



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
χρόνια δημιουργίας

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΤΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ:  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ»**

**ΠΑΣΣΙΑ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**  
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ,  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Επιβλέπουσα)

**ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ**, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ  
ΕΚΠΑ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ**, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ,  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

**ΛΑΡΙΣΑ, 2019**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«DNA METHYLATION IN INDUCED  
PLURIPOTENT STEM CELLS:  
APPLICATIONS IN THE REGENERATION  
OF THE ARTICULAR CARTILAGE»**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της δυνατότητας χρήσης τους στην αναγεννητική ιατρική, στην ιστική μηχανική και στην μοντελοποίηση ασθενειών. Παρουσιάζουν ομοιότητες με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, αλλά στερούνται των ηθικών διλημάτων που συνοδεύουν τα τελευταία. Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι ένας ετερογενής πληθυσμός βλαστοκυττάρων, γεγονός που οφείλεται στους μηχανισμούς της επιγενετικής και δη στη μεθυλίωση του DNA. Σε αυτήν την εργασία παρουσιάζονται οι μηχανισμοί επιγενετικής τροποποίησης στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα καθώς και επιλεγμένα πειράματα της τελευταίας δεκαετίας που έχουν ως σκοπό την χρήση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων στην αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου με ποικίλους τρόπους, είτε εργαστηριακά, είτε σε πειραματόζωα, με υποδόρια ένεση των iPSCs ή ορθοτοπικά, με ή χωρίς τη χρήση χημικών ενώσεων και βιοχημικών μέσων.

## ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells have attracted the interest of the scientific community, because of their potential use in the field of regenerative medicine, in tissue engineering and also in disease modeling. They are similar to the embryonic stem cells (ESCs), thus they are deprived of ethical issues that go with the last referred. Induced pluripotent stem cells constitute of a heterogenic population of stem cells, which is due to epigenetic modifications and especially DNA methylation. In this study, the mechanisms of epigenetic regulation in iPSCs are presented as well as selected experiments from the last decade that use pluripotent stem cells for articular cartilage repair with many ways, including in vivo or in animal models, with subcutaneous injection of the iPSCs or orthotopically, with or without the use of chemical molecules and biochemical agents.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ.4
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	
<b>ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ</b>	
1.1. ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ: ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ, ΕΙΔΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	σελ.7
1.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	
1.2.1. ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ.....	σελ.14
1.2.2. ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΣΥΝΤΗΞΗ ΜΕ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ .....	σελ.15
1.2.3. ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	σελ.17
1.2.4. ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ .....	σελ.18
1.2.4.1. ΟΙ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΚΑΘΟΡΙΜΕΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....	σελ.20
1.3. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΤΩΝ ΤΑΚΑΗΑΗΗ ΚΑΙ ΥΑΜΑΝΑΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	σελ.22

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	σελ.27
2.2. ΕΙΔΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ	
2.2.1. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ.....	σελ.29
2.2.1.1. ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ .....	σελ.31
2.2.1.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ .....	σελ.31
2.2.1.3. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ .....	σελ.32
2.2.1.4. ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ .....	σελ.32
2.2.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA .....	σελ.33
2.2.2.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA ΚΑΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ .....	σελ.35

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

3.1. ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ: ΔΟΜΗ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	σελ.40
3.2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ .....	σελ.44

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	σελ.58
--------------------	--------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	σελ.65
--------------------	--------

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs) αποτελούν τα πλέον πρωτόγονα βλαστοκύτταρα του οργανισμού και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης σε οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο. Όσο τα ESCs διαιρούνται κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ενός οργανισμού, χάνουν την δυναμικότητά τους και τελικά προκύπτουν τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (pluripotent cells), τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν και στα τρία βλαστικά δέρματα, δηλαδή στο ενδόδερμα, στο μεσόδερμα και στο εξώδερμα (Evans and Kaufman, 1981).

Ενώ τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα και τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα θεωρούνταν τα μόνα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από πολυδυναμικότητα, οι Takahashi και Yamanaka το 2006 έδειξαν ότι η μίξη των σωματικών διαφοροποιημένων κυττάρων μπορεί να «αναστραφεί» και να μετατραπούν και πάλι σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας έναν ρετροϊό, εισήγαγαν τέσσερις μεταγραφικούς παράγοντες (Oct3, Sox2, Klf4, c-Myc) σε ινοβλάστες ποντικού, οι οποίοι οδήγησαν στον αναπρογραμματισμό τους σε κύτταρα όμοια με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ένα χρόνο αργότερα, η ίδια ομάδα ερευνητών πραγματοποίησε επιτυχώς αναπρογραμματισμό ινοβλαστών ενήλικα ατόμου (Takahashi *et al.*, 2007).

Συγκριτικά, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν τόσο ομοιότητες όσο και διαφορές μεταξύ τους. Τα κοινά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν είναι κατ' αρχήν η απεριόριστη δυνατότητα αυτοανανέωσης και η πολυδυναμικότητα. Επίσης είναι όμοια όσον αφορά τον φυσιολογικό καρύτυπο, την μορφολογία τους, την δυνατότητα σχηματισμού τερατώματος, την υψηλή ενεργότητα τελομεράσης που τους προσδίδει «αθάνατο» χαρακτήρα και τους κυτταρικούς δείκτες επιφανείας (Bodnar *et al.*, 1998).

Παρόλα αυτά, τα iPSCs παρουσιάζουν δυο σημαντικά προτερήματα, έναντι των ESCs. Πρώτον, τα iPSCs αποτελούν μια άμεση πηγή βλαστοκυττάρων και μάλιστα από τον ίδιο

τον ασθενή και επομένως με χαμηλότερο ρίσκο ανοσιακής απόκρισης (Drukker *et al.*, 2002). Δεύτερον, τα iPSCs μπορούν να παρακάμψουν τα ηθικά ζητήματα που σχετίζονται με τη χρήση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, καθώς η χρήση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων απαιτεί την καταστροφή ανθρώπινων εμβρύων (Frankel, 2000).

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα ωστόσο είναι όμοια και όχι πανομοιότυπα με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, όπως αποδείχθηκε από το γεγονός ότι η πλειοψηφία των γονιδίων και των επιφανειακών δεικτών εκφράζονται στα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, αλλά όχι όλα στο σύνολο τους (Takahashi and Yamanaka, 2006). Σε αυτή τη διαφορά φαίνεται να συμβάλλουν οι επιγενετικοί μηχανισμοί. Δηλαδή ενώ όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν το ίδιο DNA, την ίδια γενετική πληροφορία, παρουσιάζουν διαφορετική γονιδιακή έκφραση ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού σε κάθε στάδιο ανάπτυξης.

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα χάρη στις ιδιότητες τους αποτελούν επιθυμητό στόχο για την ανακάλυψη και σωστή διαλογή των φαρμάκων για κάθε ασθενή (drug screening), την εξατομικευμένη ιατρική (patient-precised medicine), την αναγεννητική ιατρική (regenerative medicine) καθώς και την κατανόηση της βιολογίας των ασθενειών (Shi *et al.*, 2017). Για αυτόν το λόγο μελετώνται μέθοδοι για χρήση των iPSCs για τη θεραπεία γενετικών και μη ασθενειών.

Στα πλαίσια της πολυδυναμικότητας που χαρακτηρίζει τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα, τα βλαστοκύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μεσόδερμα και κατ' επέκταση σε λειτουργικό αρθρικό χόνδρο. Για το λόγο αυτό, τα iPSCs καθίστανται υποψήφια κύτταρα για την ανάπλαση του αρθρικού ιστού, καθώς και ένας κατάλληλος μηχανισμός για την κατανόηση της φυσιολογίας του ιστού αυτού.

Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει αρκετά πειράματα με σκοπό την αποκατάσταση του αρθρικού ιστού με τη χρήση της τεχνολογίας των iPSCs, με ποικίλους τρόπους: είτε σε ζωντανό οργανισμό (*in vivo*) είτε στο εργαστήριο (*in vitro*), με υποδόρια ένεση των

επαγόμενων βλαστοκυττάρων ή ορθοτοπικά, με τη χρήση ικριώματος ή με τη βοήθεια χημικών ενώσεων.

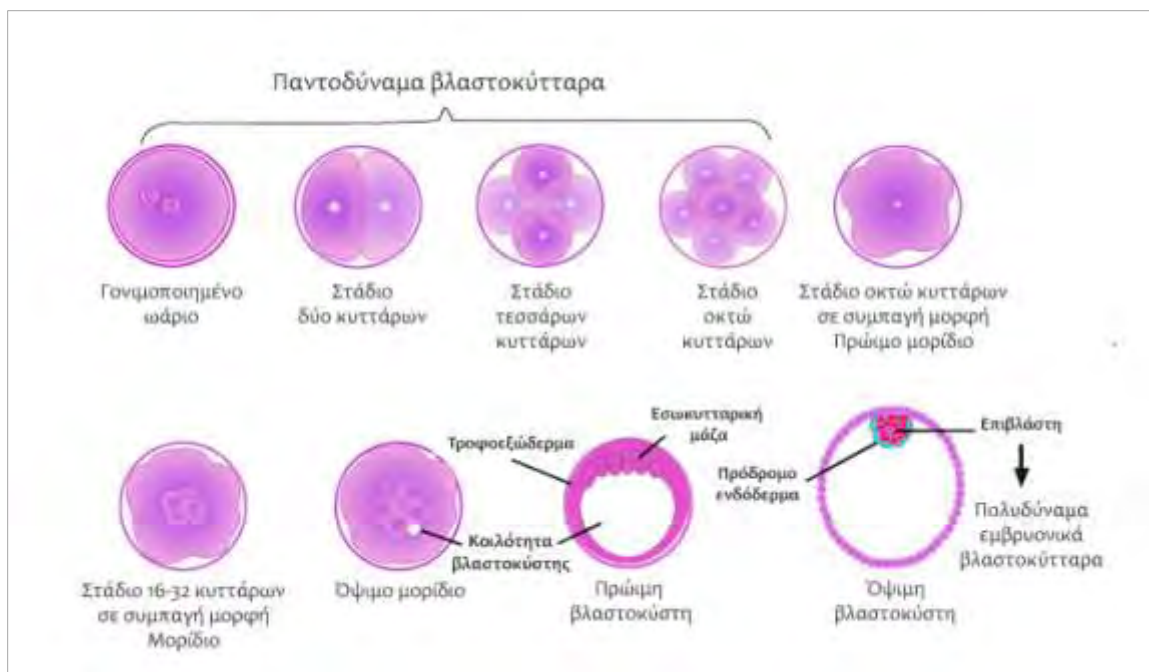
Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί η συμβολή των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στην αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου. Ειδικότερα, εξηγείται ο μηχανισμός την μεθυλίωσης του DNA και αναλύονται τα πειράματα που χρησιμοποίησαν iPSCs για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου, εστιάζοντας στις συνοδές στρατηγικές που εφάρμοσαν και στα αποκτηθέντα αποτελέσματα στο πεδίο της αναγεννητικής θεραπείας.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

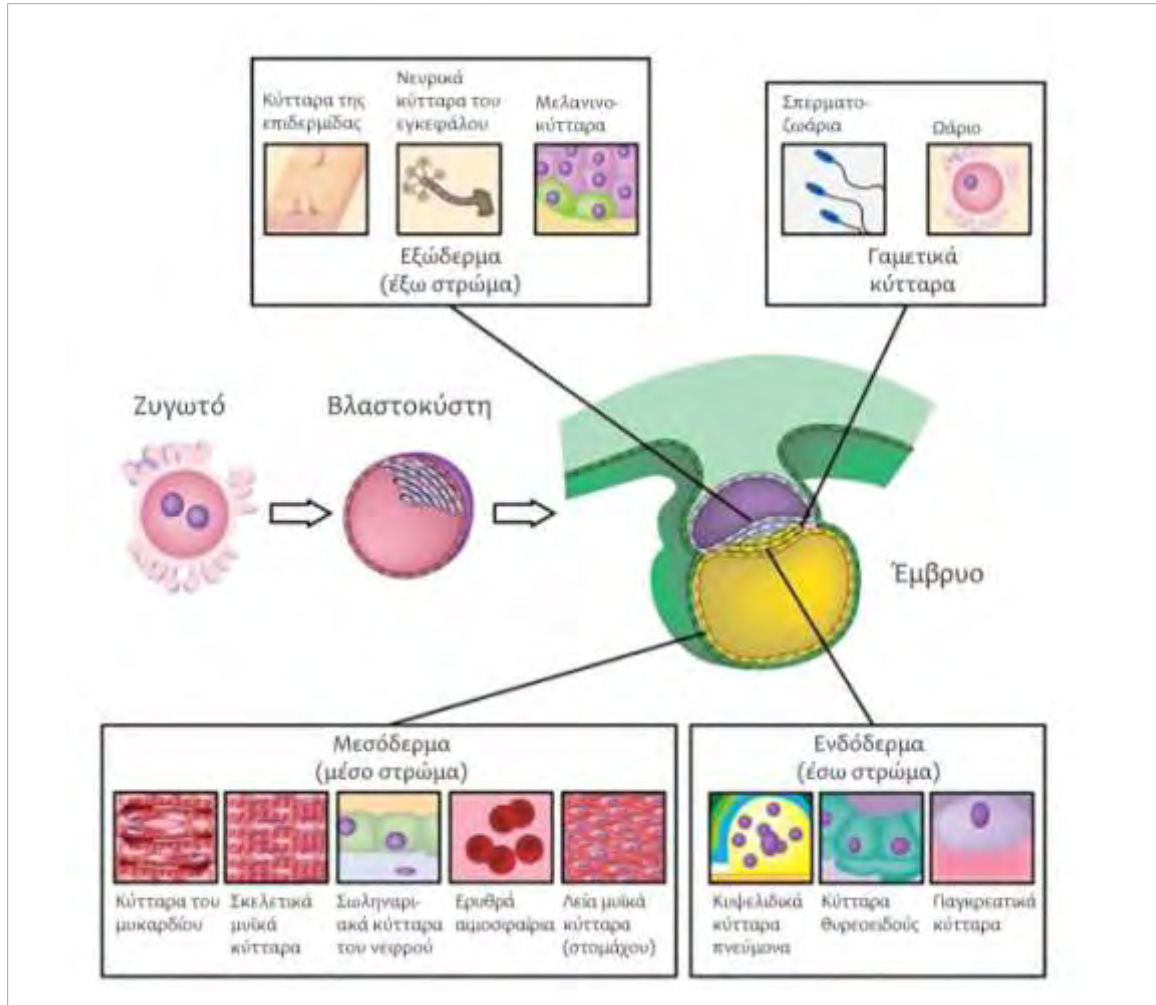
### 1.1 ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ: ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ, ΕΙΔΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ζωή στα θηλαστικά ξεκινάει με την γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα σπερματοζωάριο. Το γονιμοποιημένο ωάριο ή αλλιώς ζυγωτό αποτελεί το πλέον πρωτόγονο βλαστοκύτταρο στον οργανισμό. Χαρακτηριστικό των βλαστοκυττάρων είναι η αυτοανανέωση και η ικανότητα διαφοροποίησης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως σε ερυθρά αιμοσφαίρια σε κύτταρα του καρδιακού μυ ή σε κύτταρα του αρθρικού χόνδρου. Μέχρι και την τέταρτη μέρα από τη γονιμοποίηση, τα κύτταρα του διαιρούμενου ζυγωτού αντιπροσωπεύουν τα παντοδύναμα κύτταρα (totipotent cells) (Weissman, 2000). Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται και να σχηματίσουν έναν ολόκληρο οργανισμό, συμπεριλαμβανομένων και των εξωεμβρυονικών ιστών, όπως ο πλακούντας. Την πέμπτη μέρα ζωής τα παντοδύναμα κύτταρα του ζυγωτού διαιρούμενα σχηματίζουν την βλαστοκύστη (blastocyst). Η βλαστοκύστη αποτελείται από την έσω και έξω κυτταρική μάζα. Έξωθεν της βλαστοκύστης βρίσκεται η τροφοβλάστη, μια σειρά από κύτταρα που παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία στην βλαστοκύστη. Αργότερα η τροφοβλάστη εξελίσσεται σε τροφοεξώδερμα που αποτελεί μέρος του πλακούντα. Η έσω κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM) ορίζεται από δυο καταβολές, το εμβρυονικό εξώδερμα (επιβλάστη), το οποίο δίνει γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του εμβρύου και στο εξωεμβρυονικό μεσόδερμα, και το εξωεμβρυονικό ενδόδερμα, το οποίο συνεισφέρει στη δημιουργία του εμβρυονικού σάκου (Lu, Brennan and Robertson, 2001) [Εικόνα 1].



