.5) εμβρυϊκή θνησιμότητα, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με την HIF-2α. Όπως αναφέραμε παραπάνω, η απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για την HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα την πρόωμη εμβρυϊκή θνησιμότητα λόγω αγγειακών ελαττωμάτων στο λεκιθικό σάκο, το κρανίο, τους σωμίτες και τον πλακούντα <sup>[73,74]</sup>, ενώ με απαλοιφή του γονιδίου της HIF-2α επιβιώνουν μέχρι το τέλος της κυοφορίας ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, ως τη γέννηση. Η απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για την HIF-2α στους ποντικούς έχει ως αποτέλεσμα έναν ή περισσότερους, από τους διάφορους καρδιαγγειακούς και πνευμονικούς φαινότυπους, που δεν είναι ίδιοι με τους φαινότυπους εκείνους του Hif-1α. Πιο συγκεκριμένα υποκύπτουν σε καρδιακή υπερτροφία, παραγωγή μη λειτουργικών τύπου II πνευμονοκυττάρων, σκελετική μυοπάθεια, ηπατική στεάτωση και ρετινοπάθεια <sup>[82,83]</sup>. Αυτό υποδεικνύει ότι οι δύο πρωτεΐνες, πιθανόν, να ρυθμίζουν επικαλυπτόμενα, αλλά όχι πανομοιότυπα, γονίδια-στόχους.





**Εικόνα 10: Η μορφογένεση των διακλαδώσεων, κατά τη διάρκεια της τραχειακής ανάπτυξης της *D. melanogaster*, και ο σχηματισμός των αιμοφόρων αγγείων των θηλαστικών ρυθμίζεται από τα επίπεδα του  $O_2$ .** (A) Μοντέλα για την αίσθηση του  $O_2$  από τη *D. melanogaster*. Τα κύτταρα ενός ιστού-στόχου που εμφανίζουν χαμηλό  $O_2$ , λόγω της απόστασής τους από μια τραχειακή διακλάδωση, αρχίζουν να εκφράζουν το Branchless (Bnl, το ορθόλογο του FGF στα θηλαστικά). Η έκφραση του Branchless αυξάνεται σε αυτά τα  $O_2$ -στερημένα κύτταρα και τα κύτταρα της τραχείας ανταποκρίνονται με την εκβλάστηση τερματικών διακλαδώσεων, που μεγαλώνουν προς κάθε Bnl σηματοδοτικό κέντρο. Όταν η διακλάδωση προσεγγίζει την πηγή, ξεκινά να αναπτύσσει πολλά τμήματα ή σχηματισμούς διακλαδώσεων. (B) Μοντέλο αγγειακής μορφογένεσης. Οι αιμαγγειοβλάστες είναι μεσοδερμικά προγεννητικά κύτταρα που οδηγούν σε HSCs και αγγειοβλάστες. Ο VEGF απαιτείται για να παράγει αιμαγγειοβλάστες στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η αγγειογένεση, δηλαδή ο σχηματισμός ενός πλέγματος πρωτογενών ενδοθηλιακών κυττάρων, επίσης, εξαρτάται από τον VEGF. Η αγγειογενετική αναδιαμόρφωση σε ώριμο αγγειακό σύστημα, περιλαμβάνει άλλους σημαντικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων και τους προσδέτες τους, όπως οι Tie 1 και 2, Ang-1 και Ang-2 και αλληλεπιδράσεις TGF $\beta$ /TGFR. Όλοι αυτοί οι αγγειογενετικοί ρυθμιστικοί παράγοντες ρυθμίζονται από τα μειωμένα επίπεδα  $O_2$  και τους HIFs [63,65].

Έχουν γίνει πολλαπλές προσπάθειες σε διαγονιδιακούς ποντικούς HIF-2 $\alpha^{-/-}$  και οι φαινότυποί τους ποικίλουν και εξαρτώνται από το γένος του ποντικού που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, στο γένος C57/129SvJ, η ομάδα του McKnight περιέγραψε εμβρυϊκή θνησιμότητα σαν αποτέλεσμα της βραδυκαρδίας που οφείλεται στη δυσλειτουργία της κατεχολαμίνης. Στο γένος Swiss/129Sv, οι Carmeliet et al περιέγραψαν μια ελαττωματική περιγεννητική πνευμονική ωρίμανση, που οφείλεται στην ακατάλληλη παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών από τα Hif-2 $\alpha^{-/-}$  στα τύπου II πνευμονοκύτταρα [84,85]. Ακόμη, πιο

πρόσφατα παρουσιάζεται <sup>[86,87]</sup> ότι η διαγραφή του Hif-2α αλληλομόρφου, και όχι του Hif-1α, μετά τη γέννηση μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία που οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης.

Από τις παραπάνω μελέτες γίνεται φανερό ότι στο αναπτυσσόμενο έμβρυο η «φυσιολογική υποξία», όπως και η φυσιολογική λειτουργία των HIFs είναι απαραίτητες για την παραγωγή όλων των συστατικών ενός ανέπαφου καρδιαγγειακού και πνευμονικού συστήματος <sup>[88,89]</sup>. Επιπλέον, οι HIF-1α και HIF-2α ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο τα συστήματα αυτά.

### 3.1.5 Η μορφογένεση των οστών

Η μορφογένεση των οστών έχει μελετηθεί σε *in vitro* καλλιέργεια αναπτυσσόμενων οστών. Οι καλλιέργειες αυτές είναι δομές χωρίς αγγεία, στις οποίες οι χαμηλές μερικές πιέσεις προέρχονται από το χονδρογενές μικροπεριβάλλον, που υποτίθεται ότι επηρεάζει το φαινότυπο των χονδροκυττάρων, καθώς εξελίσσονται από ένα πολλαπλασιαζόμενο σε ένα τελικά διαφοροποιημένο στάδιο <sup>[90]</sup>. Τα τριβλία ανάπτυξης των χονδροκυττάρων προχωρούν μέσω φάσεων κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης <sup>[91]</sup>. Τα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα συνθέτουν κολλαγόνο τύπου II και διαφοροποιούνται στα μεταμιτωτικά υπερτροφικά κύτταρα, που εκφράζουν κολλαγόνο τύπου X και VEGF. Στην καλλιέργεια χονδροκυττάρων η στοχευμένη αποσιώπηση του Hif-1α ποντικών έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο εξαιτίας των σφαλμάτων στην αναπτυξιακή αναστολή που ρυθμίζεται από την HIF-1α <sup>[92]</sup>. Ποντικοί με απαλοιφή του Hif-1α, σε αυτό τον πληθυσμό χονδροκυττάρων, έχουν αισθητά κοντύτερα άκρα λόγω της αυξημένης απόπτωσης και της μη οργανωμένης μετάβασης από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα στα πρωτογενή σπογγώδη. Υποστηρίζεται ακόμη ότι η HIF-1α είναι κρίσιμη για τα πρώιμα στάδια του σχηματισμού των οστών <sup>[93]</sup>.

### 3.1.6 Η λιπογένεση

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από την υποξία είναι, επίσης, σημαντικοί ρυθμιστές της λιπογένεσης. Καθώς ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων απαιτεί μιτοχondριακή αναπνοή, η υποξία περιορίζει τη χρήση των λιπαρών οξέων και την ανάγκη για επιπρόσθετο λιπώδη ιστό. Είναι πιθανό, η υποξία να αναστέλλει την ανάπτυξη των λιποκυττάρων από

μεσεγχυματικά πρόδρομα, αμβλύνοντας την έκφραση του PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$ ), μία πυρηνική ορμόνη που ρυθμίζει ειδικά γονίδια των λιποκυττάρων και προάγει τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε λιποκύτταρα <sup>[94]</sup>.

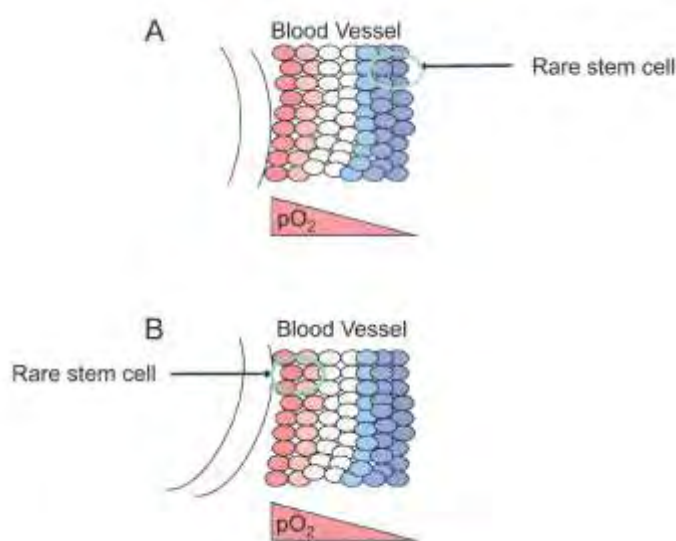
Οι Yun et al έδειξαν ότι οι ινοβλάστες από έμβρυα ποντικών, με ανεπάρκεια της HIF-1 $\alpha$ , δεν επηρεάζονται από την υποξική αναστολή της λιπογένεσης <sup>[95]</sup>. Η ρύθμιση του DEC1/Stra13 (Drosophila hairy/Enhancer of split transcription factor family member, γνωστό και ως Stra13), ενός καταστολέα του PPAR $\gamma$  υποκινητή, από τον HIF παρέχει έναν βαθύτερο μοριακό μηχανισμό για την επίδραση του O<sub>2</sub> στη λιπογένεση. Το χαμηλό O<sub>2</sub> ενεργοποιεί τα ετεροδιμερή HIF-1 $\alpha$ -ARNT, που ρυθμίζουν θετικά την έκφραση του γονιδίου Dec1, το οποίο με τη σειρά του καταστέλλει τη μεταγραφή του PPAR $\gamma$  και αναστέλλει τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε λιποκύτταρα. Η έκφραση της HIF-2 $\alpha$  επάγεται, κατά τη διάρκεια της λιπογένεσης, in vivo και in vitro, αλλά παίζει ένα ξεχωριστό ρόλο από την HIF-1 $\alpha$  <sup>[96]</sup>.

### 3.2 Τα βλαστικά κύτταρα

Τα βλαστικά κύτταρα, καθώς και τα πλειοτροπικά προγεννητικά κύτταρα, βρίσκονται σε πολυσύνθετο μικροπεριβάλλον <sup>[97]</sup>. Πολλές μελέτες αποκάλυψαν ότι τα επίπεδα του O<sub>2</sub> μπορούν να επηρεάσουν αυτό το περιβάλλον και να προάγουν τη διαφοροποίηση κάποιων τύπων βλαστικών ή προγεννητικών κυττάρων, αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση άλλων. Αυτά τα διαφορετικά αποτελέσματα αποδείχτηκαν σε πειράματα στα οποία πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων καλλιεργήθηκαν σε υποξικές συνθήκες in vitro. Για παράδειγμα, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών του ποντικού επιδεικνύουν ενισχυμένη ικανότητα σχηματισμού αποικίας και αυξημένο πολλαπλασιασμό σε 5% O<sub>2</sub> <sup>[78,98]</sup>. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ποντικού που καλλιεργήθηκαν σε χαμηλό O<sub>2</sub>, παράγουν περισσότερα οστεοκύτταρα όταν, ακολούθως, εμφυτεύονται in vivo. Η ανθρώπινη κυτοτροφοβλάστη και τα βλαστικά κύτταρα της τροφοβλάστης ποντικών είναι ιδανικά παραδείγματα του πώς πολυάριθμα κύτταρα, που περνούν μέσω μιας φυσικής κλίσης O<sub>2</sub>, καθώς μεταναστεύουν από το ένα μικροπεριβάλλον στο άλλο, καθώς ποικίλει η χωρική τους σχέση με τα αιμοφόρα αγγεία <sup>[79,99]</sup>.

Πιο συγκεκριμένα, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) των ενήλικων θηλαστικών εντοπίζονται στο μυελό των οστών. Η μερική πίεση του O<sub>2</sub> στο μυελό των οστών του ανθρώπου είναι χαμηλότερη απ' ότι στο περιφερειακό αίμα και τα πρότυπα δομής του μυελού και της αρτηριακής αιματικής ροής παράγουν μια κλίση O<sub>2</sub>. Έχει προταθεί ότι τα

HSCs και οι πολλαπλασιαζόμενοι πρόγονοί τους διανέμονται φυσικά, κατά μήκος αυτής της κλίσης, με τα HSCs να καταλαμβάνουν το πιο υποξικό περιβάλλον <sup>[100,101]</sup>. Επιπλέον, οι Danet et al απέδειξαν ότι τα HSCs του μυελού των οστών, που καλλιεργήθηκαν σε 1.5% O<sub>2</sub>, ανέπτυξαν τη δυνατότητα να εμβολιάζονται και να επανεγκαθίστανται στο αιμοποιητικό όργανο του ανοσοσυμβατού ποντικού-δέκτη <sup>[102]</sup>. Η ακριβής τοποθεσία των HSCs στο μυελό των οστών παραμένει αμφιλεγόμενη αλλά, είναι δυνατό, διαφορετικοί πληθυσμοί βλαστικών και προγεννητικών κυττάρων να απαιτούν διαφορετικές συνθήκες O<sub>2</sub> και, έτσι, πολλά διαφορετικά επίπεδα O<sub>2</sub> μπορεί να υπάρξουν στο μυελό των οστών. Φαίνεται, λοιπόν, ότι κάποια βλαστικά κύτταρα απαιτούν υποξικό μικροπεριβάλλον, ενώ άλλα απαιτούν σχετικά καλά οξυγονωμένο περιαγγειικό μικροπεριβάλλον (Εικόνα 11B). Αλλαγές στη συγκέντρωση του O<sub>2</sub> είναι πιθανό να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.



*Εικόνα 11: Διακριτοί πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων καταλαμβάνουν ένα μικροπεριβάλλον που περιέχει διαφορετικά επίπεδα O<sub>2</sub>. Μερικά βλαστικά κύτταρα κατέχουν εξαιρετικά χαμηλού O<sub>2</sub> μικροπεριβάλλον (λιγότερο από 0.5% O<sub>2</sub>), όπως φαίνεται και στο (A). Άλλα βλαστικά κύτταρα μπορούν να κατέχουν σχετικά καλά οξυγονωμένο περιβάλλον, καθώς είναι σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων (B). Έτσι, θα έπρεπε να σημειωθεί ότι, αν και τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να είναι περιαγγειακά, τα αγγεία μπορούν να συνδέονται με φλεβικές δομές και γι' αυτό να είναι σχετικά υποξικά <sup>[179]</sup>.*

Έχει αποδειχθεί ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται καλύτερα υπό συνθήκες χαμηλού O<sub>2</sub>, σε αντίθεση με τον περιβάλλοντα αέρα, που συμπληρώνεται με 5%

CO<sub>2</sub>. Έχει αναφερθεί ότι οι βλαστοκύστες των βοοειδών, που παράγονται υπό μειωμένη ένταση O<sub>2</sub>, εμφανίζουν πολλά περισσότερα κύτταρα εσωτερικής κυτταρικής μάζας από αυτά που αναφέρονται σε υψηλότερα επίπεδα O<sub>2</sub> <sup>[103]</sup>. Η εσωτερική κυτταρική μάζα και τα ομόλογα βλαστικά κύτταρά της είναι πλειοτροπικά. Οι Roberts et al απέδειξαν ότι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε παρόμοιο βαθμό όταν καλλιεργούνται σε 3-5% O<sub>2</sub>, όπως και σε 21% O<sub>2</sub> <sup>[104]</sup>. Ωστόσο, η παρουσία διαφοροποιημένων περιοχών σε αυτές τις καλλιέργειες εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως εκτιμήθηκε από τη μορφολογία και την απώλεια δεικτών των βλαστικών κυττάρων, όπως είναι ο SSEA (stage-specific embryonic antigen) και ο OCT-4, ήταν σημαντικά μειωμένη σε υποξικές συνθήκες. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι οι υποξικές συνθήκες απαιτούνται για να διατηρήσουν την πλήρη πλειοτροπικότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων των θηλαστικών.