Εικόνα 1: Τα πρώτα στάδια ανάπτυξης στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα  
© biologiedelapeau.fr

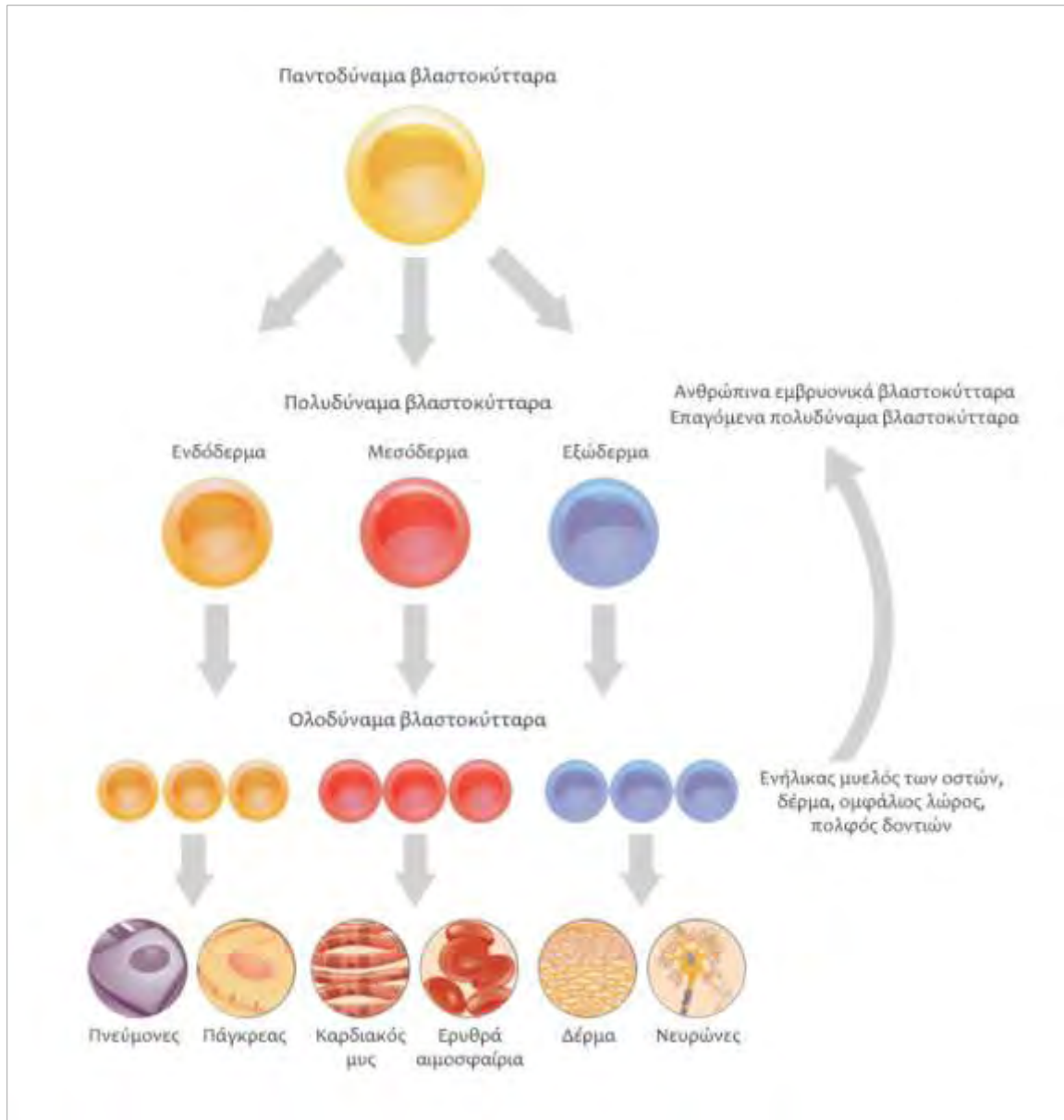
Πιο ειδικά η έσω κυτταρική μάζα αποτελείται από τα εμβρυονικά κύτταρα (Embryonic Stem cells, ES cells), τα οποία είναι πολυδύναμα κύτταρα (pluripotent) και από τα οποία αναπτύσσεται το έμβryo (Evans and Kaufman, 1981). Ο όρος πολυδυναμικότητα (pluripotency) αναφέρεται στην ιδιότητα που έχουν τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα να διαφοροποιούνται και στα τρία βλαστικά δέρματα, δηλαδή στο ενδόδερμα, στο μεσόδερμα και στο εξώδερμα. Από το κάθε βλαστικό δέρμα ξεχωριστά προέρχονται και διαφορετικά κύτταρα: από το ενδόδερμα προκύπτουν τα κύτταρα του πνεύμονα, του θυρεοειδούς και του γαστρεντερικού, από το μεσόδερμα προκύπτουν τα κύτταρα του καρδιακού μυ, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και οι σκελετικοί μύες και τέλος από το εξώδερμα προκύπτουν τα κύτταρα της επιδερμίδας και του νευρικού συστήματος [Εικόνα 2].



Εικόνα 2: Τα βλαστικά δέρματα ενός εμβρύου

© Zachary Wilson (CK-12 Foundation) - CC BY-NC 3.0 (Creative Commons)

Τα πολυδύναμα κύτταρα ύστερα διαιρούνται σε ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (multipotent stem cells), τα οποία με τη σειρά τους παράγουν περιορισμένες κυτταρικές σειρές. Τέλος από τα ολοδύναμα κύτταρα προκύπτουν τα μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα (unipotent stem cells), τα οποία παράγουν έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρων [Εικόνα 3].



Εικόνα 3: Διάγραμμα ταξινόμησης βλαστοκυττάρων  
 © OpenStax College - CC BY 3.0 (Creative Commons)

Η απόδοση του όρου «εμβρυονικά βλαστοκύτταρα» προϋποθέτει τα εξής κριτήρια: (i) η προέλευση αυτών των κυττάρων να είναι στο στάδιο της προεμφύτευσης του εμβρύου, (ii) τα κύτταρα αυτά να πολλαπλασιάζονται χωρίς να διαφοροποιούνται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, και (iii) τα κύτταρα αυτά να αναπτύσσονται σταθερά και με δυνατότητα να σχηματίσουν και τα τρία βλαστικά δέρματα (Thomson *et al.*, 1998).

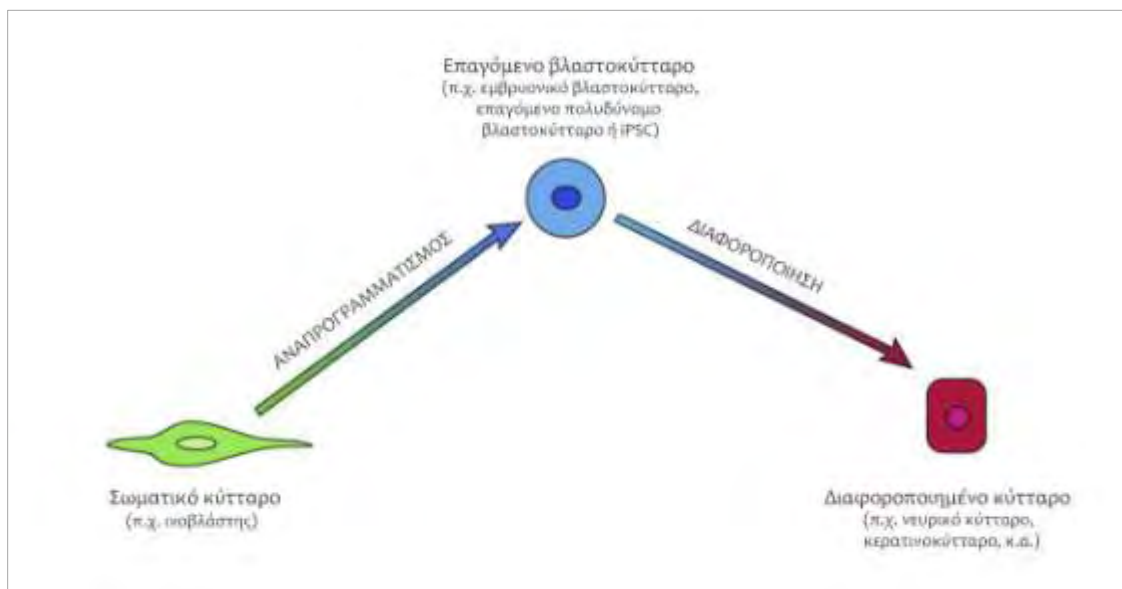
Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από κάποιες ιδιότητες κοινές με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα: έχουν φυσιολογικό καρυότυπο, υψηλή ενεργότητα τελομεράσης και εκφράζουν ειδικούς δείκτες επιφανείας στα κύτταρά τους.

Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη που συνθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, τα τελομερή, στα άκρα των χρωμοσωμάτων και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση του μήκους των τελομερών (Wright *et al.*, 1996). Τα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου μετά από κάθε κυτταρικό κύκλο υφίστανται μείωση των τελομερών τους και δεν εκφράζουν την τελομεράση. Δηλαδή με την πάροδο του χρόνου και μετά από ένα πεπερασμένο χρονικό διάστημα τα κύτταρα αυτά εισέρχονται στην διαδικασία της γήρανσης (replicative senescence) (Allsopp *et al.*, 1992). Αντίθετα, στους εμβρυονικούς ιστούς και κατά συνέπεια και στα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα η τελομεράση εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα (Wright *et al.*, 1996). Η υψηλή αυτή έκφραση της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μακρά διάρκεια ζωής τους (replicative life-span). Μάλιστα μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλή έκφραση της τελομεράσης σχετίζεται με «αθανатоποίηση» σε σωματικές κυτταρικές σειρές και ότι η εισαγωγή τελομεράσης σε σωματικά κύτταρα παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους (Bodnar *et al.*, 1998) (Counter *et al.*, 1992). Επομένως τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης από τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα σχετίζονται με τη διάρκεια ζωής των κυττάρων, γεγονός που δεν παρατηρείται στα σωματικά κύτταρα.

Άλλο χαρακτηριστικό των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων που μιμούνται και τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι οι κυτταρικοί δείκτες επιφανείας. Οι δείκτες αυτοί, που εκφράζονται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης, περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων συγκεκριμένου σταδίου εμβρυονικά αντιγόνα και αλκαλική φωσφατάση (Thomson *et al.*, 1995). Χάρη στις παραπάνω ιδιότητες των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων, που είναι κοινές με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, φαίνεται ιδεατή η δυνατότητα χρήσης αυτών των κυττάρων έναντι των εμβρυονικών, καθόσον τα τελευταία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ηθικούς λόγους.

Οι περισσότεροι ιστοί των ενηλίκων περιέχουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την επούλωση τραυμάτων και την ομοίωση των ιστών, μέσω της αναγεννητικής τους ικανότητας. Οι κύριες πηγές ενηλίκων βλαστοκυττάρων είναι ο

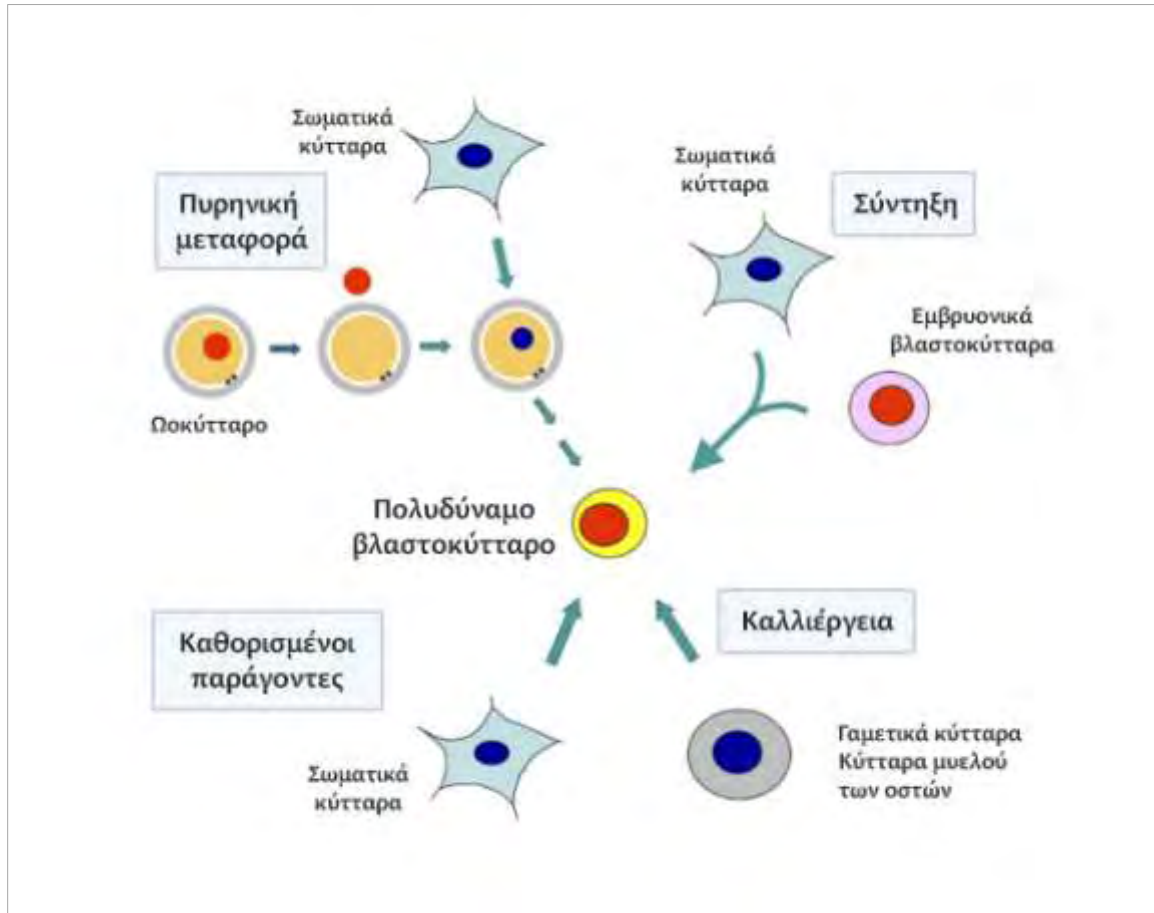
μυελός των οστών, ο πολφός των δοντιών και ο ομφάλιος λώρος. Ωστόσο μεγαλύτερη δυναμικότητα έχουν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, αλλά υπόκεινται σε κάποιους περιορισμούς: τίθενται ηθικά διλήμματα όσον αφορά τη χρήση τους, όπως επίσης είναι ικανά να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση μέσω του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Frankel, 2000) (Drukker *et al.*, 2002). Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, κρίθηκε αναγκαίο να αναπρογραμματιστούν οι πυρήνες διαφοροποιημένων κυττάρων προκειμένου να μετατραπούν σε εμβρυονικά πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Yamanaka, 2007). Ο όρος αναπρογραμματισμός μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία επαναφοράς ενός πλήρως διαφοροποιημένου κυττάρου σε κύτταρο με ευρύτερη αναπτυξιακή δυναμικότητα (Hemberger, Dean and Reik, 2009). Η διαδικασία αυτή συμβαίνει στον κυτταρικό κύκλο στο πρώιμο έμβρυο και σε πειράματα όπου ένα διαφοροποιημένο κύτταρο, δεσμευμένο να επιτελεί μια συγκεκριμένη λειτουργία σε έναν συγκεκριμένο ιστό, να μπορεί να «αναστρέψει» τη μοίρα του και να μετατραπεί σε πολυδύναμο επαγόμενο βλαστοκύτταρο, ικανό να διαφοροποιηθεί σε οποιοδήποτε είδος κυττάρου [Εικόνα 4].



Εικόνα 4: Αναπρογραμματισμός και διαφοροποίηση  
© biologiedelapeau.fr

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα χάρη στις ιδιότητές τους αποτελούν επιθυμητό στόχο για την ανακάλυψη φαρμάκων, στην κατανόηση της βιολογίας των ασθενειών και στις

μεταμοσχεύσεις. Οι τέσσερις πιθανοί τρόποι που μπορούν να επάγουν τα σωματικά κύτταρα σε πολυδύναμα είναι ο αναπρογραμματισμός κυττάρων με πυρηνική μεταφορά, ο αναπρογραμματισμός με σύντηξη με εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, ο αναπρογραμματισμός σε καλλιέργεια και ο επανααναπρογραμματισμός σωματικών διαφοροποιημένων κυττάρων σε πολυδύναμα επαγόμενα βλαστοκύτταρα με την εισαγωγή τεσσάρων καθορισμένων παραγόντων [Εικόνα 5].



Εικόνα 5: Μέθοδοι δημιουργίας πολυδύναμων βλαστοκυττάρων από ενήλικα σωματικά κύτταρα ή από γεννητικά κύτταρα

© Yamanaka, Shinya. 2007. "Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 1(1):39–49

## 1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

### 1.2.1 ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ

Η πρώτη επιτυχής πυρηνική μεταφορά έγινε από τους Briggs και King, οι οποίοι εμφύτευσαν πυρήνες από κύτταρα βλαστοκύστης σε απύρηνα ωάρια του γένους *Rana ripiens*, δίνοντας γέννηση σε φυσιολογικούς γυρίνους (Briggs and King, 1952). Έπειτα οι Gurdon και Uehlinger κατάφεραν να εμφυτεύσουν πυρήνες από εντερικά κύτταρα γυρίνων σε απύρηνα ωάρια του γένους *Xenopus laevis*, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γόνιμων ενήλικων βατράχων (Gurdon and Uehlinger, 1966). Ωστόσο οι προσπάθειες αυτές δεν μπόρεσαν να αποφέρουν φυσιολογικούς και σε πλήρη εξέλιξη οργανισμούς.