### **3.2.1 Υποξικός έλεγχος της συμπεριφοράς των βλαστικών κυττάρων**

Η υποξία προάγει εμφανώς το αδιαφοροποίητο στάδιο σε πολλά βλαστικά κύτταρα και πληθυσμούς πρόδρομων κυττάρων, αλλά οι μοριακοί μηχανισμοί που αποτελούν τη βάση για αυτές τις παρατηρήσεις παρέμειναν αδιευκρίνιστοι μέχρι πρόσφατα. Μια σύνδεση έχει αποδειχτεί μεταξύ της υποξίας, των HIFs και μορίων που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών ή/και προγεννητικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του Notch, της β-κατενίνης, του OCT-4 και της c-MYC.

### **3.2.2 Οι HIFs στη διαφοροποίηση των βλαστικών και των προγεννητικών κυττάρων**

Οι βέλτιστες συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας για τη διατήρηση πρόδρομων κυττάρων στο επιθυμητό στάδιο διαφοροποίησης, πιθανόν, να αντανakλά τα φυσιολογικά επίπεδα O<sub>2</sub> τα οποία, τα κύτταρα αυτά, συναντούν στο έμβρυο ή στον ενήλικα. Το γεγονός ότι το αναπτυξιακό στάδιο πολλών πληθυσμών βλαστικών ή προγεννητικών κυττάρων επηρεάζεται από το επίπεδο οξυγόνωσης, εμπλέκει έντονα τα ευαίσθητα στο O<sub>2</sub> ενδοκυττάρια μονοπάτια, όπως τα HIF-εξαρτώμενα μονοπάτια, στη ρύθμιση της κυτταρικής μοίρας. Γενετικές μελέτες σε ποντικούς επιβεβαίωσαν τα παραπάνω *in vivo* <sup>[78,79,93]</sup>.

Ο πλακούντας ποντικών με ανεπάρκεια του HIF (των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α ή της υπομονάδας ARNT) εμφανίζει ανώμαλη κυτταρική δομή εξαιτίας των μειωμένων λαβυρινθωδών στρωμάτων και των στρωμάτων σπογγιοτροφοβλάστης και των αυξημένων

αριθμών των γιγάντιων κυττάρων της τροφοβλάστης <sup>[79,80]</sup>. Αυτά τα *in vivo* ευρήματα συνάπτουν με το ρόλο της υποξίας, μέσω του HIF, στην προαγωγή της *in vitro* διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων της τροφοβλάστης σε σπογγιοτροφοβλάστες, σε αντίθεση με τα γιγάντια κύτταρα <sup>[79]</sup>. Όσον αφορά την ανθρώπινη τροφοβλάστη, τα βλαστικά κύτταρα της τροφοβλάστης των ποντικών μεταναστεύουν μέσω μιας φυσικής κλίσης O<sub>2</sub>, καθώς μεταβαίνουν από μια φτωχή σε O<sub>2</sub> περιοχή σε μια σχετικώς πλουσιότερη περιοχή, που περιβάλλει τις μητρικές σπειροειδείς αρτηρίες. Έχει αποδειχτεί ότι αυτά τα βλαστικά κύτταρα ακολουθούν τη μοίρα των σπογγιοτροφοβλαστών σε χαμηλές συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> και τη μοίρα των γιγάντιων κυττάρων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> <sup>[79,80]</sup>.

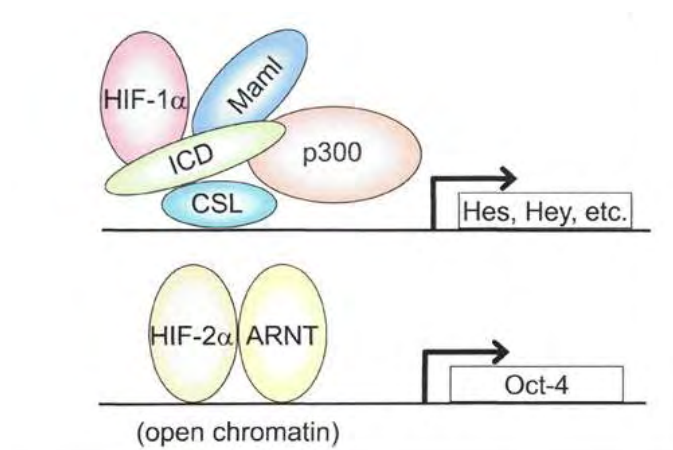
Τα αγρίου τύπου εμβρυοειδή σώματα, που αναπτύσσονται σε 3% O<sub>2</sub>, παράγουν πολύ περισσότερους ερυθροειδείς και μυελοειδείς προγόνους από αυτά που καλλιεργούνται σε 21% O<sub>2</sub>. Ως εκ τούτου, η «φυσιολογική υποξία» που συναντάται στα έμβρυα είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό και/ή την επιβίωση των πρόδρομων αιμοποιητικών κατά την ανάπτυξη.

Τα ενδοθηλιακά και τα αιμοποιητικά κύτταρα αναδύονται ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης, το οποίο προτείνει ότι, πιθανόν, να προέρχονται από έναν κοινό μεσοδερμικό πρόδρομο, γνωστό ως αιμαγγειοβλάστη. Η αφθονία των αιμαγγειοβλαστών στο πρώιμο έμβρυο φαίνεται να ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> <sup>[105]</sup>. Ο πολλαπλασιασμός των αιμαγγειοβλαστών στα εμβρυοειδή σώματα ενισχύεται από την υποξία, που συνεπάγεται ότι τα αγγειακά και αιμοποιητικά σφάλματα, που παρατηρούνται στα HIF-ανεπαρκή έμβρυα, είναι, εν μέρει, το αποτέλεσμα εξάντλησης της κοινής προγεννητικής αντλίας.

### 3.2.3 Η δραστηριότητα του Notch, η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> και οι HIFs

Η σηματοδότηση μέσω του Notch έχει συντηρηθεί εξελικτικά για να διατηρεί τη μοίρα των βλαστικών ή προγεννητικών κυττάρων σε πολυκύτταρους οργανισμούς <sup>[106,107]</sup>. Η κυτταρική διαφοροποίηση των μυογενών, αιματοποιητικών και νευρωνικών προδρόμων αναστέλλεται από μέλη της οικογένειας του Notch <sup>[108-111]</sup>. Ο Notch μεσολαβεί στη σηματοδότηση μεταξύ γειτονικών κυττάρων που εκφράζουν Notch υποδοχείς (Notch 1-4) και προσδέτες του Notch (Delta, Serrate και Lag-2). Όταν ενεργοποιούνται από τη σύνδεση του προσδέτη, οι Notch υποδοχείς υφίστανται μια σειρά από πρωτεολυτικές διασπάσεις ώστε να απελευθερωθεί η ενδοκυττάρια περιοχή τους (ICD), η οποία μεταφέρεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με την συνδεδεμένη στο DNA πρωτεΐνη CSL (C-promoter-binding factor/Suppressor-of-Hairless/Lag1) και συνενεργοποιητές, όπως οι CBP/p300 και

Mastermind, για να ενεργοποιήσουν στόχους όπως οι Hes και Hey. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, με τη σειρά τους, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση ή την ενεργότητα παραγόντων διαφοροποίησης, όπως οι Mash, MyoD και η νευρογενίνη<sup>[112,113]</sup>.



**Εικόνα 12: Μοντέλα που περιγράφουν τη διαθεσιμότητα του  $O_2$  και τη μεταγραφική δραστηριότητα.** (A) Σε συνθήκες υποξίας, η HIF-1α τυπικά αλληλεπιδρά με την HIF-1β (ARNT) για να διεγείρει τα γονίδια-στόχους, όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor), ο FGF-2 (fibroblast growth factor 2) και ο PDGF-β (platelet-derived growth factor-β). Η HIF-1α μπορεί, επίσης, να αλληλεπιδράσει με την ενδοκυττάρια περιοχή (ICD) του Notch στον πυρήνα, σε υποκινητές που αποκρίνονται στον Notch. Στον πυρήνα, ο Notch αλληλεπιδρά με την CSL (C-promoter-binding factor/Suppressor-of-Hairless/Lag 1) DNA-συνδεδεμένη πρωτεΐνη και συνενεργοποιητές, όπως ο CBP/p300 και η Mastermind (Mam 1), για να ενεργοποιήσουν γονίδια-στόχους, όπως τα Hes και Hey. Δεν είναι ακόμη γνωστό αν η αρχική αλληλεπίδραση HIF-1α-Notch συμβαίνει εκτός ή εντός του πυρήνα. Επιπλέον, η ακριβής σχέση μεταξύ των στοιχείων του συμπλόκου του Notch στους υποκινητές δεν είναι ξεκάθαρη. Η HIF-1α θα μπορούσε άμεσα να αλληλεπιδράσει με την ICD, μία μη αναγνωρισμένη πρωτεΐνη-«γέφυρα», ή με τη Mam1. (B) Στα κύτταρα όπου ο OCT4 γενετικός τόπος είναι προσιτός, ως αποτέλεσμα της ανοικτής χρωματινής, η μεταγραφή του επάγεται άμεσα από τα διμερή HIF-2α-ARNT ως απάντηση στην υποξία<sup>[138]</sup>.

Κάποιες υποξικές επιδράσεις στα προγεννητικά κύτταρα συσχετίζονται με τις επιδράσεις της σηματοδότησης του Notch σε αυτά τα κύτταρα. Οι Gustaffson et al έδειξαν ότι η υποξία επηρεάζει άμεσα την ενεργότητα του Notch<sup>[114]</sup>. Η υποξία (1%  $O_2$ ), μέσω της συσσώρευσης της HIF-1α, μπλοκάρει τη μυογενή διαφοροποίηση των C2C12 μυοβλαστών και τη νευρωνική διαφοροποίηση των P19 εμβρυϊκών καρκινικών κυττάρων. Τα μειωμένα επίπεδα  $O_2$ , επίσης, αναστέλλουν την ωρίμανση των πρωτογενών δορυφορικών κυττάρων, που λαμβάνονται από τα μυϊκά και νευρικά βλαστικά κύτταρα, και αντλούνται από τον εμβρυϊκό φλοιό ποντικού. Αυτές οι επιδράσεις ακυρώνονται με την παρουσία των αναστολέων της γ-

σεκρετάσης, που αναστέλλουν τη σηματοδότηση του Notch εμποδίζοντας την ενδομεμβρανική πρωτεόλυση του. Η υποξία επάγει την έκφραση των μεταγραφικών στόχων του Notch, Hes1 και Hey2. Τα επίπεδα του Hes1 είναι, επίσης, αυξημένα από τα μιμητικά της υποξίας, που σταθεροποιούν την HIF-1α. Αυτά τα αποτελέσματα συνεπάγονται ότι η HIF-1α μεσολαβεί στις επιδράσεις της υποξίας στην ενεργότητα του Notch. Η HIF-1α έχει αποδειχτεί ότι συνδέεται με την ICD του Notch, προάγοντας τη σταθερότητά του <sup>[114]</sup>. Οι συγγραφείς πρότειναν ένα μοντέλο στο οποίο η HIF-1α αλληλεπιδρά με τα μεταγραφικά σύμπλοκα Notch-CSL σε προαγωγείς που αποκρίνονται στον Notch, σε υποξικά κύτταρα, για να ελέγχει το επίπεδο της διαφοροποίησης στους μυογενείς και νευρωνικούς προδρόμους (Εικόνα 12Α). Η HIF-1α ρυθμίζει, επίσης, την έκφραση του γονιδίου APH-1A, που κωδικοποιεί ένα μέρος του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης. Αυτό προτείνει έναν επιπρόσθετο δυναμικό μηχανισμό όπου η υποξία αυξάνει τη σηματοδότηση μέσω του Notch <sup>[115]</sup>. Σε αυτή την περίπτωση, τα επίπεδα της ICD του Notch αυξάνονται εξαιτίας της ενισχυμένης πρωτεόλυσης της γ-σεκρετάσης που μεσολαβεί. Και οι δύο μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη Notch ICD στα υποξικά κύτταρα.

### 3.2.4 Η δραστηριότητα του Wnt

Το μονοπάτι σηματοδότησης του Wnt είναι ένας άλλος σημαντικός ρυθμιστής της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων στα θηλαστικά. Η υποξία ρυθμίζει αρνητικά τη β-κατενίνη (μέσω της αλληλεπίδρασης με την HIF-1α), που σταθεροποιείται σε απάντηση της σηματοδότησης μέσω του Wnt και σχηματίζει ένα ενεργό μεταγραφικό σύμπλοκο με τους LEF/TCF4 (lymphoid enhancer factor/T-cell factor-4). Οι Kaidi et al έδειξαν ότι η HIF-1α ανταγωνίζεται τον TCF4 για άμεση σύνδεση στη β-κατενίνη, με αποτέλεσμα, όπου μεσολαβεί η υποξία, την παύση του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας. Ακόμη, η β-κατενίνη μπορεί να προάγει τη μεταγραφική ενεργότητα μέσω της HIF-1α, που μπορεί να βοηθήσει τα κύτταρα να προσαρμοστούν στη σοβαρή υποξία <sup>[83]</sup>.

### 3.2.5 Ρύθμιση του OCT4

Ένα τρίτο μοριακό μονοπάτι, που υποστηρίζει τον υποξικό έλεγχο της συμπεριφοράς των βλαστικών κυττάρων, περιλαμβάνει το μεταγραφικό παράγοντα OCT4 (γνωστό ως OCT3/4 ή Pou5F1), που ενεργοποιείται ειδικά από την HIF-2α <sup>[116]</sup>. Ο OCT4 είναι σημαντικός



για τη διατήρηση του αδιαφοροποίητου σταδίου των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, της εμβρυϊκής επιβλάστης και των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (PGCs) <sup>[117,118]</sup>. Η έκφραση του Oct4 ελέγχεται στενά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της ενήλικης ζωής. Η αρνητική ρύθμιση του Oct4 απαιτείται για τη διαφοροποίηση της σειράς του τροφοεκτοδέρματος και τη μεταγενέστερη γαστριδίωση από την επιβλάστη. Ακόμη, η έκφραση του Oct4 διατηρείται στα PGCs. Στους ενήλικες, το Oct4 εκφράζεται αποκλειστικά στα γεννητικά κύτταρα και ανιχνεύεται σε πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων, όπως τα αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα και τα βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται σε θεμελιώδη επιδερμικά στρώματα <sup>[119,120]</sup>. Κάποιες άλλες μελέτες αναφέρουν ότι ο OCT4 είναι απαραίτητος για τη διατήρηση των γεννητικών κυττάρων, αλλά περιττός για την αυτοανανέωση των σωματικών βλαστικών κυττάρων <sup>[121,122]</sup>. Η σπουδαιότητα της αυστηρής διατήρησης των επιπέδων έκφρασης του Oct4 έχει αποδειχτεί *in vitro* και *in vivo* <sup>[123,124]</sup>.