Μετάπειτα έγινε προσπάθεια πυρηνικής μεταφοράς σε μη γονιμοποιημένα ωάρια θηλαστικών το οποίο εκ των πραγμάτων ήταν δύσκολο λόγω του μικρού μεγέθους των κυττάρων αυτών. Προσπάθεια έγινε το 1975 από τον Bromhall ο οποίος εμφύτευσε πυρήνες από εμβρυονικά κύτταρα κουνελιών σε μη γονιμοποιημένα ωάρια κουνελιών με μικροέγχυση αλλά και με σύντηξη μέσω ιϊκού φορέα Sendai (Bromhall, 1975). Ανάλογα πειράματα έγιναν και σε άλλα θηλαστικά ζώα, όπως σε ποντίκια, χοίρους, πρόβατα αλλά με άκαρπες προσπάθειες να δημιουργηθεί κλωνοποιημένο ζώο μέχρι τότε με την παραπάνω διαδικασία (Gurdon and Byrne, 2003).

Η πρώτη κλωνοποίηση θηλαστικού ζώου έγινε το 1997 από τον Wilmut και τους συνεργάτες του με μεταφορά του πυρηνικού περιεχομένου από εμβρυονική σειρά κυττάρων σε μη γονιμοποιημένο ωάριο ενήλικου προβάτου, όπου γεννήθηκε το πρόβατο Dolly, αποδεικνύοντας έτσι ότι ο πυρήνας των σωματικών κυττάρων περιέχει τα απαραίτητα στοιχεία για τον αναπρογραμματισμό τους (Wilmut *et al.*, 1997). Μετάπειτα έγιναν επιτυχείς κλωνοποιήσεις και σε άλλα είδη θηλαστικών ζώων, όπως σε ποντίκια, αγελάδες, χοίρους και κουνέλια (Gurdon and Byrne, 2003). Επιπρόσθετα οι Hochedlinger και Jaenisch δημιούργησαν μονοκλωνικά ποντίκια με πυρηνική μεταφορά από Β και Τ λεμφοκύτταρα σε δυο βήματα: πρώτα απομόνωσαν εμβρυονικά βλαστοκύτταρα από κλωνοποιημένες βλαστοκύστες και ύστερα έγινε ένεση των κυττάρων αυτών σε τετραπλοϊδικές βλαστοκύστες (Hochedlinger and Jaenisch, 2002).



Πέρα από την παραγωγή εμβρυονικών βλαστοκυττάρων από την έσω κυτταρική μάζα φυσιολογικών εμβρύων, τέτοιου είδους βλαστοκύτταρα μπορούν να παραχθούν και από κλωνοποιημένες βλαστοκύστες. Συγκεκριμένα το 2001 οι Wakayama και οι συνεργάτες του δημιούργησαν εμβρυονικές κυτταρικές σειρές με πυρηνική μεταφορά, τα (nt) ES κύτταρα (nuclear transfer ES cells), από πυρήνες σωματικών κυττάρων ενήλικων ποντικών (Wakayama *et al.*, 2001). Με αυτόν τον τρόπο πιθανώς να ξεπεραστεί το ζήτημα της ανοσιακής απόκρισης και να καθιερωθεί η θεραπευτική κλωνοποίηση αν εφαρμοστεί στον άνθρωπο (Gurdon and Colman, 1999). Το 2005 μια ομάδα από την Κορέα ισχυρίστηκε ότι κατάφερε να δημιουργήσει (nt) ES κύτταρα από το δέρμα ασθενών που έπασχαν από συγγενή υπογαμμασφαιριναιμία, βλάβες του νωτιαίου μυελού και νεανικό σακχαρώδη διαβήτη (Hwang, 2005). Ωστόσο αργότερα αποδείχθηκε ότι τα δεδομένα τους ήταν κατασκευασμένα.

Ένα άλλο θέμα που πρέπει να υπερκεραστεί είναι η ανάγκη για ανθρώπινα μη γονιμοποιημένα ωάρια για τη δημιουργία εμβρυονικών κυττάρων με πυρηνική μεταφορά, το οποίο εγείρει ηθικά και ιατρικά ζητήματα. Το 2007 οι Eglí και οι συνεργάτες του κατάφεραν να δημιουργήσουν πολυδύναμα βλαστοκύτταρα με πυρηνική μεταφορά από σωματικά κύτταρα από δότες σε συνδυασμό με ζυγωτά. Πιο ειδικά έγινε στάση των ζυγωτών των ποντικών στη μίτωση με χρήση φαρμάκου, αφαίρεση χρωμοσωμάτων και αντικατάστασή τους από τα μιτωτικά χρωμοσώματα του δότη. Έτσι έγινε εφικτός ο αναπρογραμματισμός, η δημιουργία εμβρυονικών κυττάρων και η παραγωγή κλωνοποιημένων ζώων, διαδικασία που δεν μπορούσε να γίνει στη μεσόφαση του κυτταρικού κύκλου (Eglí *et al.*, 2007). Με αυτόν τον τρόπο τα έμβρυα που είναι προϊόντα αποβολών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία εμβρυονικών βλαστοκυττάρων με πυρηνική μεταφορά αντί για τα ωοκύτταρα.

### 1.2.2 ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΣΥΝΤΗΞΗ ΜΕ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Ο όρος κυτταρική σύντηξη περιλαμβάνει την ένωση δυο ή παραπάνω κυττάρων ώστε να σχηματιστεί μία οντότητα. Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτή την ένωση μπορεί να

είναι είτε υβρίδια είτε ετεροπύρηνια. Υβρίδια κύτταρα δημιουργούνται αν μετά τη σύντηξη των κυττάρων αυτά πολλαπλασιαστούν. Ο πυρήνας που δημιουργείται είναι τετραπλοειδής, δηλαδή έχει διπλάσιο αριθμό χρωμοσωμάτων από ένα σωματικό κύτταρο. Αντίθετα τα ετεροπύρηνια δεν πολλαπλασιάζονται. Επομένως είναι πολυπύρηνια: οι εκάστοτε πυρήνες παραμένουν ακέραιοι και διακριτοί και δεν χάνεται κανένα χρωμόσωμα (Yamanaka and Blau, 2010).

Έρευνες έχουν δείξει ότι όλα τα γονίδια που απαιτούνται για την δημιουργία ενός ολόκληρου οργανισμού είναι παρόντα σε ένα εξειδικευμένο διαφοροποιημένο κύτταρο (Gurdon, 1962). Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα των θηλαστικών χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα και ότι η διαφοροποίησή τους μπορεί να αναστραφεί μέσω σύντηξής τους με άλλα κύτταρα (Blau, Chiu and Webster, 1983). Επομένως τα πλήρως διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα ανάλογα με το μικροπεριβάλλον και τα κύτταρα με τα οποία ενώνονται αλλάζουν μοτίβο διαφοροποίησης και χρειάζονται συνεχή ρύθμιση (Blau *et al.*, 1985)(Blau and Baltimore, no date). Το 1997 βρέθηκε ότι τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα μπορούν να επάγουν επιγενετικό αναπρογραμματισμό στα σωματικά κύτταρα (Tada *et al.*, 1997). Λίγα χρόνια αργότερα η διαδικασία αυτή φάνηκε ότι μπορεί να επιτευχθεί και με σύντηξη των σωματικών κυττάρων με εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Cowan *et al.*, 2005) (Tada *et al.*, 2001). Με τη διαδικασία αυτή δημιουργήθηκαν τερατώματα αποτελούμενα και από τα τρία βλαστικά δέρματα, αποδεικνύοντας έτσι την πολυδυναμικότητα των κυττάρων αυτών.

Έγιναν αρκετά πειράματα προκειμένου να βρεθεί αν οι παράγοντες που απαιτούνται για τον αναπρογραμματισμό προέρχονται από τον πυρήνα ή βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Οι Do και οι συνεργάτες του για να το αποδείξουν αυτό συνέκριναν τη σύντηξη του πυρήνα εμβρυονικών βλαστοκυττάρων με συστάδα από νευρικά προγονικά κύτταρα (neurosphere cells) με τη σύντηξη του κυτταροπλάσματος εμβρυονικών βλαστοκυττάρων με τα ίδια νευρικά κύτταρα. Το πείραμα έδειξε ότι η ένωση πυρήνα με νευρικά κύτταρα ήταν ικανή να επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα Oct 4, συστατικό στοιχείο της πολυδυναμικότητας των κυττάρων, χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο το κυτταρόπλασμα να αλληλεπιδρά με τον πυρήνα του εμβρυονικού κυττάρου (Do and

Schöler, 2004). Ανάλογο πείραμα διενεργήθη ένα χρόνο αργότερα, όπου έγινε αντικατάσταση του πυρήνα ανθρώπινων εμβρυονικών κυττάρων με πυρήνα σωματικών κυττάρων. Φάνηκε ότι το κυτταρόπλασμα περιέχει τα απαραίτητα στοιχεία για τον αναπρογραμματισμό των κυττάρων, καθώς προκλήθηκε επαγωγή του παράγοντα Oct 4, επιβεβαιώνοντας έτσι την πολυδυναμικότητα προερχόμενη από το κυτταρόπλασμα (Strelchenko *et al.*, no date).

### 1.2.3 ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Είναι γνωστό ότι τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα προερχόμενα από την έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης και ότι από αυτά μπορούν να προκύψουν κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα, απαραίτητα για τον σχηματισμό ενός ολόκληρου οργανισμού. Ωστόσο ομάδα ερευνητών βρήκε ότι πολυδύναμα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα μπορούν να παραχθούν από καλλιέργεια αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (PGC, primordial germ cells). Με συνδυασμό παραγόντων που απαιτούνται και για την ανάπτυξη των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, τα PGCs έχουν τη δυνατότητα διαρκούς πολλαπλασιασμού διαφοροποιημένων κυττάρων σαν να είναι πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στη δημιουργία διαφοροποιημένων κυττάρων σε χίμαιρες, αφού ενεθούν σε βλαστοκύστη (Matsui, Zsebo and Hogan, 1992).

Σε κάθε ιστό υπάρχουν ιστοειδικά βλαστοκύτταρα που ναι μεν πολλαπλασιάζονται στις εκάστοτε κυτταρικές σειρές, αλλά έχουν δε περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα και δεν είναι πολυδύναμα. Μια ομάδα ερευνητών βρήκε ότι κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών, τα επονομαζόμενα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα ενήλικα (MAPCs, multipotent adult progenitor cells), μπορούν να δώσουν γένεση σε κύτταρα προερχόμενα και από τα τρία βλαστικά δέρματα (Jiang *et al.*, 2002). Επιπρόσθετα, τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα προκάλεσαν τη δημιουργία χίμαιρας, μετά από ένεση σε βλαστοκύστη ποντικού και δεν προκάλεσαν τερατώματα μετά από έγχυση σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια.

Ο Shinohara και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι από γαμετικά βλαστοκύτταρα από

όργχεις ποντικών, τα οποία ονόμασαν ολοδύναμα γαμετικά βλαστοκύτταρα (mGS cells, multipotent germ stem cells), μπορούν να δημιουργηθούν πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004). Τα κύτταρα αυτά είναι φαινοτυπικά παρόμοια με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα: διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και δημιουργούν τερατώματα σε ποντίκια. Τα πολυδύναμα γαμετικά κύτταρα έχουν επίσης τη δυνατότητα να δημιουργήσουν χμαιρικά ζώα, μετά από ένεση σε βλαστοκύστη. Βασική διαφορά μεταξύ των πολυδύναμων γαμετικών βλαστοκυττάρων και των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων είναι το διαφορετικό μοτίβο αποτύπωσης, το οποίο μπορεί να προκαλέσει εμβρυονικές ανωμαλίες (Dean *et al.*, 1998). Λόγω του γεγονότος αυτού είναι ακόμα υπό διερεύνηση η χρήση των κυττάρων αυτών.

Η παρθενογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα όν σχηματίζεται από ένα έμβρυο χωρίς την παρουσία σπέρματος. Μια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι μέσω παρθενογένεσης είναι δυνατό από ωάριο πιθήκων να προκύψουν πολυδύναμα βλαστοκύτταρα με ικανότητα διαφοροποίησης (Cibelli, 2002). Ανάλογο πείραμα διεξήχθη και παλαιότερα με παρθενογένεση σε ποντίκια και η αλληλεπίδραση που έχει το φαινόμενο της αποτύπωσης στα γονίδιά τους (Allen *et al.*, 1994). Η παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων με τη διαδικασία της παρθενογένεσης θα μπορούσε δυνητικά να ξεπεράσει το ηθικό εμπόδιο που προκύπτει με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα.

#### 1.2.4 ΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Αρχικά υπήρξε η γνώση ότι τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν επ' άοριστον και να δώσουν γένεση σε έναν ολόκληρο οργανισμό. Ωστόσο εμπόδιο στη χρήση τους είναι αφενός το ηθικό κομμάτι, καθ' όσον εμπλέκει ανθρώπινα έμβρυα, και αφετέρου η πιθανότητα απόρριψης λόγω ανοσολογικής απάντησης (Frankel, 2000) (Drukker *et al.*, 2002). Έτσι δημιουργήθηκε η ανάγκη να παραχθούν πολυδύναμα κύτταρα απευθείας από σωματικά διαφοροποιημένα κύτταρα.

Το 2006 κρίσιμη ήταν η ανακάλυψη τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (Oct3, Sox2, Klf4, C-myc) ικανών να επάγουν τα σωματικά κύτταρα ποντικού σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPS cells) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ένα έτος αργότερα επετεύχθη επαγωγή πολυδύναμων κυττάρων σε ανθρώπινα σωματικά κύτταρα με τη βοήθεια των ίδιων τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (Thomson *et al.*, 1998) (Takahashi *et al.*, 2007). Τα κύτταρα αυτά έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον, καθώς ξεπερνούν το ηθικό δίλημμα των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, μιας και προέρχονται από τον ίδιο ασθενή, αλλά αποτελούν και ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανακάλυψη φαρμάκων και την εξατομικευμένη ιατρική (Huang *et al.*, 2014) (de Almeida *et al.*, 2014).

Με βάση τις παραπάνω μελέτες θεωρήθηκε πιθανό ότι παράγοντες που διατηρούν τη δυναμικότητα στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και στην επαγωγή των σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα (Takahashi and Yamanaka, 2006). Αρχικά εξετάστηκαν 24 γονίδια ως παράγοντες που θα μπορούσαν να επάγουν τα σωματικά κύτταρα σε πολυδύναμα. Με συνδυασμούς των υποψήφιων γονιδίων αναζητήθηκαν κλώνοι που να είναι μορφολογικά παρόμοιοι με τα εμβρυονικά κύτταρα, δηλαδή στρόγγυλο σχήμα, ευμεγέθη πυρήνια και λιγοστό κυτταρόπλασμα. Τελικά με την εισαγωγή τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (Oct3, Sox2, Klf4, C-myc), μέσω ρετροϊού σε ινοβλάστες ποντικών, βρέθηκαν τέσσερις κλώνοι που έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα εμβρυονικά κύτταρα, δηλαδή ομοιότητες στη μορφολογία, στον πολλαπλασιασμό και στην ικανότητα σχηματισμού τερατώματος (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Ωστόσο από περαιτέρω έλεγχο διαπιστώθηκε ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι όμοια αλλά όχι πανομοιότυπα με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα. Με βάση τις επιγενετικές αλλαγές στις δυο κατηγορίες κυττάρων βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων εμβρυονικής προέλευσης εκφράζονται στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα αλλά όχι όλα στο σύνολο τους (Mitsui *et al.*, 2003).

Τρεις ομάδες ερευνητών έκαναν πρόοδο όσον αφορά την προσπάθεια δημιουργίας πολυδύναμων βλαστοκυττάρων με την εισαγωγή ενός νέου παράγοντα, του Nanog. Συγκεκριμένα μια ομάδα ανακάλυψε ότι τα επαγόμενα από τον παράγοντα Nanog

πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) έχουν πιο πολλές ομοιότητες με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα όσον αφορά την γονιδιακή έκφραση, τη μορφολογία, την ικανότητα σχηματισμού τερατώματος και τον σχηματισμό ενήλικων χμαιρών από ότι τα iPSCs των Takahashi και Yamanaka (Okita, Ichisaka and Yamanaka, 2007). Με αυτόν τον δείκτη φάνηκε ότι το επιγενετικό προφίλ και η βιολογική ικανότητα των επαγόμενων βλαστοκυττάρων τα καθιστά δυσδιάκριτα από τα ανάλογα χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (Wernig *et al.*, 2007). Ο Maherali και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι θηλυκά Nanog iPSCs έχουν την ικανότητα επανενεργοποίησης X χρωμοσώματος που πριν ήταν ανενεργό λόγω τυχαίας απενεργοποίησης κατά τη διαφοροποίηση, γεγονός που δείχνει ότι η επιγενετική ανακατάταξη μπορεί να επαχθεί από αναπρογραμματισμό με καθορισμένους παράγοντες (Maherali *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.1 ΟΙ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες μελετήθηκαν προτού καταλήξουν στους τέσσερις παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων. Οι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες που είναι ικανοί να επάγουν πολυδυναμικότητα σε βλαστοκύτταρα είναι οι Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4, που αργότερα μετονομάστηκαν σε παράγοντες Yamanaka (Yamanaka factors), προς τιμήν του επιστήμονα.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct3/4, πρωτεΐνη της οικογένειας Oct, εκφράζεται στα θηλυκά γεννητικά κύτταρα, στα έμβρυα και στα παντοδύναμα (totipotent) και πολυδύναμα (pluripotent) βλαστοκύτταρα (Rosner *et al.*, 1990) (Yamanaka, 2007). Αποτελεί συστατικό στοιχείο για τον αρχικό σχηματισμό και τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας στα έμβρυα (Schöler *et al.*, 1990). Συγκεκριμένα, αν αυξηθεί η έκφραση του παράγοντα αυτού, προκαλείται διαφοροποίηση του θηλαστικού εμβρύου σε ενδόδερμα και μεσόδερμα, ενώ καταστολή του Oct3/4 επάγει απώλεια πολυδυναμικότητας και τελικά μετατροπή σε τροφοεξώδερμα στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο (Zaehres *et al.*, 2005) (Nichols *et al.*, 1998) (Niwa, Miyazaki and Smith, 2000). Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την αξία αυτού του παράγοντα στην διατήρηση και προώθηση της πολυδυναμικότητας.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2, μέλος της οικογένειας Sox (SRY-related box), εκφράζεται στην έσω κυτταρική μάζα, στην επιβλάστη, στα γεννητικά κύτταρα αλλά και στα πολυδύναμα κύτταρα προερχόμενα από το εξωεμβρυονικό εξώδερμα σε αντίθεση με τον παράγοντα Oct3/4 (Avilion *et al.*, 2003). Απαλοιφή του Sox2 στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα προκαλεί διαφοροποίηση στο τροφοεξώδερμα (Masui *et al.*, 2007). Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η απαλοιφή αυτή διασώζεται από την έκφραση του παράγοντα Oct3/4 (Masui *et al.*, 2007). Τα παραπάνω υποδεικνύουν το ρόλο του παράγοντα Sox2 στην διατήρηση της πολυδυναμικότητας των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων μέσω της ρύθμισης έκφρασης του παράγοντα Oct3/4. Επομένως ο παράγοντας αυτός συμβάλλει στο σχηματισμό των τριών βλαστικών δερμάτων κατά την εμφύτευση της βλαστοκύστης σε συνεργασία με τον παράγοντα Oct3/4.