Έχει αποδειχτεί ότι η HIF-2 $\alpha$ , και όχι η HIF-1 $\alpha$ , συνδέεται στον υποκινητή του Oct4 και επάγει την έκφρασή του σε υποξικά κύτταρα, αν ο γενετικός τόπος του Oct4 είναι σε μια «ανοικτή διαμόρφωση» και δεν είναι ενσωματωμένος στην ετεροχρωματίνη <sup>[116,125]</sup>. Υπάρχουν πολλά υποθετικά HREs στην περιοχή του υποκινητή του Oct4 που είναι συντηρημένα στον ποντικό και στον άνθρωπο <sup>[126]</sup>. Απαλοιφή ή μετάλλαξη αυτών των HREs καταργεί την υποξική επαγωγή του υποκινητή του Oct4 σε δοκιμασίες παροδικής επιμόλυνσης, υποδεικνύοντας ότι είναι λειτουργικά <sup>[116]</sup>. Περαιτέρω, δοκιμασίες ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP) απέδειξαν ότι η ενδογενής HIF-2 $\alpha$  καταλαμβάνει τα HREs του Oct4 σε κύτταρα που στερούνται O<sub>2</sub>. Παράγοντας ποντικούς με εκτεταμένη έκφραση μιας περιοχής της HIF-2 $\alpha$ , είχε σαν αποτέλεσμα τα πρώιμα έμβρυα να εμφανίσουν αυξημένα επίπεδα του OCT4 και σοβαρά αναπτυξιακά σφάλματα. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, που υπερέκφρασαν την HIF-2 $\alpha$ , παρήγαγαν, με έναν OCT4-εξαρτώμενο τρόπο, μεγάλα υποδόρια τερατώματα, που χαρακτηρίζονταν από μεταβεβλημένη κυτταρική διαφοροποίηση <sup>[116]</sup>. Τα Hif-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup> έμβρυα έδειξαν μια εντυπωσιακή μείωση στον αριθμό των PGCs, που απαιτεί την έκφραση του Oct4 για επιβίωση ή/και διατήρηση <sup>[116]</sup>. Τα παραπάνω στοιχεία ταυτοποιούν την HIF-2 $\alpha$  ως έναν ανοδικό ρυθμιστή της έκφρασης του Oct4 (Εικόνα 12B), και υποδεικνύουν ένα δυναμικό μονοπάτι στο οποίο η υποξία επηρεάζει άμεσα τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων.

### 3.2.6 Επίδραση στον «αναπρογραμματισμό» των ενήλικων κυττάρων

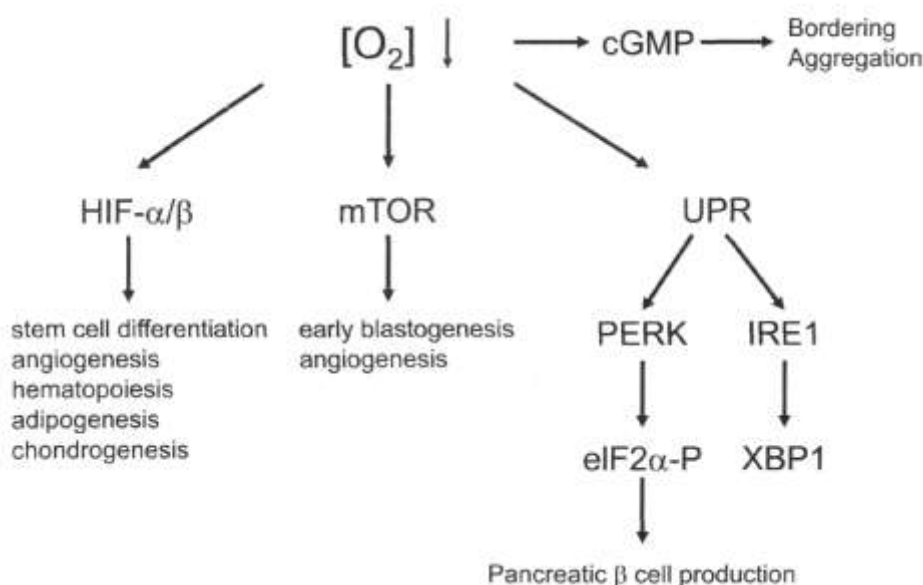
Οι αντιτιθέμενες επιδράσεις των HIF-1α και HIF-2α στη δραστικότητα της c-MYC έχουν επιπτώσεις στη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Η HIF-1α αναστέλλει τη δραστικότητα της c-MYC <sup>[127,128]</sup>, ενώ η HIF-2α έχει δείξει ότι προάγει τον c-MYC-εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό <sup>[129]</sup>. Το γεγονός ότι η HIF-2α ενισχύει τα επίπεδα δραστικότητας του OCT4 και της c-MYC είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, καθώς αυτοί οι δύο παράγοντες μπορούν και ρυθμίζουν άμεσα την ταυτότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του ποντικού. Πολλές αναφορές <sup>[130-133]</sup> έδειξαν ότι η ενισχυμένη έκφραση των OCT4, c-MYC και δύο άλλων μεταγραφικών παραγόντων, των KLF4 (Krüppel-like factor 4) και SOX2, τροποποιεί τη μεθυλίωση του DNA, τη δομή της χρωματίνης και τη γονιδιακή έκφραση, σε διαφοροποιημένους ινοβλάστες ποντικού, οδηγώντας σε κύτταρα που είναι λειτουργικώς δυσδιάκριτα από τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ποντικού. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ιδέα ότι η «βλαστικότητα» μπορεί να απονεμηθεί σε πιο διαφοροποιημένα κύτταρα. Εξάλλου, υποδεικνύουν έναν δυναμικό μηχανισμό με τον οποίο η υποξία μπορεί να ρυθμίσει τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων, διαφοροποιώντας την έκφραση ή τη δραστικότητα των OCT4, c-MYC και, πιθανόν, άλλων πρωτεϊνών με έναν HIF-εξαρτώμενο τρόπο.

## 4. Συνεργαζόμενοι με τον HIF μηχανισμοί στη μορφογένεση των εμβρύων

Αν και οι HIFs ρυθμίζουν μια σημαντική μεταγραφική απάντηση στο χαμηλό O<sub>2</sub>, άλλα μονοπάτια (Εικόνα 13) παρέχουν, επίσης, σημαντικές προσαρμογές στην υποξία. Στα θηλαστικά, η υποξία έχει ως αποτέλεσμα πιο οξείες και χρόνιες απαντήσεις. Γρήγορες και αναστρέψιμες επιδράσεις στον κυτταρικό μεταβολισμό, την κυτταρική μάζα, τη δραστικότητα των καναλιών ιόντων και την πρωτεϊνοσύνθεση επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ ενεργειακού αποθέματος και απαιτήσεων, σε περιπτώσεις μειωμένης ικανότητας για οξειδωτικό μεταβολισμό <sup>[134]</sup>.

Αν και οι HIFs προάγουν την κυτταρική επιβίωση και την αγγειακή αναδιοργάνωση κατά την χρόνια υποξία, διάφορα HIF-εξαρτώμενα μονοπάτια, που ενεργοποιούνται από την οξεία υποξία, είναι κρίσιμα για τη διατήρηση του ATP, περιορίζοντας τις ενεργειο-εξαρτώμενες διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, η ριβοσωμική βιογένεση, η

μετάφραση του mRNA και η ροή των ιόντων. Τα παραπάνω έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνουν τον mTOR (mammalian target of rapamycin) <sup>[135]</sup>, την UPR (unfolded protein response) <sup>[136]</sup> και τα μονοπάτια της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης <sup>[137]</sup>. Η αίσθηση του O<sub>2</sub> από το αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα επηρεάζει, τελικά, τις αποκρίσεις της συμπεριφοράς στα ενήλικα ζώα <sup>[137]</sup>.



**Εικόνα 13:** Πολλαπλά μονοπάτια, που αποκρίνονται στις αλλαγές της διαθεσιμότητας του O<sub>2</sub>, επηρεάζουν αναπτυξιακές διαδικασίες. Οι HIFs ρυθμίζουν πολλές όψεις της καρδιαγγειακής μορφογένεσης και της διατήρησης των βλαστικών/προγεννητικών κυττάρων. Η μεταλλαξιγένεση της mTOR (mammalian target of rapamycin) και των σχετικών πρωτεϊνών, όπως οι raptor, rictor και mLST8, αποκάλυψαν ένα σημαντικό ρόλο για τα mTORC1 και mTORC2 κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Έτσι, απομένει να διευκρινιστεί αν ο mTOR αποκρίνεται στην υποξία, στο εμβρυϊκό μικροπεριβάλλον, για να ρυθμίσει την ανάπτυξη. Η UPR (unfolded protein response), που ρυθμίζεται από την κινάση PERK (και το υπόστρωμά της eIF2α), είναι απαραίτητη για την παραγωγή των β-παγκρεατικών κυττάρων, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή λίγο μετά τη γέννηση. Η IRE1 (inositol-requiring-1) είναι ένας άλλος τελεστής της UPR που συνδέεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο και ενεργοποιεί την XBP-1 (X box-binding protein 1), προάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως οι BiP και CHOP (c/EBP-homologous protein). Τέλος, η ρύθμιση του cGMP (cyclic guanosine monophosphate) προάγει τη νευρωνική δραστηριότητα στο *C. Elegans*, επιτρέποντας της να αποφύγει τα επίπεδα του O<sub>2</sub> που κυμαίνονται εκτός του εύρους 5-12% O<sub>2</sub>. Αυτό οδηγεί σε ειδικές εμφανίσεις των νηματοειδών αποικιών, προκαλώντας «γεινίαση» ή «ένωση» <sup>[138]</sup>.

## Συμπεράσματα- Συζήτηση

Οι HIFs συμμετέχουν σημαντικά στη μορφογένεση του εμβρύου, η οποία λαμβάνει χώρα σε υποξικό περιβάλλον, και συντονίζουν την ανάπτυξη συστημάτων, όπως η διακλάδωση της τραχείας, η αγγειογένεση, η καρδιαγγειακή και πνευμονική μορφογένεση, καθώς και τη διαφοροποίησή τους.

Πιο συγκεκριμένα, η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> και οι HIFs ελέγχουν την τραχειακή διακλάδωση μέσω της έκφρασης του FGF και την ιδιότητά του να προάγει ένα βέλτιστο τραχειακό δίκτυο, που διανέμει αποτελεσματικά το O<sub>2</sub> στον οργανισμό. Όσον αφορά τη μορφογένεση του αγγειακού συστήματος, ο κύριος αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας που παράγεται από κύτταρα που στερούνται O<sub>2</sub> είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες που είναι άμεσοι στόχοι του HIF είναι ο FGF2, ο TGF-β και η αγγειοποιητίνη 1 και 2. Όπως συμβαίνει και στη μορφογένεση της τραχείας, η ανάπτυξη εκ νέου των αγγειακών βάσεων δεν υπάρχει σε Arnt<sup>-/-</sup> έμβρυα, ενώ η αγγειακή αναδιαμόρφωση είναι δυνατή. Επιπλέον, η απαλοιφή της HIF-1α παρουσίασε όμοιο φαινότυπο με τους Arnt<sup>-/-</sup> ποντικούς. Περαιτέρω ανάλυση σε Arnt<sup>-/-</sup> έμβρυα αποκάλυψε μειωμένο αριθμό προγεννητικών αιμοποιητικών κυττάρων στο λεκιθικό σάκο. Έτσι, ο αιμοποιητικός φαινότυπος του λεκιθικού σάκου και οι αιμοποιητικές/αγγειακές ανωμαλίες, που σχετίζονται με την επικράτεια αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος (AGM), αποδίδονται στον ελλειμματικό VEGF.

Η βιβλιογραφία περιγράφει ότι και η ανάπτυξη του πλακούντα είναι άμεσα εξαρτώμενη από την πίεση το O<sub>2</sub> και τους HIFs. Γι' αυτό το λόγο αν σε ένα από τα γονίδια Arnt, Vhl (το γονίδιο που κωδικοποιεί την von Hippel-Lindau, μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αγγειογένεση και λειτουργεί ως αισθητήριο του O<sub>2</sub>), Phd2, ή σε συνδυασμό των Hif-1α και Hif-2α συμβεί απαλοιφή, τότε ο πλακούντας δε μπορεί να αναπτυχθεί σωστά λόγω της μείωσης των λαβυρινθωδών στρωμάτων και εμβρυϊκών αιμοφόρων αγγείων. Οι μελέτες που έγιναν για την καρδιαγγειακή και πνευμονική ανάπτυξη στα θηλαστικά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι HIF-1α και HIF-2α ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο τα συστήματα αυτά και ότι η «φυσιολογική υποξία», όπως και η φυσιολογική λειτουργία των HIFs είναι απαραίτητες για την παραγωγή όλων των συστατικών ενός ανέπαφου καρδιακού και πνευμονικού συστήματος.

Στη μορφογένεση των οστών η HIF-1α παίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς είναι κρίσιμη για τα πρώιμα στάδια σχηματισμού των οστών. Επιπλέον, ρυθμίζει την απόπτωση στα οστά και τη μετάβαση από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα στα πρωτογενή σπογγώδη.

Οι HIFs είναι, επίσης, σημαντικοί ρυθμιστές της λιπογένεσης. Οι HIF-1α και HIF-2α επάγονται και οι δύο κατά τη λιπογένεση, αλλά διαδραματίζουν ξεχωριστό ρόλο. Πιο αναλυτικά, η υποξία ενεργοποιεί τα ετεροδιμερή HIF-1α-ARNT, που ρυθμίζουν θετικά την έκφραση του γονιδίου Dec1, το οποίο καταστέλλει τη μεταγραφή του PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$ ) και αναστέλλει τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε λιποκύτταρα.

Ένα άλλο θέμα που έχει μελετηθεί εκτενώς είναι η σχέση των βλαστικών κυττάρων, της διαφοροποίησης και της συμπεριφοράς τους, με τους HIFs και το O<sub>2</sub>. Πολλές μελέτες αποκάλυψαν ότι τα επίπεδα του O<sub>2</sub> μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των βλαστικών ή προγεννητικών κυττάρων, προάγοντας ή αναστέλλοντας τη διαφοροποίησή τους. Έχει, ακόμη, αποδειχθεί ότι διαφορετικοί πληθυσμοί βλαστικών και προγεννητικών κυττάρων στο μυελό των οστών απαιτούν διαφορετικές συνθήκες O<sub>2</sub> και, έτσι, πολλές διαφορετικές συγκεντρώσεις μπορεί να υπάρξουν στο μυελό των οστών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε μια μελέτη που υποδεικνύει ότι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε παρόμοιο βαθμό όταν καλλιεργούνται σε 3-5% O<sub>2</sub>, όπως και σε 21% O<sub>2</sub>. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι υποξικές συνθήκες απαιτούνται για να διατηρήσουν την πλήρη πλειοτροπικότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων των θηλαστικών. Οι HIFs ρυθμίζουν, όπως ειπώθηκε παραπάνω, τη διαφοροποίηση των βλαστικών και προγεννητικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα βλαστικά κύτταρα ακολουθούν τη μοίρα των σπογγιοτροφοβλαστών σε χαμηλές συγκεντρώσεις O<sub>2</sub> και τη μοίρα των γιγάντιων κυττάρων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O<sub>2</sub>. Επιπλέον, η «φυσιολογική υποξία» που συναντάται στα έμβρυα είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό και/ή την επιβίωση των πρόδρομων αιμοποιητικών κατά την ανάπτυξη.

Όσον αφορά τον υποξικό έλεγχο της συμπεριφοράς των βλαστικών κυττάρων, έχει αποδειχτεί μια σύνδεση μεταξύ της υποξίας, των HIFs και σηματοδοτικών μορίων που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του Notch, της  $\beta$ -κατενίνης, του OCT-4 και της c-MYC. Πιο αναλυτικά, σχετικά με τη σηματοδότηση μέσω του Notch, έχει συντηρηθεί εξελικτικά για να διατηρεί τη μοίρα των βλαστικών ή προγεννητικών κυττάρων. Μέλη της οικογένειας του Notch αναστέλλουν την κυτταρική διαφοροποίηση των μυογενών, αιμοποιητικών και νευρωνικών προδρόμων. Ένα άλλο μοριακό

μονοπάτι, που υποστηρίζει τον υποξικό έλεγχο της συμπεριφοράς των βλαστικών κυττάρων, περιλαμβάνει το μεταγραφικό παράγοντα OCT4, που ενεργοποιείται ειδικά από την HIF-2α. Ο OCT4 είναι σημαντικός για τη διατήρηση του αδιαφοροποίητου σταδίου των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, της εμβρυϊκής επιβλάστης και των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (PGCs). Ακόμη, έχει αποδειχθεί πόσο σημαντική είναι η διατήρηση των επιπέδων έκφρασης του Oct4 τόσο in vitro όσο και in vivo.

Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η επίδραση των HIFs και του O<sub>2</sub> στον «αναπρογραμματισμό» των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι οι HIF-1α και HIF-2α έχουν αντίθετες επιδράσεις στη δραστικότητα της c-MYC με αποτέλεσμα να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων. Η HIF-1α αναστέλλει τη δραστικότητα της c-MYC, ενώ η HIF-2α έχει δείξει ότι προάγει τον c-MYC-εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι και άλλοι, συνεργαζόμενοι με τον HIF, μηχανισμοί συμβάλλουν στη μορφογένεση και παρέχουν σημαντικές προσαρμογές στην υποξία. Κάποια από τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια είναι ο mTOR (mammalian target of rapamycin), που συμμετέχει στην πρόωμη βλαστογένεση και την αγγειογένεση, η UPR (unfolded protein response), που συμβάλλει στην παραγωγή των β παγκρεατικών κυττάρων και τα μονοπάτια της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι οι HIFs είναι καθοριστικής σημασίας για τη μορφογένεση του εμβρύου και οποιαδήποτε δυσλειτουργία τους θα οδηγήσει σε μη φυσιολογική μορφογένεση. Περαιτέρω μελέτες θα οδηγήσουν στη διαλεύκανση περισσότερων αναπτυξιακών συστημάτων και τη σχέση των HIFs με αυτά.

## Βιβλιογραφία

1. Morriss GM, New DA: **Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos.** *J Embryol Exp Morphol* 1979, **54**:17–35.
2. Semenza GL: **Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, **15**:551–578.
3. Bruick RK: **Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor.** *Genes Dev* 2003, **17**:2614–2623.
4. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 5510–5514.
5. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL: **Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1.** *J Biol Chem* 1996, **271**:17771–17778.
6. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL: **Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1a.** *J Biol Chem* 1997, **272**:19253–19260.
7. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ: **Activation of hypoxia-inducible factor-1: definition of regulatory domains within the alpha subunit.** *J Biol Chem* 1997, **272**:11205–11214.
8. Rechsteiner M, Rogers SW: **PEST sequences and regulation by proteolysis.** *Trends Biochem Sci* 1996, **21**:267–271.
9. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L: **Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha.** *EMBO J* 1998, **17**:6573–6586.
10. Zagorska A, Dulak J: **HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing.** *Acta Biochimica Polonica* 2004, **51**:563–585.
11. Bardos JI and Ashcroft M: **Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1755**:107–120.
12. Tian H, McKnight SL, Russell DW: **Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells.** *Genes Dev* 1997, **11**:72–82.
13. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y: **A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1a regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development.** *Proc Natl Acad Sci* 1997, **94**:4273–4278.
14. Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N: **Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **287**:808–813.

15. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE: **Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 30 to the human erythropoietin gene.** Proc Natl Acad Sci 1991, **88**:5680–5684.
16. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL: **Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.** J Biol Chem 1994, **269**:23757–23763.
17. Wenger RH: **Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation.** J Exp Biol 2000, **203**:1253–1263.
18. Semenza GL: **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** Nat Rev Cancer 2003, **3**:721-732.
19. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF: **Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit.** J Biol Chem 1996, **271**:32253–32259.
20. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L: **Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor.** Proc Natl Acad Sci USA 1996, **94**:5667–5672.
21. Salceda S, Caro J: **Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitinproteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes.** J Biol Chem 1997, **272**:22642–22647.
22. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF: **Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.** Proc Natl Acad Sci USA 1998, **5**:7987–7992.
23. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME et al: **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** Nature 1999, **399**:271–275.
24. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyc-Kizesca M, Conaway RC, Conaway JW: **Activation of HIF1 $\alpha$  ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex.** Proc Natl Acad Sci 2000, **97**:10430–10435.
25. Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML, Peet DJ: **Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation.** Eur J Biochem 2003, **270**:781–790.
26. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr: **HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by praline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing.** Science 2001, **292**:464–468.
27. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: **Independent function of two destruction domains in hypoxia inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation.** EMBO J 2001, **20**:5197-5206.
28. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, and Neckers LM: **Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ -degradative pathway.** J Biol Chem 2002, **277**:29936-29944.
29. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, and Bedi A: **Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ .** Genes Dev 2000, **14**:34–44.



30. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S (2008). "**Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB**". *Biochem J* **412** (3): 477–484. doi:10.1042/BJ20080476. PMC 2474706. PMID 18393939. <http://www.hif1.com>.
31. Scott F, Gilbert S: **Developmental Biology: Chapter 11**. Massachusetts associates Publishers, 7th edition (2003).
32. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J: **Molecular Cell Biology: Chapter 14**. New York: W.H. Freeman and Co. publishing, 4th edition (2002).
33. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/275660/human-embryology>
34. <http://en.wikipedia.org/wiki/Organogenesis>
35. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Germ\\_layers.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Germ_layers.png)
36. Ralston A, Rossant J: **Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo**. *Clin Genet* 2005, **68**:106-112.
37. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J: **Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst**. *Development* 2005, **132**:2093-2102.
38. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA: **Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines**. *Stem cells* 2001, **19**:193-204.
39. Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA: **BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast**. *Nat Biotechnol* 2002, **20**:1261-1264.
40. James D, Noggle SA, Swigut T, Hemmati-Brivanlou A: **Contribution of human embryonic stem cells to mouse blastocysts**. *Dev Biol* 2006, **295**:90-102.
41. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S: **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells**. *Cell* 2003, **113**:631-642.
42. Hayslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M: **Downregulation of Nanog induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages**. *Stem Cells* 2005, **23**:1035-1043.
43. Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N: **Overexpression of Nanog in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features**. *Development* 2006, **133**:1193-1201.
44. Loebel DA, Watson CM, De Young RA, Tam PP: **Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells**. *Dev Biol* 2003, **264**:1-14.
45. Saitou M, Payer B, Lange UC, Erhardt S, Barton SC, Surani MA: **Specification of germ cell fate in mice**. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **358**:1363-1370.
46. Vallier L, Reynolds D, Pedersen RA: **Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway**. *Dev Biol* 2004, **275**:403-421.
47. Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Ward-van Oostwaard D, Mummery C: **Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin**. *J Cell Sci* 2004, **117**:1269-1280.

48. Muotri AR, Nakashima K, Toni N, Sandler VM, Gage FH: **Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain.** Proc Natl Acad Sci USA 2005, **102**:18644-18648.
49. Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, Studer L: **Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain.** Nat Biotechnol 2005, **23**:601-606.
50. Spagnoli F, Hemmati-Brivanlou A: **Guiding embryonic stem cells towards differentiation: lessons from molecular embryology.** Cur Op Genetics and Development 2006, **16**:469-475.
51. Lensch MW, Daley GQ: **Scientific and clinical opportunities for modeling blood disorders with embryonic stem cells.** Blood 2006, **107**:2605-2612.
52. Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M: **VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells.** Blood 2004, **103**:2504-2512.
53. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II: **Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential.** Blood 2005, **105**:617-626.
54. Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, Tian X, Kaufman DS, Thomson JA, Zanjani ED: **Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients.** Blood 2006, **107**:2180-2183.
55. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A: **TGFβ/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells.** Development 2005, **132**:1273-1282.
56. Keller G: **Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine.** Genes Dev 2005, **19**:1129-1155.
57. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE: **Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm.** Nat Biotechnol 2005, **23**:1534-1541.
58. Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, Jakt LM, Nishikawa S, Chiba T, Era T, Nishikawa S: **Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells.** Nat Biotechnol 2005, **23**:1542-1550.
59. Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G: **Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture.** Development 2004, **131**:1651-1662.
60. Guillemin K, Krasnow MA: **The hypoxic response: huffing and HIFing.** Cell 1997, **89**:9-12.
61. Manning G, Krasnow MA: **Development of the Drosophila tracheal system.** Cold Spring Harbor Laboratory Press; In the Development of Drosophila melanogaster **1993**:609-686.
62. Samakovlis C, Hacohen N, Manning G, Sutherland DC, Guillemin K, Krasnow MA: **Development of the Drosophila tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events.** Development 1996, **122**:1395-1407.
63. Jarecki J, Johnson E, Krasnow MA: **Oxygen regulation of airway branching in Drosophila is mediated by branchless FGF.** Cell 1999, **99**:211-220.

64. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: **Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.** *Nature* 1992, **359**:843–845.
65. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: **Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:4604–4613.
66. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat Med* 2003, **9**:669–676.
67. Risau W: **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature* 1997, **386**:671–674.
68. Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ: **The role of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxia induction of gene expression.** *J Biol Chem* 1996, **271**:15117–15123.
69. Hirota K, Semenza GL: **Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, **59**:15–26.
70. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL: **Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1.** *Blood* 2005, **105**:659–669.
71. Mitchell JA, Yochim JM: **Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the rat: its relation to uterine respiration and vascular activity.** *Endocrinology* 1968, **83**:701–705.
72. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E: **Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy.** *Obstet Gynecol* 1992, **80**:283–285.
73. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC: **Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT.** *Nature* 1997, **386**:403–407.
74. Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Adelman DM, Gohil M, Simon MC: **HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature.** *Dev Cell* 2006, **11**:81–92.
75. Kozak KR, Abbott B, Hankinson O: **ARNT-deficient mice and placental differentiation.** *Dev Biol* 1997, **191**:297–305.
76. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL: **Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha.** *Genes Dev* 1998, **12**:149–162.
77. Ryan HE, Lo J, Johnson RS: **HIF-1alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.** *EMBO J* 1998, **17**:3005–3015.
78. Adelman DM, Maltepe E, Simon MC: **Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity.** *Genes Dev* 1999, **13**:2478–2483.
79. Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E: **Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses.** *Genes Dev* 2000, **14**:3191–3203.
80. Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compennolle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, Simon MC: **Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:10479–10491.
81. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, Wagner JR, Devor DE, Grinberg A, Emmert-Buck MR, Westphal H, Klausner RD, Linehan WM: **Defective placental vasculogenesis causes**

- embryonic lethality in VHL-deficient mice.** Proc Natl Acad Sci USA 1997, **94**:9102–9107.
82. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH: **The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling.** Proc Natl Acad Sci. USA 2000, **97**:8386–8391.
83. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yang L-J, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA: **Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1<sup>-/-</sup> mice.** Nature Genetics 2003, **35**:331–340.
84. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL: **The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development.** Genes Dev 1998, **12**:3320–3324.
85. Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P: **Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice.** Nat Med 2002, **8**:702–710.
86. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC: **Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia.** Proc Natl Acad Sci USA 2007, **104**:2301–2306.
87. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH: **Hypoxia inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo.** J Clin Invest 2007, **117**:1068–1077.
88. Isaac DD, Andrew DJ: **Tubulogenesis in Drosophila: a requirement for the tracheless gene product.** Genes & Dev 1996, **10**:103–117.
89. Wilk R, Weizman I, Shilo B-Z: **Tracheless encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in Drosophila.** Genes & Dev 1996, **10**:93–102.
90. Rajpurohit R, Koch CJ, Tao Z, Teixeira CM, Shapiro IM: **Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism.** J Cell Physiol 1996, **168**:424–432.
91. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R: **Toward a molecular understanding of skeletal development.** Cell 1995, **80**:371–378.
92. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS: **Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival.** Genes Dev 2001, **15**:2865–2876.
93. Provot S, Zinyk D, Gunes Y, Kathri R, Le Q, Kronenberg HM, Johnson RS, Longaker MT, Giaccia AJ, Schipani E: **Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development.** J Cell Biol 2007, **177**:451–464.
94. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM: **PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene.** Mol Cell Biol 1995, **15**:351–357.
95. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ: **Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia.** Dev Cell 2002, **2**:331–341.

96. Shimba S, Wada T, Hara S, Tezuka M: **EPAS1 promotes adipose differentiation in 3T3-L1 cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**:40946–40953.
97. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T: **Stem cells find their niche.** *Nature* 2001, **414**:98–104.
98. Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI: **Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis.** *J Cell Physiol* 2001, **187**:345–355.
99. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ: **Regulation of human placental development by oxygen tension.** *Science* 1997, **277**:1669–1672.
100. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M: **The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells.** *Blood* 1993, **82**:2031–2037.
101. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD: **Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:5431–5436.
102. Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC: **Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions.** *J Clin Invest* 2003, **112**:126–135.
103. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG: **Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts.** *Biol Reprod* 2004, **71**:1108–1119.
104. Ezashi T, Das P, Roberts RM: **Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:4783–4788.
105. Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KD, Fehling HJ, Keller G, Simon MC: **Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development.** *Development* 2004, **131**:4623–4634.
106. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ: **Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.** *Science* 1999, **284**:770–776.
107. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G: **Notch signaling in development and disease.** *Semin Cancer Biol* 2004, **14**:320–328.
108. Nofziger D, Miyamoto A, Lyons KM, Weinmaster G: **Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts.** *Development* 1999, **126**:1689–1702.
109. Dahlqvist C, Blokzijl A, Chapman G, Falk A, Danneus K, Ibanez CF, Lendahl U: **Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation.** *Development* 2003, **130**:6089–6099.
110. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID: **Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling.** *Nat Med* 2000, **6**:1278–1281.
111. de la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA: **Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis.** *Development* 1997, **124**:1139–1148.
112. Cornell RA, Eisen JS: **Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin 1 function.** *Development* 2002, **129**:2639–2648.
113. Kopan R, Nye JS, Weintraub H: **The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD.** *Development* 1994, **120**:2385–2396.

114. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M: **Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state.** *Dev Cell* 2005, **9**:617–628.
115. Wang R, Zhang YW, Zhang X, Liu R, Zhang X, Hong S, Xia K, Xia J, Zhang Z, Xu H: **Transcriptional regulation of APH-1A and increased gamma-secretase cleavage of APP and Notch by HIF-1 and hypoxia.** *Faseb J* 2006, **20**:1275–1277.
116. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B: **HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth.** *Genes Dev* 2006, **20**:557–570.
117. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A: **Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.** *Cell* 1998, **95**:379–391.
118. Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P: **New type of POU domain in germ linespecific protein Oct-4.** *Nature* 1990, **344**:435–439.
119. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.** *Nature* 2002, **418**:41–49.
120. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE: **Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis.** *Carcinogenesis* 2005, **26**:495–502.
121. Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Scholer HR, Tomilin A: **Oct4 is required for primordial germ cell survival.** *EMBO Rep* 2004, **5**:1078–1083.
122. Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A, Jaenisch R: **Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**:403–415.
123. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG: **Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.** *Nat Genet* 2000, **24**:372–376.
124. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R: **Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues.** *Cell* 2005, **121**:465–477.
125. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC: **Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in Hypoxic Gene Regulation.** *Mol Biol Cell* 2003, **23**:9361–9374.
126. Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapetsa A, Scholer HR: **Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences.** *Mamm Genome* 2001, **12**:309–317.
127. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE: **HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc.** *Embo J* 2004, **23**:1949–1956.
128. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL: **HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-**

- deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity.** *Cancer Cell* 2007, **11**:407–420.
- 129.Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC: **HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity.** *Cancer Cell* 2007, **11**:335–347.
- 130.Takahashi K, Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell* 2006, **126**:663–676.
- 131.Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: **Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2007, **448**:313–317.
- 132.Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K: **Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**:55–70.
- 133.Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R: **In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.** *Nature* 2007, **448**:318–324.
- 134.Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC: **Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/ metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:9493–9498.
- 135.Wullschleger S, Loewith R, Hall MN: **TOR signaling in growth and metabolism.** *Cell* 2006, **124**:471–484.
- 136.Koumenis C, Wouters BG: **"Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways.** *Mol Cancer Res* 2006, **4**:423–436.
- 137.Gray JM, Karow DS, Lu H, Chang AJ, Chang JS, Ellis RE, Marletta MA, Bargmann CI: **Oxygen sensation and social feeding mediated by a C. elegans guanylate cyclase homologue.** *Nature* 2004, **430**:317–322.
- 138.Simon M, Keith B: **The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9(4)**:285–296.