Άλλος παράγοντας ικανός να διατηρήσει την αυτοανανεωτική ικανότητα των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων είναι ο παράγοντας Nanog: απουσία αυτού του παράγοντα, εμβρυονικά βλαστοκύτταρα έχασαν την πολυδυναμικότητα τους και διαφοροποιήθηκαν σε εξωεμβρυονικές δομές (Mitsui *et al.*, 2003). Παρ' όλα αυτά, ο παράγοντας αυτός αποδείχθηκε περιττός για την επαγωγή πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Μεταξύ άλλων μελετήθηκαν και γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση των όγκων, όπως οι c-Myc και Klf4. Ο c-Myc συγκεκριμένα, ένα από τα πρώτα πρωτοογκογονίδια που βρέθηκε σε ανθρώπινους καρκίνους, προκαλεί μακροχρόνια διατήρηση της πολυδυναμικότητας και αυτοανανέωση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων σε καλλιέργεια (Cartwright *et al.*, 2005). Άξιο αναφοράς είναι ότι ο παράγοντας c-Myc επάγει ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 σε κατάλοιπα λυσίνης (Fernandez *et al.*, 2003). Οι ιστόνες αυτές αποτελούν δυο από τις πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες τυλίγεται το DNA κατά το πρώτο στάδιο συσκευασίας του στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Luger *et al.*, 1997). Η ακετυλίωση των ιστονών αποτελεί σημείο κλειδί στον μεταγραφικό έλεγχο και μηχανισμό επιγενετικής τροποποίησης στα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως θα αναλύσουμε σε επόμενο κεφάλαιο. Επιπλέον, μέσω της ακετυλίωσης που επάγει αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας, οδηγεί σε ενεργοποίηση γονιδίων και επιτρέπει την σύνδεση και ενεργοποίηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως του

Oct3/4 και Sox2 (Frank *et al.*, 2001) (Boyer *et al.*, 2005).

Τέταρτος παράγοντας σημαντικός για την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων είναι ο παράγοντας Klf4. Υπερεκφραζόμενος συντελεί στην αυτοανανέωση των κυττάρων σε εμβρυονικά βλαστοκύτταρα ποντικών, τα οποία μάλιστα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα και τον παράγοντα Oct4 (Li *et al.*, 2005). Από την άλλη πλευρά, ποντίκια με απαλοιφή του παράγοντα δεν εμφάνισαν ανωμαλίες στον πληθυσμό των πολυδύναμων κυττάρων κατά την εμβρυογένεση, αποδεικνύοντας έτσι ότι ο παράγοντας Klf4 είναι ουσιώδης για την διατήρηση της πολυδυναμικότητας (Nakatake *et al.*, 2006). Σε συνάρτηση με τα παραπάνω βρέθηκε ότι ο παράγοντας αυτός συνεργάζεται με τους παράγοντες Oct3/4 και Sox2 και μάλιστα βρίσκεται υπό τον έλεγχο του Oct3/4 (Nakatake *et al.*, 2006).

### 1.3 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΤΩΝ TAKAHASHI ΚΑΙ YAMANAKA ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο αναπρογραμματισμός διαφοροποιημένων κυττάρων μπορούσε να επιτευχθεί είτε με σύντηξη με εμβρυονικά βλαστοκύτταρα είτε με μεταφορά πυρηνικού περιεχομένου σε ωοκύτταρα (Wilmut *et al.*, 1997) (Tada *et al.*, 2001). Ωστόσο στην εργασία που παρουσίασαν οι ερευνητές Takahashi και Yamanaka το 2006 απέδειξαν ότι μπορεί να γίνει επαγωγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων από ινοβλάστες ποντικού ή ενήλικα ανθρώπου με την εισαγωγή τεσσάρων παραγόντων, Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Τα κύτταρα αυτά τα μετονόμασαν σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν κάποιες ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, το οποίο και θα αναλύσουμε παρακάτω.

Τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα διακατέχονται από κάποιες ιδιότητες, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για την αντιμετώπιση αρκετών ασθενειών, όπως ο νεανικός σακχαρώδης διαβήτης και η νόσος του Parkinson (Thomson *et al.*, 1998). Τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται επ' αόριστον, ενόσω διατηρούν



την πολυδυναμικότητά τους και να διαφοροποιούνται και στα τρία βλαστικά δέρματα (Evans and Kaufman, 1981). Όμως τίθενται κάποια ηθικά ζητήματα όσον αφορά την εφαρμογή τους, διότι η πηγή τέτοιων βλαστοκυττάρων προέρχεται από τα έμβρυα των ανθρώπων και επιπλέον υπάρχει και ο κίνδυνος ανοσιακής απόκρισης μετά από εμφύτευση στον ασθενή (Frankel, 2000). Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία πολυδύναμων κυττάρων απευθείας από τα κύτταρα του ίδιου του ασθενή.

Προτού καταλήξουν στους τέσσερις υπεύθυνους μεταγραφικούς παράγοντες για την επαγωγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων, υπήρξε η γνώση για το ποιοι παράγοντες διατηρούν την πολυδυναμικότητα στα έμβρυα και στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα και ποιοι παράγοντες συνεισφέρουν στον ταχύ πολλαπλασιασμό των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων σε καλλιέργεια. Οι παράγοντες που είναι κρίσιμοι για την διατήρηση της πολυδυναμικότητας είναι οι Oct3/4, Sox2 και Nanog, ενώ για τον πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων υπεύθυνοι είναι οι παράγοντες που σχετίζονται και με όγκους όπως οι c-Myc, Klf4 και Stat3 (Nichols *et al.*, 1998) (Avilion *et al.*, 2003) (Mitsui *et al.*, 2003) (Cartwright *et al.*, 2005) (Li *et al.*, 2005) (Niwa *et al.*, 1998). Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα, εξέτασαν κατά πόσο αυτοί οι παράγοντες ή ο συνδυασμός τους μπορούν να επάγουν τους υπό μελέτη ινοβλάστες σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα.

Αρχικά έγινε επιλογή 24 γονιδίων ως υποψήφια για μεταγραφικοί παράγοντες που να επάγουν πολυδυναμικότητα σε σωματικά κύτταρα. Η επιλογή έγινε με την υπόθεση ότι οι ίδιοι παράγοντες παίζουν ζωτικό ρόλο στην ταυτότητα των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (Takahashi and Yamanaka, 2006). Μια πρώτη παρατήρηση, μετά από εισαγωγή ενός και μόνο παράγοντα σε ινοβλάστες ποντικού, ήταν ότι δεν ευρέθη μια αποικία κυττάρων που να έχει τη μορφολογία των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, αποδεικνύοντας έτσι ότι δεν αρκεί ένας και μόνο παράγοντας για τη δημιουργία των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων.

Αντίθετα, με την ταυτόχρονη εισαγωγή και των 24 υποψήφιων γονιδίων στους ινοβλάστες, προέκυψαν αποικίες κυττάρων με μορφολογία ανάλογη με αυτή των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, δηλαδή στρόγγυλο σχήμα κυττάρων, μεγάλα πυρήνια και ελάχιστο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον με τον συνδυασμό τεσσάρων συγκεκριμένων

παραγόντων από τους 24 υποψήφιους, μπορούσε να γίνει έκφραση κυτταρικών δεικτών ειδικών για τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα σε καλλιέργεια ινοβλαστών. Οι τέσσερις αυτοί παράγοντες, που είναι οι Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4, φάνηκε ότι μπορούν δημιουργήσουν πολυδύναμα βλαστοκύτταρα από ινοβλάστες ποντικού.

Προτού εξαχθεί το οριστικό συμπέρασμα ότι αυτοί οι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να επάγουν πολυδυναμικότητα σε σωματικά κύτταρα, εξετάστηκε το ενδεχόμενο αφαίρεσης ενός από τους τέσσερις βασικούς παράγοντες από τις αποικίες των κυττάρων. Σε απώλεια των Oct3/4 και Klf4 ξεχωριστά δεν σχηματίστηκαν οι επιθυμητές αποικίες, χωρίς το παράγοντα Sox2 υπήρξαν ελάχιστες αποικίες ενώ με αφαίρεση του c-Myc δημιουργήθηκαν μεν αποικίες, αλλά δεν είχαν δε τη μορφολογία των εμβρυονικών κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά κατέδειξαν τον ζωτικό ρόλο και των τεσσάρων παραγόντων για τη δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPS cells ) από σωματικά κύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Συνδυασμός δυο μόνο παραγόντων επίσης δεν ήταν ικανός να δημιουργήσει κλώνους παρόμοιους με κλώνους εμβρυονικών κυττάρων. Οι συνδυασμοί τριών παραγόντων Oct3/4, Sox2, c-Myc (χωρίς τον παράγοντα Klf4) και Klf4, Sox2, c-Myc (χωρίς τον παράγοντα Oct3/4) οδήγησαν στη δημιουργία αποικιών οι οποίες όμως δεν μπόρεσαν να διατηρηθούν στην καλλιέργεια. Τέλος, οι συνδυασμοί Oct3/4, Sox2, Klf4 (χωρίς τον παράγοντα c-Myc) και Oct3/4, Klf4, c-Myc (χωρίς τον παράγοντα Sox2) μπορεί να είχαν σχηματισμό αποικιών, αλλά δεν είχαν την επιθυμητή μορφολογία των εμβρυονικών κυττάρων (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Από περαιτέρω έλεγχο διαπιστώθηκε ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι όμοια αλλά όχι πανομοιότυπα με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα. Απόδειξη αυτής της διαπίστωσης είναι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των κυτταρικών δεικτών των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων εκφράζονται στα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, αλλά όχι όλοι στο σύνολο τους. Επιπλέον με βάση τις επιγενετικές αλλαγές στις δυο κατηγορίες κυττάρων βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων εμβρυονικής προέλευσης εκφράζονται στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα αλλά όχι όλα στο σύνολο τους (Mitsui *et al.*, 2003).

Όπως προηγουμένως αναφέραμε, ένα από τα χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων είναι η πολυδυναμικότητα, η ικανότητα δηλαδή αυτών των κυττάρων να διαφοροποιούνται και στα τρία βλαστικά δέρματα. Επομένως η ιδιότητα αυτή στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα έπρεπε να επιβεβαιωθεί. Η πολυδυναμικότητα αποδείχθηκε από τον σχηματισμό τερατώματος, ενός όγκου που περιέχει κύτταρα και από τα τρία βλαστικά δέρματα, δηλαδή από το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα.

Εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι οι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4 είναι αυτοί που επάγουν πολυδυναμικότητα σε καλλιέργειες ινοβλαστών ποντικού, έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων αυτών και των προϊόντων τους. Μέσω της Real-time PCR βρέθηκε ότι η συνολική έκφραση και των τεσσάρων παραγόντων υπερέιχε την έκφραση των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, όμως η έκφραση των παραγόντων Oct3/4 και Sox2 ήταν χαμηλότερη στα επαγόμενα βλαστοκύτταρα από ότι στα εμβρυονικά. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, με την ανάλυση Western blot φάνηκε ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα των τεσσάρων παραγόντων στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι συγκρίσιμα με αυτά των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων.

Τέλος οι ερευνητές απέκλεισαν το ενδεχόμενο ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) προέρχονται από επιμόλυνση προϋπαρχόντων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων με δυο τρόπους: πρώτον από Southern blot ανάλυση βρέθηκε ότι σε κάθε iPSCs κλώνο το γονιδίωμα του κάθε μεταγραφικού παράγοντα ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των τελικά επαγόμενων κυττάρων με διαφορετικό τρόπο, δηλαδή ο κάθε iPSCs κλώνος έχει δικό του μοναδικό διαγονιδιακό μοτίβο, και δεύτερον τα δυο είδη κυττάρων έχουν διαφορετικό μοτίβο γονιδιακής έκφρασης. Και εφόσον οι υπόκλωνοι των iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν και στα τρία βλαστικά δέρματα, έτσι επιβεβαιώνεται και η κλωνική προέλευση των iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Συμπερασματικά, η έρευνα κατέδειξε ότι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4 είναι ουσιώδους σημασίας για την επαγωγή πολυδυναμικότητας σε σωματικά κύτταρα. Αναλυτικότερα οι δυο πρώτοι παράγοντες είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας, ενώ οι δυο ογκοσχετιζόμενοι παράγοντες φάνηκε ότι

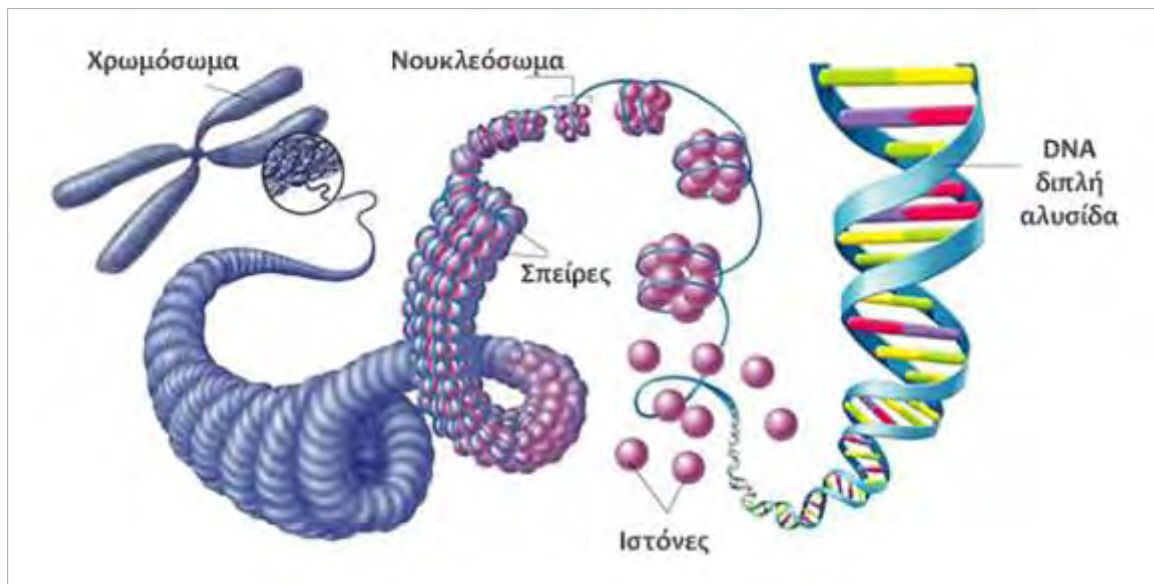
πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία προκειμένου να δημιουργηθούν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Συγκεκριμένα ο παράγοντας Klf4 αναστέλλει την επαγόμενη από τον παράγοντα c-Myc απόπτωση μέσω καταστολής του p53 (Zindy *et al.*, 1998). Από την άλλη μεριά ο c-Myc αναστέλλει την αντιπολλαπλασιαστική (antiproliferative) ικανότητα του Klf4 (Seoane, Le and Massagué, 2002).

Χάρη στην αποκτηθείσα γνώση για τον μηχανισμό επαγωγής των διαφοροποιημένων κυττάρων, την τελευταία δεκαετία ερευνητές έχουν καταφέρει τη δημιουργία ανθρώπινων επαγόμενων βλαστοκυττάρων από πληθώρα σωματικών κυττάρων, όπως από ερυθρά αιμοσφαίρια ή από κύτταρα του αμφιβληστροειδούς με τους παράγοντες Yamanaka (Mandai *et al.*, 2017). Μάλιστα, τα ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν πλέον να αναπτυχθούν σε πιο απλοποιημένες καλλιέργειες με λιγότερες κυτταροκίνες (Bernecker *et al.*, 2019). Αρκετά είναι τα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν για την ακριβή φύση των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων, ιδιαίτερα όσον αφορά το ρόλο της επιγενετικής, η οποία φαίνεται να συντελεί στο γεγονός ότι τα iPSCs δεν είναι ταυτόσημα με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το 1952 βρέθηκε από πείραμα των Hershey και Chase, με τη βοήθεια φάγων, ότι ο φορέας της γενετικής πληροφορίας είναι το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ, το DNA (Hershey and Chase, 1952). Η ροή της γενετικής πληροφορίας ξεκινά από το DNA το οποίο πρώτα μεταγράφεται και μετά μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Μέσω της μεταγραφής το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να «διαβάσει» τις οδηγίες από συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, δηλαδή από τα γονίδια, ενώ μέσω της μετάφρασης μπορεί να μεταφράσει αυτήν την πληροφορία σε λειτουργική πρωτεΐνη ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου (Alberts *et al.*, 2002). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA, λόγω του μεγάλου μήκους του συγκριτικά με τον πυρήνα στον οποίο περιέχεται, οργανώνεται μαζί με ομάδες πρωτεϊνών σε μια δομή που ονομάζεται χρωματίνη. Η χρωματίνη αποτελείται από την ευχρωματίνη, που είναι μεταγραφικά ενεργή και με πιο χαλαρή δομή χρωματίνης και από την ετεροχρωματίνη, η οποία περιέχει γονίδια που δεν μεταγράφονται και έχει πιο συμπαγή δομή (Patterson and Wolffe, 1996).



Εικόνα 6: Οργάνωση του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα

© [biomodderfied.weebly.com](http://biomodderfied.weebly.com)

Οι πρωτεΐνες με τις οποίες συσκευάζεται το DNA ονομάζονται ιστόνες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες με θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Το σύμπλοκο DNA μαζί με τις ιστόνες δημιουργεί το νουκλεοσωμάτιο, το οποίο και αποτελεί το πρώτο επίπεδο συσκευασίας της χρωματίνης [Εικόνα 6]. Ο πυρήνας του νουκλεοσωματίου αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό οκταμερές ιστονών με τέσσερις ιστόνες H2A, H2B, H3, και H4, όπου από γύρω του τυλίγονται 146 ζεύγη βάσεων DNA. Τα νουκλεοσωμάτια συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό DNA και την ιστόνη H1 και με αυτόν τον τρόπο το DNA συσπειρώνεται ακόμα περισσότερο (Meshorer *et al.*, 2006). Έτσι ανάλογα με τη δομή της χρωματίνης και την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών, υπάρχουν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και κατ' επέκταση και στο φαινότυπο των κυττάρων.

Η επιγενετική μελετάει τις τροποποιήσεις σε επίπεδο γονιδίων ή μεταξύ αλληλεπιδράσεων γονιδίων με πρωτεΐνες χωρίς να υπάρχει αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Ο ορισμός αυτός χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Άγγλο εμβρυολόγο Waddington το 1940, ο οποίος μελέτησε την επίδραση των γονιδίων και των προϊόντων τους στην εξωτερική εμφάνιση ενός οργανισμού, δηλαδή στον φαινότυπο (Waddington, 1940). Σε κάθε στάδιο ανάπτυξης είναι διαφορετικές οι ανάγκες του εκάστοτε κυτταρικού τύπου και ως εκ τούτου και του οργανισμού. Επομένως και ο φαινότυπος είναι διαφορετικός επειδή εκφράζονται διαφορετικά γονίδια ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης. Δηλαδή ενώ ένας οργανισμός έχει το ίδιο γονιδίωμα, λόγω επιγενετικής είναι διαφορετική η γονιδιακή έκφραση στη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού, ανταποκρινόμενη κάθε φορά στις ανάγκες του.

Με την πάροδο των ετών βρέθηκαν οι πιθανοί τρόποι επιγενετικής τροποποίησης τόσο στο DNA όσο και στις πρωτεΐνες που συνδέονται άμεσα μαζί του στον πυρήνα, δηλαδή τις ιστόνες. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι αυτές που καθορίζουν αν ένα γονίδιο εκφράζεται σε έναν συγκεκριμένο ιστό ή όχι (Rogers and Fridovich-Keil, 2018).

## 2.2 ΕΙΔΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

Όλα τα κύτταρα ενός ανθρώπινου οργανισμού περιέχουν το ίδιο DNA και κατά συνέπεια και τα ίδια γονίδια. Ωστόσο τα διαφορετικά κύτταρα επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες

εξ' αιτίας της επιλεγμένης έκφρασης των γονιδίων. Για αυτήν την εξειδικευμένη λειτουργία των κυττάρων, αναγκαία είναι η γονιδιακή ρύθμιση που να ελέγχει ποια γονίδια ενεργοποιούνται και ποια απενεργοποιούνται.

Η γονιδιακή ρύθμιση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς περιλαμβάνει μεταβολές στη δομή της χρωματίνης και επομένως και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη συσπείρωση του DNA. Ο επιγενετικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνεται κυρίως με δυο τρόπους: με τροποποίηση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαδικασία συσκευασίας του DNA σε χρωματίνη, ή με χημική τροποποίηση του ίδιου του DNA (Qiu, 2006).

### 2.2.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι ιστόνες βρίσκονται στον πυρήνα του νουκλεοσωματίου και συντελούν στη συσκευασία του DNA. Παρά το γεγονός ότι το κεντρικό τμήμα των ιστονών σχηματίζει το νουκλεοσωμάτιο, το περιφερικό άκρο αυτών των πρωτεϊνών ονομάζεται ουρά ιστονών και προεξέχει, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα για μεταβολές στις ιστόνες.

Η δυναμική δομή της χρωματίνης είναι που καθιστά το DNA προσβάσιμο σε μεταβολές. Τέσσερις είναι οι μηχανισμοί που τροποποιούν τη χρωματίνη, οι οποίοι φαίνεται πως δρουν συνεργικά παρά ενιαία: (i) πρωτεϊνικά σύμπλοκα που εξαρτώνται από το ATP, τα οποία χρησιμοποιώντας την ενέργεια του ATP μέσω υδρόλυσης, καταλύουν την ολίσθηση του DNA και έτσι αλλάζουν την αλληλεπίδραση των ινιδίων χρωματίνης με τις ιστόνες, (ii) ανάλογα ιστονών με ξεχωριστές ιδιότητες από τις ιστόνες, τα οποία δημιουργούν ειδικά πεδία μέσα στα ινίδια χρωματίνης, (iii) πρωτεΐνες-συνοδοί ιστονών (chaperones), τα οποία ελέγχουν το απόθεμα ελεύθερων ιστονών και βοηθούν στην εναπόθεση ή απομάκρυνσή τους και (iv) μετα-μεταφραστική τροποποίηση ιστονών, όπως είναι η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικουιτίνωση ιστονών. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατά κύριο λόγο συμβαίνουν στα προσιτά άκρα των ιστονών και διευκολύνουν την αγκυροβόληση πρωτεϊνών ειδικών για την χρωματίνη, με σκοπό να τροποποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις ιστονών με DNA

(Alberts *et al.*, 2002). Οι τροποποιήσεις αυτές είναι αναγκαίες για τις διάφορες βιολογικές λειτουργίες του DNA και απαιτούν οργάνωση την συστημάτων που είναι απαραίτητα για το ξετύλιγμα του γονιδιώματος. Αυτές οι αλλαγές στο DNA αναφέρονται ως «κώδικας ιστονών» και είναι ουσιαστικά το πρότυπο των χημικών τροποποιήσεων που κατ' επέκταση καθορίζει ποιες περιοχές στο DNA θα εκφραστούν σε δεδομένη χρονική στιγμή (Kouzarides, 2007).

Ο σκοπός της τροποποίησης των ιστονών είναι διττός: να εγκατασταθεί μια συγκεκριμένη δομή στην χρωματίνη και να επιτελεστούν οι βιολογικές λειτουργίες στο DNA. Πρώτον οι τροποποιήσεις αυτές διαχωρίζουν το DNA σε περιοχές όπου είναι προσιτό για μεταγραφή, δηλαδή στην ευχρωματίνη και σε περιοχές όπου το DNA δεν είναι προσιτό για μεταγραφή, στην ετεροχρωματίνη. Δεύτερον οι τροποποιήσεις διευκολύνουν το ξετύλιγμα της χρωματίνης προκειμένου να επιτελεστούν βιολογικές λειτουργίες, είτε σε τοπικό επίπεδο, όπως η μεταγραφή και η επιδιόρθωση του DNA, είτε σε πιο ευρύ επίπεδο, όπως η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Όλες αυτές οι διεργασίες απαιτούν οργάνωση και συγχρονισμό ώστε να ξετυλιχθεί το DNA, να γίνει η σωστή διαχείρισή του και να έλθει η χρωματίνη στην επιθυμητή κατάσταση, όπως υπαγορεύεται από τον κώδικα ιστονών (Kouzarides, 2007).

Η τροποποίηση των ιστονών, πέρα από τη ρύθμιση της μεταγραφής, σχετίζεται και με άλλες βιολογικές διαδικασίες, όπως με την διαφοροποίηση των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα κατέχουν δυο ιδιότητες που τα κάνουν ξεχωριστά από τα υπόλοιπα είδη κυττάρων: απεριόριστη αυτοανανέωση και διαφοροποίηση σε οποιοδήποτε από τα τρία βλαστικά δέρματα. Από την τελευταία ικανότητα φαίνεται πως το γονιδίωμα τους δεν είναι ακόμα καθορισμένο και χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα. Η υπερδυναμικότητα των πρωτεϊνών της χρωματίνης αποτελεί ορόσημο πολυδυναμικότητας (Meshorer *et al.*, 2006). Η πλαστικότητα αυτή των πρωτεϊνών προσδίδει στις ιστόνες μια πιο χαλαρή δομή και κατά συνέπεια συνεισφέρει στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας. Συγκεκριμένα οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτες επιγενετικής και να προσελκύσουν παράγοντες που στοχεύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA στα βλαστοκύτταρα και έτσι να επηρεάζουν τη μοίρα ενός κυττάρου (Torres-Padilla *et al.*,



2007). Επομένως οι τροποποιήσεις ιστονών παίζουν ζωτικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στον αναπρογραμματισμό τους. Παρακάτω θα αναλυθούν οι τέσσερις κύριοι μηχανισμοί τροποποίησης ιστονών, δηλαδή η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικουιτίνωση των ιστονών με τα συναφή ένζυμά τους.

#### 2.2.1.1 ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Η ακετυλίωση των ιστονών είναι τροποποίηση όπου προστίθεται μια ακετυλομάδα σε κατάλοιπα λυσίνης στα αμινοτελικά άκρα στις ουρές των ιστονών, που προεξέχουν από τον πυρήνα του οκταμερούς του νουκλεοσώματος. Με την ακετυλίωση εξουδετερώνεται το θετικό φορτίο της λυσίνης, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αλληλεπίδραση του DNA με τις ιστόνες, σχηματίζοντας έτσι μια πιο «ανοιχτή» δομή χρωματίνης (Shahbazian and Grunstein, 2007). Γενικώς η ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 σχετίζεται με προώθηση της μεταγραφής και ενεργοποίηση γονιδίων, ενώ η αποακετυλίωση σχετίζεται με συσπειρωμένη δομή χρωματίνης και απενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Fry and Peterson, 2001). Η διαδικασία αυτή καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών (HATs) και η τροποποίηση αυτή μπορεί να αναστραφεί από το ένζυμο αποακετυλάση των ιστονών (HDACs). Οπότε η ισορροπία μεταξύ της δράσης των HAT και HDAC ρυθμίζει τα επίπεδα ακετυλίωσης και κατ' επέκταση ρυθμίζει και τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Επομένως η ακετυλίωση των ιστονών πέρα από μεταφραστική τροποποίηση, αποτελεί και κομμάτι της επιγενετικής όπου μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης επιτυγχάνεται η γονιδιακή ρύθμιση (Bhaumik, Smith and Shilatifard, 2007).

#### 2.2.1.2 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Η μεθυλίωση των ιστονών γίνεται με προσθήκη μεθυλομάδας σε κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης στα αμινοτελικά άκρα στην ουρά των ιστονών H3 και H4 (Kouzarides, 2007). Υπάρχουν τουλάχιστον πέντε πιθανές θέσεις μεθυλίωσης λυσίνης στην ιστόνη H3 (K4, K9, K27, K36, K79) και μία θέση στην ιστόνη H4 (K20) (Kimura *et al.*, 2004). Από

αυτές οι λυσίνες H3-K4, H3-K9 και H3-K27 είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ως δείκτες επιγενετικής. Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση της H3-K4 σχετίζεται με ενεργό χρωματίνη, ενώ αντίθετα η μεθυλίωση της H3-K9 συνεπάγεται με ανενεργό μορφή χρωματίνης, την ετεροχρωματίνη (Lachner, O'Sullivan and Jenuwein, 2003). Η μεθυλίωση της H3-K27 αποτελεί επιγενετικό δείκτη και είναι χαρακτηριστικό στοιχείο για την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος στα σωματικά κύτταρα των θηλυκών θηλαστικών (Plath *et al.*, 2003). Οι αμινοτελικές άκρες της ουράς των ιστονών H3 και H4 στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς επιδέχονται τρία είδη μεθυλίωσης: μονο-, δι- και τριμεθυλίωση. Στην ιστόνη H3-K4 η διμεθυλίωση προσφέρει ένα μεταγραφικά «επιτρεπτό» περιβάλλον χρωματίνης που είναι ικανό έπειτα να μετατραπεί σε πλήρως ενεργή χρωματίνη, ενώ η τριμεθυλίωση της H3-K4 διαμορφώνει έτσι τη δομή της χρωματίνης, ώστε επισφραγίζει την πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Η μεθυλίωση των ιστονών καταλύεται από τα ένζυμα μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs), τα οποία είναι πιο ειδικά στις ιστόνες- στόχους από ότι οι ακετυλοτρανσφεράσες (HATs). Συμπερασματικά η μεθυλίωση ανάλογα με την ιστόνη-στόχο επιφέρει μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή χρωματίνη, ενώ και ο βαθμός μεθυλίωσης μπορεί να προκαλέσει αναδιαμόρφωση της χρωματίνης που είναι προαπαιτούμενο για τον αναπρογραμματισμό του σωματικού γονιδιώματος.

#### 2.2.1.3 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Η προσθήκη φωσφορικής ομάδας μπορεί να συμβεί σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης και στις τέσσερις αμινοτελικές ουρές των ιστονών. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από πρωτεϊνικές κινάσες και η αποφωσφορυλίωση επιτυγχάνεται με τις φωσφατάσες. Η φωσφορυλίωση αποτελεί μέρος της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης και κομμάτι του κώδικα των ιστονών που υπαγορεύει ποιες τροποποιήσεις θα γίνουν σε καθορισμένη περιοχή του γονιδιώματος (Rossetto, Avvakumov and Côté, 2012).

#### 2.2.1.4 ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Η ουβικουιτίνη είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες, συναντάται κυρίως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελείται από τρία τμήματα, το E1, το E2 και το E3. Το E1 είναι το ένζυμο που ενεργοποιεί την ουβικουιτίνη (ubiquitin activating enzyme), το E2 τμήμα είναι το ένζυμο που μεταφέρει την ουβικουιτίνη στον στόχο της (ubiquitin conjugating enzyme) και το E3 αποτελεί το ένζυμο που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη-στόχο και την ουβικουιτινώνει (ubiquitin ligase). Ενώ το ίδιο ένζυμο E1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση όλων των πρωτεϊνών-στόχων, διαφορετικά ένζυμα E2 απαιτούνται για την ουβικουιτίνωση διαφορετικών υποστρωμάτων και η παρουσία του E3 ενζύμου παρέχει την ειδικότητα στην πρωτεΐνη-στόχο (Shilatifard, 2006).

Η ουβικουιτίνωση των ιστονών μπορεί να συμβεί στις ιστόνες H2 και H3 και βρέθηκε μάλιστα ότι η ουβικουιτίνωση αποτελεί προαπαιτούμενο για τη μεθυλίωση των ιστονών (Dover *et al.*, 2002). Δηλαδή τυχόν μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, προκαλούν απώλεια τόσο στην ουβικουιτίνωση όσο και στη μεθυλίωση των ιστονών. Φαίνεται επομένως ότι υπάρχει μια διασταυρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο τροποποιήσεων (histone crosstalk) (Bhaumik, Smith and Shilatifard, 2007).

### 2.2.2 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA

Τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού είναι μεν γενετικά ίδια αλλά λειτουργικά είναι ετερογενή λόγω της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων τους. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται στην επιγενετική, δηλαδή αλλαγές στον φαινότυπο χωρίς να εμπλέκονται μεταλλάξεις στο DNA (Jaenisch and Bird, 2003). Οι μηχανισμοί που επάγουν το φαινόμενο της επιγενετικής σε επίπεδο χρωματίνης είναι οι τροποποιήσεις στην ουρά των ιστονών, ενώ σε επίπεδο DNA είναι η μεθυλίωση σε κατάλοιπα κυτοσίνης.

Η μεθυλίωση του DNA είναι τμήμα της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συμβαίνει κυρίως σε κατάλοιπα κυτοσίνης. Η προσθήκη μιας μεθυλομάδας στο 5' άνθρακα της κυτοσίνης, η επονομαζόμενη 5-μεθυλκυτοσίνη, αποτελεί επιγενετικό δείκτη με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των θηλαστικών και στη διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό (Kim and Costello, 2017).

Στα σπονδυλωτά η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει σε κατάλοιπα κυτοσίνης (C) που βρίσκονται συνήθως σαν διουκλεοτίδια CpG με την γουανίνη (G), αν και στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα η μεθυλίωση μπορεί να συμβεί και σε μη CpG περιοχές (Ramsahoye *et al.*, 2000). Από τις περίπου 29 εκατομμύρια CpG περιοχές, το 70% είναι μεθυλιωμένο και περί το 7% των CpGs είναι συγκεντρωμένα σε νησίδα CpG (CpG islands), τα οποία είναι περιοχές με υψηλή συγκέντρωση από τις βάσεις κυτοσίνη και γουανίνη (Lister *et al.*, 2009). Συνολικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περί τα 28.000 CpG νησίδα, που συνήθως εντοπίζονται στο 5' άκρο πολλών ανθρώπινων γονιδίων, που ονομάζονται υποκινητές (Bird, 2002). Η πλειοψηφία των γονιδίων περιέχουν στους υποκινητές τους τα CpG νησίδα, τα οποία είναι συνήθως μη μεθυλιωμένα (Smith and Meissner, 2013). Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από τα ένζυμα DNA μεθυλοτρανσφεράσες, που περιλαμβάνουν τις μεθυλοτρανσφεράσες τύπου 1 (DNMT1), τύπου 3A (DNMT3A), τύπου 3B (DNMT3B) και τύπου 3L (DNMT3L).

Τα ένζυμα που επάγουν την μεθυλίωση δρουν σε διαφορετικό στόχο με απώτερο σκοπό να εξασφαλίσουν την αξιοπιστία της διαδικασίας αυτής. Συγκεκριμένα, η μεθυλοτρανσφεράση τύπου 1 (DNMT1) δρα σε ημιμεθυλιωμένες θέσεις τις οποίες μετατρέπει σε πλήρως μεθυλιωμένες. Επιπλέον το ένζυμο αυτό μπορεί να μεθυλιώσει τις κυτοσίνες από τις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες κατά την αντιγραφή με βάση την μεθυλίωση της γονεϊκής αλυσίδας και έτσι να συντηρεί τη διαδικασία της μεθυλίωσης (Pradhan *et al.*, 1999). Αντίθετα, οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3A και DNMT3B επάγουν de novo μεθυλίωση, δηλαδή δρουν σε μη μεθυλιωμένο DNA και τροποποιούν μια νέα θέση (Okano *et al.*, 1999). De novo μεθυλίωση επάγει και η μεθυλοτρανσφεράση 3L, η οποία αναγνωρίζει μη μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης 4 στην ιστόνη H3 (H3-K4) και αλληλεπιδρά με τη μεθυλοτρανσφεράση DNMT3A (Ooi *et al.*, 2007).

Η de novo μεθυλίωση συμβαίνει κατά την έναρξη της εμβρυογένεσης και της γαμετογένεσης: το γονεϊκό γονιδίωμα υπόκειται ενεργό απομεθυλίωση του DNA μετά τη γονιμοποίηση, όπως επίσης παθητική μεθυλίωση συμβαίνει στο πατρικό και μητρικό γονιδίωμα μετά το στάδιο των δυο κυττάρων στο έμβρυο (Seki *et al.*, 2005). Μετά την εμφύτευση και συγκεκριμένα στην πολυδύναμη επιβλάστη, οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3A και DNMT3B ενεργοποιούνται και αυξάνεται ο ρυθμός

μεθυλίωσης του DNA (Watanabe *et al.*, 2002). Έπειτα από την επαναμεθυλίωση του γονιδιώματος, το ένζυμο DNMT1 λειτουργεί ως συντηρητής της μεθυλίωσης προκειμένου να διατηρηθεί το πρότυπο μεθυλίωσης κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις (Kim, Samaranyake and Pradhan, 2009). Φαίνεται λοιπόν ότι στα πρωταρχικά στάδια της εμβρυογένεσης το προϋπάρχον πρότυπο μεθυλίωσης του DNA διαγράφεται από ολόκληρο το γονιδίωμα μέσω απομεθυλίωσης στα πλαίσια επιγενετικού αναπρογραμματισμού.

Η μεθυλίωση του DNA σχετίζεται με καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων και επάγει τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης (Ehrlich *et al.*, no date). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει καταστολή της μεταγραφής μέσω παρεμπόδισης πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων ή μέσω πρόσδεσης καταστολέων μεταγραφής. Συγκεκριμένα οι μεθυλοτρανσφεράσες, για να ενισχυθεί η γονιδιακή αποσιώπηση, συνεργάζονται με ένζυμα που συμμετέχουν στην τροποποίηση των ιστονών: η μεθυλίωση της λυσίνης K9 στην ιστόνη H3 (H3-K9), που προάγει τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA, καθώς βοηθά στην σταθεροποίηση της DNMT1 και έτσι εξασφαλίζει την μακροχρόνια γονιδιακή αποσιώπηση (Rothbart *et al.*, 2012). Επιπλέον οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3A και DNMT3B σχηματίζουν σύμπλοκο με άλλους επιγενετικούς καταστολείς, που περιλαμβάνουν τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) και τις μεθυλοτρανσφεράσες που εμπλέκονται στην κατασταλτική δράση της μεθυλίωσης της H3-K9 (Smith and Meissner, 2013). Συνεπώς φαίνεται να υπάρχει «επικοινωνία» μεταξύ των τροποποιήσεων των ιστονών με τη μεθυλίωση του DNA, όπου ο σχηματισμός της ετεροχρωματίνης ενισχύεται με τη μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων με σκοπό τη σταθερή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

#### 2.2.2.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η μεθυλίωση του DNA είναι συστατικό στοιχείο της επιγενετικής τροποποίησης και βοηθάει στη συντήρηση και σταθεροποίηση του κυτταρικού φαινοτύπου μέσα από τη

διατήρηση του μοτίβου γονιδιακής έκφρασης (Hemberger, Dean and Reik, 2009) (Bird, 2002). Το μοτίβο της μεθυλίωσης του DNA για ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο κληρονομείται μέσα από επιτυχημένους κυτταρικούς κύκλους και εν τέλει επεκτείνεται στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (Jaenisch and Bird, 2003). Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του DNA αντανακλά τον ιστό από τον οποίο προέρχονται τα κύτταρα, αποδεικνύοντας έτσι ότι η πληροφορία που εμπεριέχεται στο μοτίβο της μεθυλίωσης του DNA μπορεί να ταυτοποιήσει τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο προέλευσης (Reik, 2007).

Τα πολυδύναμα επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iPSCs) προκύπτουν από την εισαγωγή τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων Oct3/4, Sox2, c-Myc και Klf4 σε σωματικά κύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006), όπου εν τέλει μέσω του αναπρογραμματισμού αυτού επάγεται μαζική επιγενετική επαναφορά του γονιδιώματος ενός ώριμου σωματικού κυττάρου (Maherali *et al.*, 2007). Κατά την διαδικασία αυτή, τα βλαστοκύτταρα αυτά αποκτούν ιδιότητες πολυδυναμικότητας και αθανατοποίησης, ομοιάζοντας έτσι περισσότερο με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (ESCs). Παρά την πολυδυναμικότητα βέβαια, τα iPSCs παρουσιάζουν διαφορετική ροπή διαφοροποίησης ανάλογα από τον ιστό που προήλθαν σε μοντέλα ποντικών (Miura *et al.*, 2009). Αυτή η ιδιαιτερότητα φαίνεται να οφείλεται τόσο στην «κληρονομούμενη» DNA μεθυλίωση, μέσω της επιγενετικής μνήμης από τα γονεϊκά κύτταρα, όσο και στο παρεκκλίνον μοτίβο μεθυλίωσης του DNA που συμβαίνει κατά τη διάρκεια του αναπρογραμματισμού, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Τα επαγόμενα από μεταγραφικούς παράγοντες πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, παρά την ομοιότητα στο επιγένωμά τους και στον αναπρογραμματισμό τους, φαίνεται να διατηρούν μοτίβα γονιδιακής έκφρασης από τα κύτταρα-δότες τους (Ghosh *et al.*, 2010). Ειδικότερα, τα κύτταρα αυτά αγκυροβολούν κατάλοιπα DNA μεθυλίωσης που είναι χαρακτηριστικά από τον ιστό από τον οποίο προέρχονται (Kim and Costello, 2017). Το παραπάνω ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ονομάζεται επιγενετική μνήμη. Το φαινόμενο αυτό ευνοεί τα iPSCs να διαφοροποιούνται σε κυτταρικές σειρές που σχετίζονται με το κύτταρο-δότη και έτσι να περιορίζεται η εναλλακτική για αλλαγή κυτταρική «μοίρας» (Kim *et al.*, 2010). Η επιγενετική «μνήμη» που αποκτούν τα iPSCs από τα σωματικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται είναι που τελικά επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση και

διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (Polo *et al.*, 2010). Αυτή η διαπίστωση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη σε πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων, ώστε να ενισχυθεί η διαφοροποίηση σε μια επιθυμητή κυτταρική σειρά.

Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν ελάχιστες διαφορές στη δομή της χρωματίνης και στη γονιδιακή έκφραση ανάμεσα στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, καθιστώντας έτσι τα κύτταρα αυτά σχεδόν ταυτόσημα (Guenther *et al.*, 2010). Όμως υπάρχουν επιγενωμικές διαφορές μεταξύ των δυο ειδών βλαστοκυττάρων και ιδιαίτερα στο πρότυπο μεθυλίωσης των κυττάρων αυτών, δηλαδή στο μεθύλωμα (methylome) τους (Polo *et al.*, 2010). Ο αναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα δημιουργεί πολλαπλές και διαφορετικές θέσεις μεθυλίωσης, οι οποίες αντιπροσωπεύουν συνάμα την μνήμη από το γονεϊκό προφίλ μεθυλίωσης όπως και το χαρακτηριστικό για κάθε επαγόμενο πολυδύναμο βλαστοκύτταρο μοτίβο DNA μεθυλίωσης. Οι θέσεις αυτές εντοπίζονται κυρίως στα CpG νησίδια, αν και εξίσου διαφορετικό είναι το πρότυπο μεθυλίωσης και σε μη-CpG νησίδια τα οποία εντοπίζονται κοντά στα κεντρομερή και τελομερή των χρωμοσωμάτων. Μάλιστα, διαφορετικές σειρές από πολυδύναμα επαγόμενα βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν ποικιλομορφία όσον αφορά τον αναπρογραμματισμό τους και την μεθυλίωση του DNA, σε σύγκριση τόσο με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα όσο και με άλλες iPSCs σειρές (Lister *et al.*, 2011). Συμπερασματικά, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από ετερογένεια όσον αφορά τον αναπρογραμματισμό τους, καθώς συνδυάζουν επιγενετική μνήμη από το κύτταρο-δότη, αλλά συνάμα εμφανίζουν παρεκκλίνον μοτίβο μεθυλίωσης του DNA.

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα προκειμένου να μετατραπούν σε εμβρυονικά βλαστοκύτταρα περνούν μέσα από δυο φάσεις: η μια φάση είναι εξαρτώμενη από τους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν τα σωματικά κύτταρα σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (transgene-dependent phase), ενώ στην άλλη φάση οι μεταγραφικοί παράγοντες δεν δρουν (transgene-independent phase) (Nishino *et al.*, 2011). Αναλυτικότερα, τα ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hiPSCs), ανεξάρτητα από τον ιστό από τον οποίο προήλθαν, παρουσιάζουν παρόμοιο μοτίβο

επιγενετικής με τα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (hESCs). Ωστόσο αυτά τα δυο είδη κυττάρων εμφανίζουν επιγενετικές διαφορές μεταξύ τους, οι οποίες οφείλονται στο «ανώμαλο» μοτίβο υπερμεθυλίωσης των iPSCs που συμβαίνει τυχαία στο γονιδίωμα (Nishino *et al.*, 2011). Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα κατά τον αναπρογραμματισμό τους υφίστανται παροδική υπερμεθυλίωση του DNA μέσα από τρία στάδια: αρχικά τα iPSCs έχουν το ίδιο μοτίβο υπομεθυλίωσης του DNA όπως στα γονεϊκά κύτταρα, στη συνέχεια συμβαίνει προσωρινή ανώμαλη υπερμεθυλίωση μέσω καταστολής της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων (transgene-independent reprogramming) και τέλος τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs μειώνονται σε τέτοιο βαθμό, ώστε να φτάνουν σε επίπεδα παρόμοια με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Nishino and Umezawa, 2016). Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα δεν γίνονται ταυτόσημα με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, αλλά παρόλα αυτά μοιάζουν αρκετά.

Αρχικά υπήρξε η άποψη ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα έχουν μειωμένο μοτίβο μεθυλίωσης και μόλις συμβεί η διαφοροποίηση, τότε τα βλαστοκύτταρα υφίστανται μεθυλίωση ώστε να υπάρξει καταστολή έκφρασης γονιδίων και τελικά να χαθεί η πολυδυναμικότητα των κυττάρων. Ωστόσο, το 2016 η έρευνα των Nishino και των συνεργατών του έδειξε ότι το ποσοστό μεθυλίωσης των ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (hESCs) και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (hiPSCs) είναι υψηλότερο από ότι στα σωματικά κύτταρα (Nishino and Umezawa, 2016). Από το εύρημα αυτό είναι φανερό ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα κατά τον αναπρογραμματισμό παρουσιάζουν αυξημένη μεθυλίωση του DNA για να καταστείλουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση. Σε περίπτωση διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων σε σωματικά κύτταρα, μειώνονται οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις στο DNA, ενώ παράλληλα, οι παράγοντες αναπρογραμματισμού ενεργοποιούν τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την πολυδυναμικότητα.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μετά από μακρόχρονη καλλιέργεια των iPSCs μπορεί να μειωθεί η διαφορά στη γονιδιακή έκφραση ανάμεσα στους κλώνους, τόσο σε ποντίκια, όσο και σε ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (hESCs) (Polo *et al.*, 2010) (Chin *et al.*, 2010). Στην έρευνα της ομάδας του Nishino φάνηκε ότι κατά τον



αναπρογραμματισμό των ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (hiPSCs) εμφανίζονται και εξαφανίζονται πολλαπλές φορές ανώμαλες υπερμεθυλιωμένες θέσεις (Nishino *et al.*, 2011). Περαιτέρω, όσο αυξάνεται το πέρασμα των επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων στην καλλιέργεια, τόσο εξαλείφονται τα «ανώμαλα» μοτίβα υπερμεθυλίωσης του DNA. Επίσης, με το πέρασμα της καλλιέργειας εξαλείφονται και τα κληρονομούμενα μοτίβα μεθυλίωσης από τον αρχικό ιστό, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι τα μοτίβα αυτά είναι τμήμα της «ανώμαλης» υπερμεθυλίωσης. Με αυτόν τον τρόπο, όσο περισσότερο χρονικό διαστήματα βρίσκονται τα ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα σε καλλιέργεια, τόσο περισσότερο χάνουν τα κληρονομούμενα χαρακτηριστικά από τα γονεϊκά κύτταρα και κατά συνέπεια μοιάζουν περισσότερο με τα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Nishino and Umezawa, 2016).

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα όσον αφορά το μοτίβο μεθυλίωσης, χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα και ευελιξία. Αφενός διατηρούν την επιγενετική μνήμη που «κληρονόμησαν» από το κύτταρο προέλευσής τους, αφετέρου κατά τον αναπρογραμματισμό τους χάνουν την ετερογένειά τους, μέσω παροδικής υπερμεθυλίωσης και τελικά τείνουν να μοιάσουν με εμβρυονικά βλαστοκύτταρα. Διατηρούν δηλαδή κομμάτι της ταυτότητάς τους αλλά ταυτόχρονα προσαρμόζουν τη γονιδιακή τους έκφραση ανάλογα με τις συνθήκες και το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού. Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά και καθώς η ανώμαλη υπερμεθυλίωση συμβαίνει τυχαία στα αρχικά στάδια του αναπρογραμματισμού, οι διάφορες θέσεις μεθυλίωσης των iPSCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιγενετικοί δείκτες για την αξιολόγηση των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων για μελλοντικές θεραπευτικές εφαρμογές.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

### 3.1 ΑΡΘΡΙΚΟΣ ΧΟΝΔΡΟΣ: ΔΟΜΗ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα άκρα των οστών που έρχονται σε επαφή σε μια άρθρωση καλύπτονται από αρθρικό χόνδρο. Ο αρθρικός χόνδρος είναι υαλοειδής χόνδρος πάχους 2-4 χιλιοστά και απαρτίζεται από την εξωκυττάρια μάζα (extracellular matrix, ECM) καθώς και από εξειδικευμένα κύτταρα, τα χονδροκύτταρα. Οι πρωταρχικές λειτουργίες του αρθρικού ιστού είναι να αντιστέκεται σε συμπιεστικές δυνάμεις και να παρέχει λεία επιφάνεια στις αρθρώσεις προκειμένου να διευκολύνεται η κατανομή του βάρους με τον χαμηλότερο δυνατό συντελεστή τριβής (Stockwell, 1979) [Εικόνα 7].



Εικόνα 7: Ανατομία της άρθρωσης

© CC BY 3.0 OpenStax College - Anatomy & Physiology, Connexions Web site <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013.

Σε αντίθεση με τους περισσότερους ιστούς, ο αρθρικός χόνδρος δεν φέρει αγγεία, νεύρα και λέμφο, οπότε η κύρια οδός για την θρέψη του είναι μέσω διάχυσης θρεπτικών στοιχείων από το αρθρικό υγρό. Επιπλέον παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα

επιδιόρθωσης και για αυτόν τον λόγο η ακεραιότητα του είναι ύψιστης σημασίας και εξαρτάται άμεσα από τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του (Sophia Fox, Bedi and Rodeo, 2009).

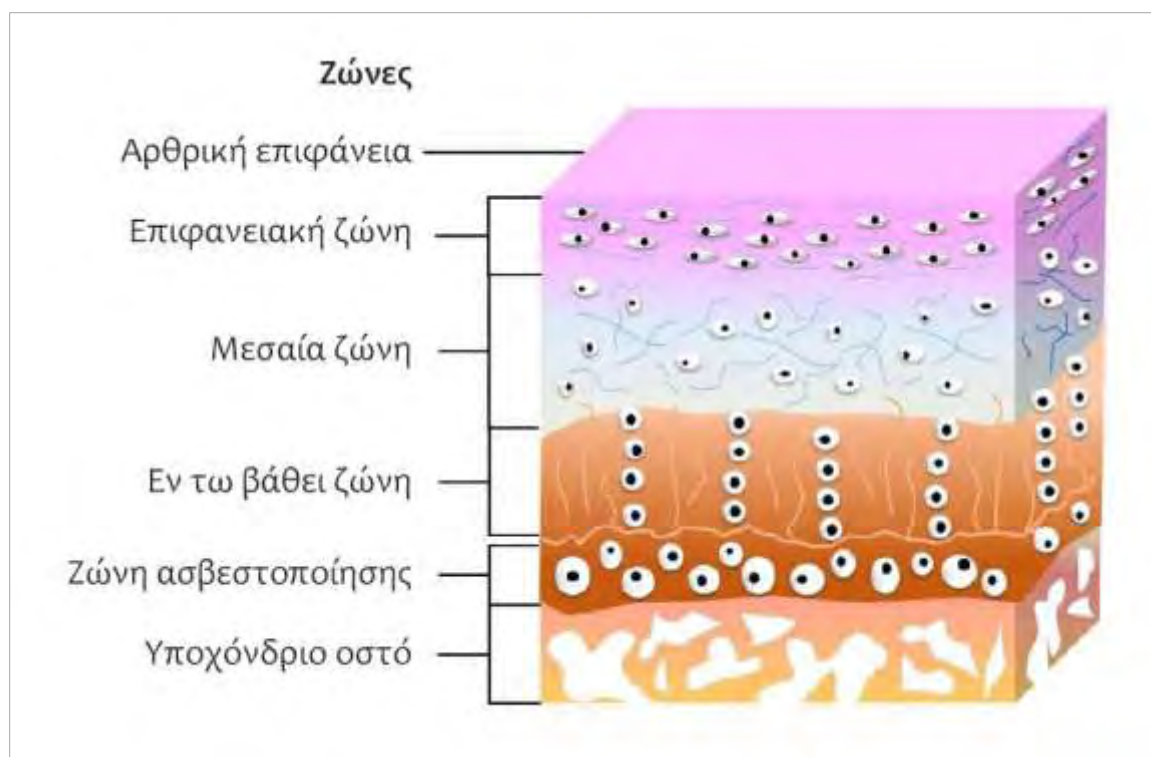
Τα χονδροκύτταρα προέρχονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και αντιπροσωπεύουν μόλις το 2% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση και μεταβολική ενεργότητα και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή, τη διατήρηση και την επιδιόρθωση της εξωκυττάριας μάζας. Συγκεκριμένα, τα χονδροκύτταρα δέχονται χημικά και μηχανικά σήματα από την εξωκυττάρια μάζα και αναλόγως μεταβάλλουν την μεταβολική τους δραστηριότητα (Stockwell, 1979). Τα χονδροκύτταρα ανάλογα με την ανατομική περιοχή στην οποία βρίσκονται, διαφέρουν σε σχήμα, μέγεθος και ποσότητα. Δυστυχώς, έχουν περιορισμένη δυνατότητα ανανέωσης, γεγονός που αποτελεί και καθοριστικό παράγοντα για την μειωμένη ικανότητα επούλωσης τους μετά από κάκωση. Συμπερασματικά, η διάρκεια ζωής των χονδροκυττάρων εξαρτάται άμεσα από το μικροπεριβάλλον τους (Sophia Fox, Bedi and Rodeo, 2009).

Κατά τη δημιουργία του αρθρικού χόνδρου, τα χονδροκύτταρα αρχόμενα ως μεσεγχυματικά κύτταρα, διαφοροποιούνται και έχουν αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα και αυξημένη πυκνότητα. Αντίθετα, κατά την ωρίμανση του χόνδρου, η κυτταρική διαίρεση σταματάει να υφίσταται. Τα χονδροκύτταρα σπάνια δημιουργούν διακυττάριας συνδέσεις μεταξύ τους με σκοπό τη μεταγωγή σήματος. Ωστόσο ανταποκρίνονται σε μια ποικιλία από ερεθίσματα, όπως αυξητικοί παράγοντες και μηχανικές φορτίσεις και τότε παράγουν κολλαγόνο και πρωτεΐνες. Όποτε η ακεραιότητα του ιστού διαταράσσεται, τα χονδροκύτταρα «αντιλαμβάνονται» αλλαγές στην σύσταση της εξωκυττάριας μάζας και ανταποκρίνονται επηρεάζοντας την ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού μέσα από συνεχή αναδιαμόρφωση των κυττάρων που χάθηκαν (Huber, Trattinig and Lintner, 2000). Εν τέλει τα χαρακτηριστικά που εμφανίζει ο αρθρικός χόνδρος οφείλονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των χονδροκυττάρων και της εξωκυττάριας μάζας (Muir, 1995).

Η εξωκυττάρια μάζα περιέχει κατά βάση νερό και μακρομόρια. Στα μακρομόρια συμπεριλαμβάνονται το κολλαγόνο, οι πρωτεογλυκάνες και οι γλυκοπρωτεΐνες. Το νερό,

όπως και το κολλαγόνο βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στην εξωκυττάρια μάζα. Συγκεκριμένα το κολλαγόνο τύπου II αποτελεί περίπου το 90% του κολλαγόνου της εξωκυττάριας μάζας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κύριων συστατικών της εξωκυττάριας μάζας βοηθούν στην διατήρηση του νερού εντός αυτής και τελικά προσδίδουν στον αρθρικό ιστό την ελαστικότητα του (Huber, Trattnig and Lintner, 2000). Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν την εξωκυττάρια μάζα σχηματίζουν μια τρισδιάστατη δομή μεταξύ τους και σε συνδυασμό με τα χονδροκύτταρα συνεισφέρουν στη δημιουργία ζωνώσεων στον αρθρικό χόνδρο.

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελείται από τέσσερις οριζόντιες ζώνες, οι οποίες είναι η επιφανειακή ζώνη, η μεσαία ζώνη, η εν τω βάθει ζώνη και τέλος η ζώνη ασβεστοποίησης. Η πυκνότητα και η περιεκτικότητα των κυττάρων της κάθε ζώνης διαφέρει ανάλογα με το είδος της άρθρωσης, τη μεταβολική δραστηριότητα και την ηλικία του οργανισμού. Η επιφανειακή ζώνη είναι η λεπτότερη ζώνη του αρθρικού χόνδρου και αποτελείται από πεπλατυσμένα χονδροκύτταρα παράλληλα διατεταγμένα προς την επιφάνεια, έχει την υψηλότερη συγκέντρωση σε νερό και περιέχει πυκνές ίνες κολλαγόνου, επίσης παράλληλα διατεταγμένες (Weiss, Rosenberg and Helfet, 1968). Η μεσαία ή μεταβατική ζώνη αποτελείται από στρογγυλεμένα χονδροκύτταρα με άτακτα δομημένες ίνες κολλαγόνου και με αυξημένα επίπεδα πρωτεογλυκανών. Η εν τω βάθει ζώνη αποτελείται από κάθετες στήλες αραιών χονδροκυττάρων καθώς και από τυχαία κάθετα διατεταγμένες ίνες κολλαγόνου. Η ζώνη αυτή έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε νερό ενώ επικρατούν αυξημένα επίπεδα πρωτεογλυκανών, όπως και στη μεσαία ζώνη. Τέλος, η ζώνη ασβεστοποίησης αποτελείται από στρογγυλεμένα χονδροκύτταρα, από ίνες κολλαγόνου που βρίσκονται κάθετα στην αρθρική επιφάνεια, ενώ απουσιάζουν οι πρωτεογλυκάνες. Η τελευταία αυτή ζώνη έρχεται σε επαφή με το υποχόνδριο οστό, όπου διαμέσω αυτού μεταφέρονται οι φορτίσεις από τον αρθρικό χόνδρο στο οστό (Huber, Trattnig and Lintner, 2000) [Εικόνα 8].



Εικόνα 8: Οι ζώνες του αρθρικού χόνδρου

© Ng, H.Y., Lee, K.A., & Shen, Y. (2017). *Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair*.

Συνοψίζοντας, ο αρθρικός χόνδρος είναι μια λεπτή ελαστική μεμβράνη με κύρια λειτουργία τη λείανση των αρθρικών επιφανειών και την κατανομή του βάρους. Αποτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα, τα χονδροκύτταρα τα οποία διατηρούν την ομοιότητα στον αρθρικό ιστό μεταξύ της αποδόμησης των μακρομορίων της εξωκυττάριας μάζας και της σύνθεσης νέων προϊόντων. Τουτέστιν, εκφυλιστικές αλλοιώσεις των αρθρώσεων όπως η οστεοαρθρίτιδα σχετίζονται με διαταραχές στον μεταβολισμό του χόνδρου. Λαμβάνοντας υπόψη τις μοναδικές ιδιότητες του αρθρικού ιστού και την αρχιτεκτονική του, παραμένει πρόκληση η αντιμετώπιση και η θεραπεία των παθήσεων του.

### 3.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

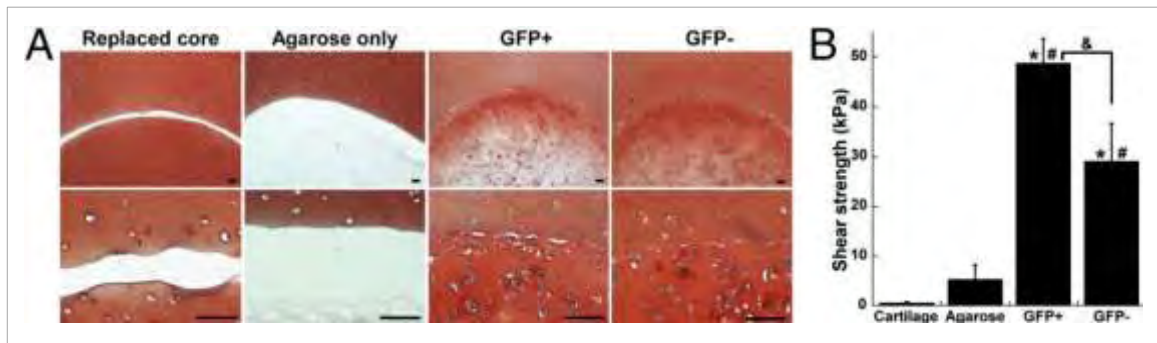
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του αρθρικού χόνδρου είναι η απουσία αγγείων και νεύρων, γεγονός που δικαιολογεί τη μειωμένη ικανότητα ανανέωσης μετά από έναν τραυματισμό. Παράλληλα, αυτήν τη στιγμή δεν υπάρχει οριστική θεραπεία για την αποκατάσταση των αρθρώσεων, παρά μόνο συνδυασμός φαρμακοθεραπείας, φυσικοθεραπείας ή χειρουργικής αντιμετώπισης που αναστέλλουν προσωρινά την εξέλιξη της νόσου σε οστεοαρθρίτιδα (Alshami, 2014). Φαίνεται λοιπόν αναγκαία η εύρεση νέων εναλλακτικών λύσεων με σκοπό τη μόνιμη αποκατάσταση των αρθρώσεων.

Πολλά υποσχόμενα για την αποκατάσταση του αρθρικού χόνδρου είναι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Τα κύτταρα αυτά δημιουργήθηκαν με την εισαγωγή τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων όχι μόνο από ινοβλάστες ποντικού, αλλά και από ανθρώπινα σωματικά κύτταρα όπως τα μεσεγχυματικά (Takahashi and Yamanaka, 2006). Το προτέρημα των επαγόμενων βλαστοκυττάρων είναι ότι μιμούνται τις ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, δηλαδή έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο, όμως στερούνται ηθικών ζητημάτων που σχετίζονται με την απόρριψη των εμβρύων που απαιτούνται για τη δημιουργία των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (Thomson *et al.*, 1998).

Έχουν βρεθεί αρκετοί τρόποι διαφοροποίησης των iPSCs σε χονδροκύτταρα, μεταξύ των οποίων είναι (i) η ταυτόχρονη καλλιέργεια των επαγόμενων βλαστοκυττάρων με χονδροκύτταρα, (ii) η επαγωγή μεσεγχυματικών κυττάρων από τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και τελικά διαφοροποίηση σε χονδροκύτταρα και (iii) η μετατροπή των επαγόμενων βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα με την εισαγωγή του κατάλληλου κυτταρικού πληθυσμού (Tsumaki, Okada and Yamashita, 2015). Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα εμπόδια που πρέπει να υπερκεραστούν μέχρι την εφαρμογή των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως είναι για παράδειγμα ο πιθανός σχηματισμός τερατώματος σε συνδυασμό με την μέθοδο αναπρογραμματισμού των κυττάρων (Yamashita *et al.*, 2013).

Με τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) υπάρχει δυνατότητα παραγωγής πληθώρας κυττάρων με σκοπό τη μηχανική των ιστών (tissue engineering), όπως επίσης και δυνατότητα δημιουργίας εργαστηριακών μοντέλων (in vitro models) που να μοιάζουν στον ασθενή για τη μελέτη των παραγόντων που συντελούν στην ανάπλαση του χόνδρου και την οστεοαρθρίτιδα. Ωστόσο, τόσο οι κυτταρικές θεραπείες όσο και τα μοντελικά πρότυπα απαιτούν έναν συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό ικανό να προσομοιώνει τα μοναδικά χαρακτηριστικά του αρθρικού χόνδρου. **Το 2012 ο Diekman και οι συνεργάτες του** χρησιμοποίησαν ένα in vitro μοντέλο με ελαττωματικό αρθρικό χόνδρο, προκειμένου να διερευνήσουν την επιδιορθωτική ικανότητα των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στον αρθρικό ιστό. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κεκαθαμένα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, ικανά να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα από ινοβλάστες ενήλικου ποντικού. Τα ικανά να διαφοροποιηθούν προς χονδροκύτταρα κύτταρα ταυτοποιήθηκαν και απομονώθηκαν με βάση την έκφραση της πρωτεΐνης GFP (Green Fluorescent Protein). Στη συνέχεια τα βλαστοκύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα εργαστηριακό μοντέλο με αρθροπάθεια με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητα των iPSCs στην αποκατάσταση του αρθρικού ιστού. Τελικά, μετά από 21 μέρες καλλιέργειας σε Matrigel, τα βλαστοκύτταρα που προέκυψαν από το ίζημα της καλλιέργειας με θετική έκφραση της GFP πρωτεΐνης (GFP+ cells) συνέθεσαν κολλαγόνο τύπου II και πρωτεογλυκάνες, δηλαδή κάποια από τα βασικά συστατικά της εξωκυττάριας μάζας, τα οποία μάλιστα ενσωματώθηκαν στον παρακείμενο αρθρικό ιστό (Diekman *et al.*, 2012). Αντίθετα, τα κύτταρα με αρνητική έκφραση της GFP (GFP- cells) συνέθεσαν κολλαγόνο τύπου I και δεν παρουσίασαν έκφραση χονδρογενετικών γονιδίων.

Τα ευρήματα αυτά κατέδειξαν την πιθανή χρήση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων τόσο για τη θεραπεία των αρθρικών παθήσεων, όσο και για την χρήση τους ως ιστικά μοντέλα παθήσεων και δη της οστεοαρθρίτιδας. Μάλιστα η σωστή επιλογή και η καθαρότητα του κυτταρικού πληθυσμού προς χονδρογενετική διαφοροποίηση μεγιστοποιούν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα, ενώ μειώνουν το ρίσκο σχηματισμού τερατώματος [Εικόνα 9].



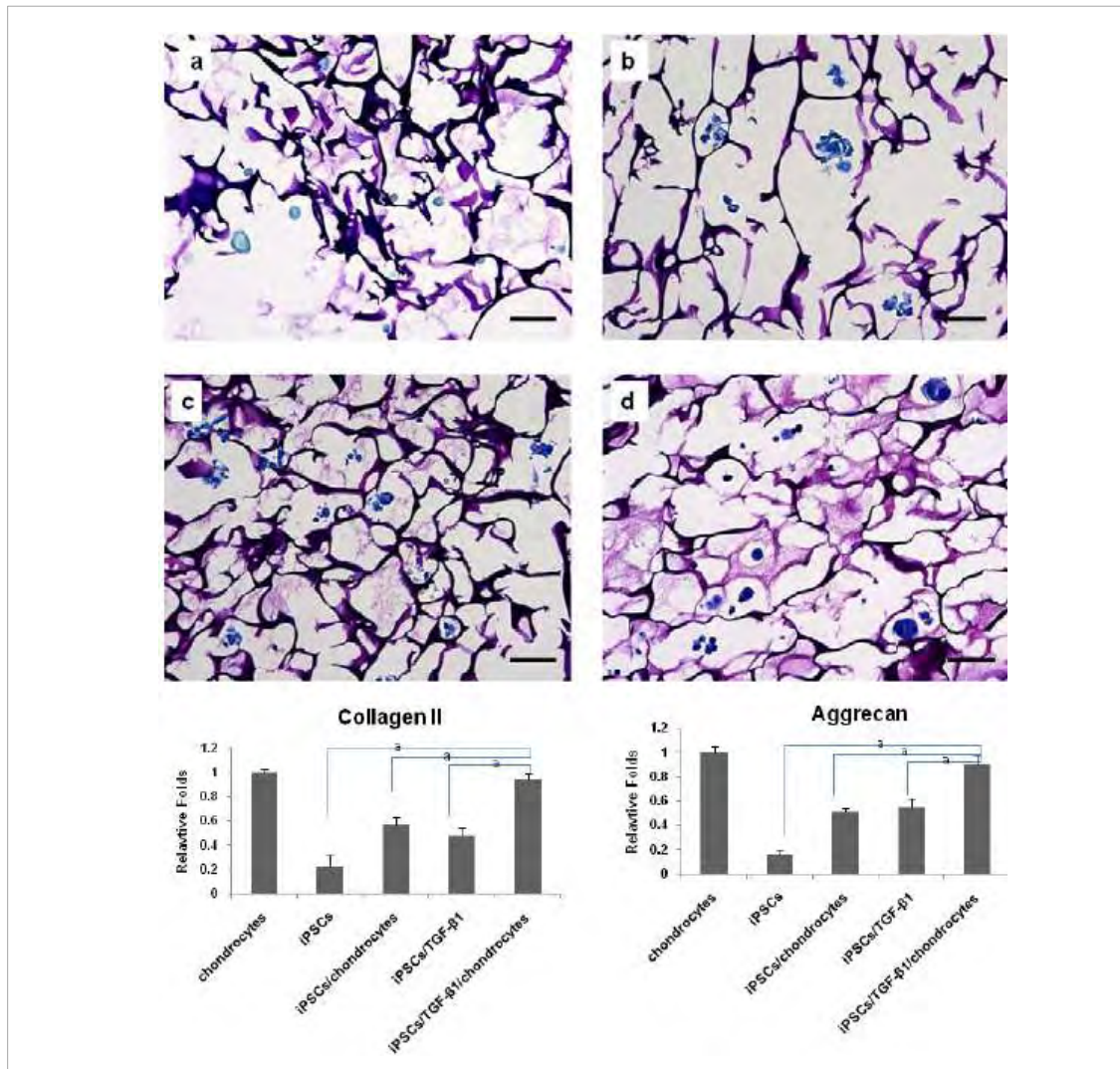
Εικόνα 9: (A) *In vitro* διόρθωση αρθρικού ελλείμματος (μπάρα κλίμακας: 100  $\mu\text{m}$ .) (B) επιδιορθωτική δύναμη

© Diekman, B. O. et al. (2012) 'Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences

Την ίδια χρονιά (2012), ο Wei και οι συνεργάτες του διερεύνησαν την ικανότητα διαφοροποίησης ανθρώπινων χονδροκυττάρων με οστεοαρθρίτιδα σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα με την έκφραση καθορισμένων μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και την πιθανότητα χρήσης αυτών των βλαστοκυττάρων για χονδρογένεση (Wei *et al.*, 2012). Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν ανθρώπινα χονδροκύτταρα με οστεοαρθρίτιδα τα οποία στη συνέχεια επιμολύνθηκαν με τέσσερις μεταγραφικούς παράγοντες Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc, οπότε και μετατράπηκαν σε ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hiPSCs) (Takahashi *et al.*, 2007). Έπειτα τα κύτταρα αυτά επιμολύνθηκαν με έναν λεντιϊό που έφερε τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$ 1, έτσι ώστε τα iPSCs να οδηγηθούν σε χονδρογενετική διαφοροποίηση. Τα επιμολυσμένα πλέον iPSCs/TGF- $\beta$ 1 τοποθετήθηκαν σε ικρίωμα αλγινικού οξέος (alginate matrix) και τέλος στο μείγμα των iPSCs/TGF- $\beta$ 1/Alginate προστέθηκαν χονδροκύτταρα. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν ότι τα iPSCs που δημιουργήθηκαν από τα οστεοαρθριδικά κύτταρα ήταν ικανά, μετά από καλλιέργεια με αλγινικό οξύ, να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε χονδροκύτταρα (Wei *et al.*, 2012). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε τόσο από την ιστολογική ανάλυση, που αποκάλυψε την εξωκυττάρια μάζα, όσο και από την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τον αρθρικό χόνδρο, όπως η παραγωγή κολλαγόνου τύπου II. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να προωθήσουν την χρήση



των iPSCs για την μηχανική των ιστών (tissue engineering) και πιθανώς να δώσουν λύση στην αντικατάσταση των οστεοαρθριτικών κυττάρων [Εικόνα 10].



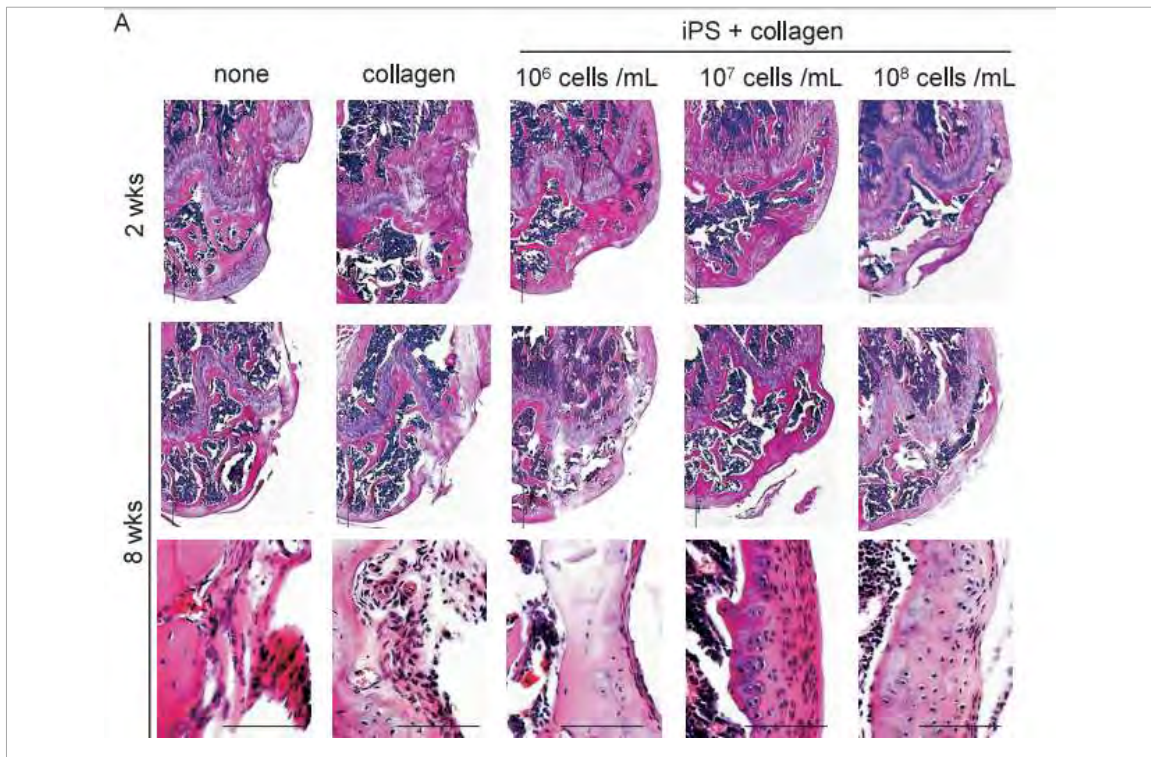
Εικόνα 10: *In vitro* χονδρογενή διαφοροποίηση από iPSCs επαγόμενα από χονδροκύτταρα με οστεοαρθρίτιδα. (a) χρώση μπλε τολουιδίνης από iPSCs / αλγινικό οξύ), (b) iPSCs / αλγινικό οξύ / χονδροκύτταρα, (c) iPSCs / TGF-β1 / αλγινικό οξύ, (d) iPSCs / TGF-β1 / αλγινικό οξύ / χονδροκύτταρα (μπάρα κλίμακας: 100 μm )

Κάτωθεν των φωτογραφιών αποτελέσματα PCR που δείχνουν τη γονιδιακή έκφραση των δεικτών κολλαγόνο τύπου II και αγγρεκάνης.

© Wei, Y. et al. (2012) 'Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix.', *European cells & materials*

**Το 2013 ο Υτο και οι συνεργάτες του** ενσωμάτωσαν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα σε υδρογέλη από κολλαγόνο και έπειτα έγινε εισαγωγή τους σε αρθρικό

έλλειμμα επιγονατίδας ποντικού. Το αποτέλεσμα ήταν ότι οι αρθρώσεις που γέμισαν με τα iPSCs κατάφεραν να επιδιορθώσουν τα αρθρικά και οστικά ελλείμματα. Άξιο αναφοράς είναι ότι τα βλαστοκύτταρα αυτά παρέμειναν στην εμφυτευμένη περιοχή επί 8 εβδομάδες, αποδεικνύοντας έτσι ότι προσαρμόστηκαν στο νέο περιβάλλον. Ωστόσο, σε κάποιες περιοχές του χόνδρου παρατηρήθηκε σχηματισμός τερατώματος, το οποίο πιθανώς να μπορούσε να αποφευχθεί με *in vitro* διαφοροποίηση των iPSCs πριν την εμφύτευση (Uto *et al.*, 2013) [Εικόνα 11].



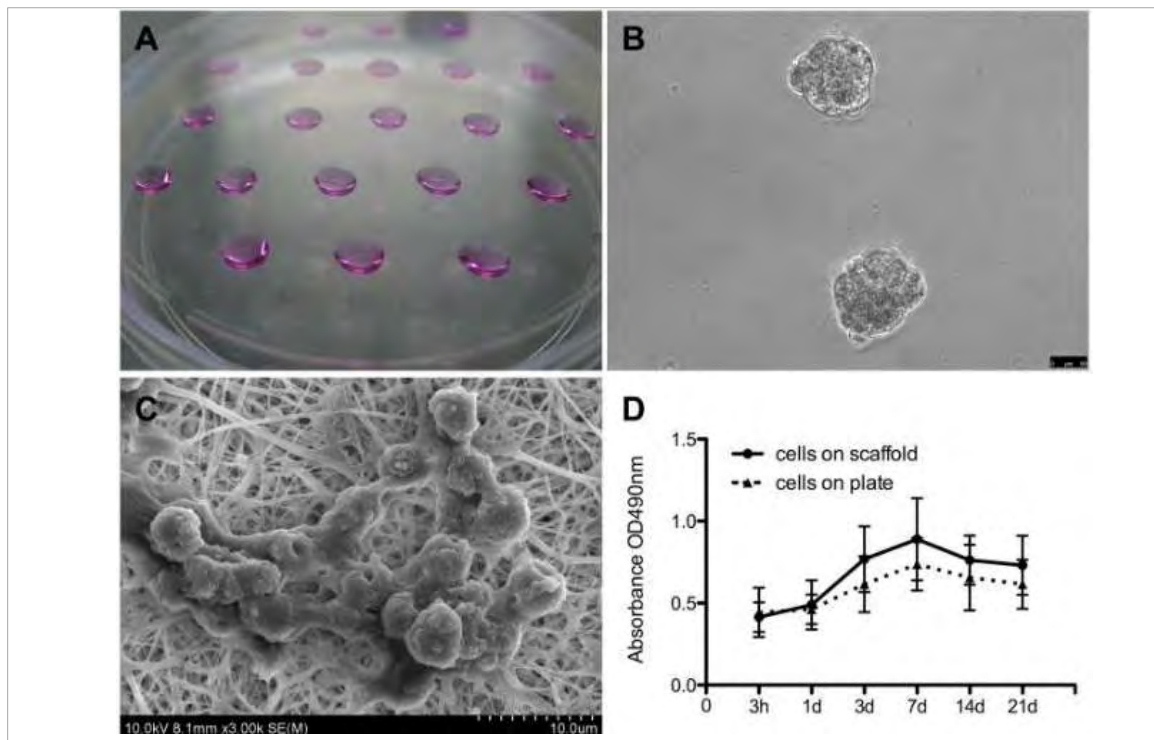
Εικόνα 11: Ιστολογικά ευρήματα από αρθρικά ελλείμματα εμφυτευμένα με iPSCs (χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης).

Τα ελλείμματα χωρίς iPSCs δεν μπόρεσαν να δημιουργήσουν βαλοειδή επιφάνεια στις 8 εβδομάδες. Αντίθετα οι αρθρώσεις με iPSCs προκάλεσαν αναγέννηση αρθρικού χόνδρου (μπάρα κλίμακας 1 mm στις άνω εικόνες, 100 μm στις κάτω εικόνες).

© Uto, S. *et al.* (2013) 'Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model.', *Biomedical research* (Tokyo, Japan)

Τα ικρίωματα από γέλη είναι αρκετά συμβατά και παρουσιάζουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα στα πειραματόζωα. Ωστόσο άλλη στρατηγική είναι ο συνδυασμός ικριωμάτων από γέλη, όπως έκανε η ομάδα του Liu, ένα έτος αργότερα. Συγκεκριμένα, κατασκεύασαν ένα τρισδιάστατο ικρίωμα πολυκαπρολακτόνης με ζελατίνη

(polycaprolactone/gelatine scaffold) ώστε να ενισχύσουν τη χονδρογενή διαφοροποίηση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων. Έπειτα εμφύτευσαν αυτόν τον σχηματισμό σε τραυματισμένα γόνατα κουνελιών και αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα. Το αποτέλεσμα ήταν ότι τα νεοσχηματισμένα χονδροκύτταρα, τα οποία συναθροίστηκαν και σχημάτισαν εμβρυοειδή σώματα (Embryoid Bodies, EB), προσδέθηκαν στο ικρίωμα και μάλιστα ύστερα από 3 μήνες, τα ελλείμματα είχαν πληρωθεί από κολλαγόνο τύπου II, βασικό συστατικό της εξωκυττάριας μάζας (Liu *et al.*, 2014) [Εικόνα 12].

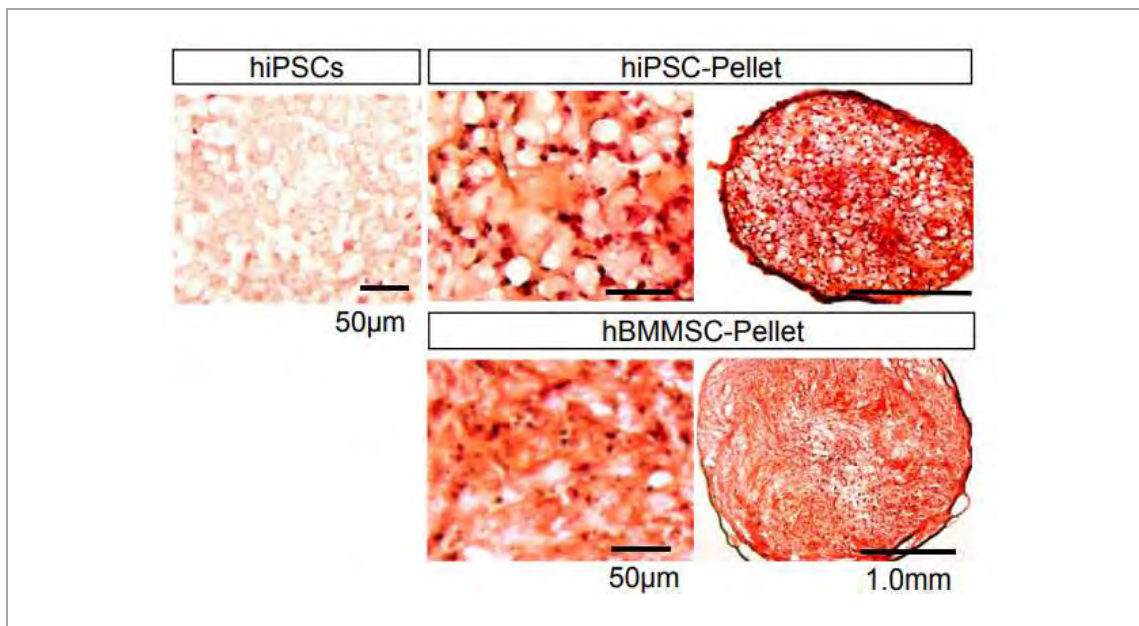


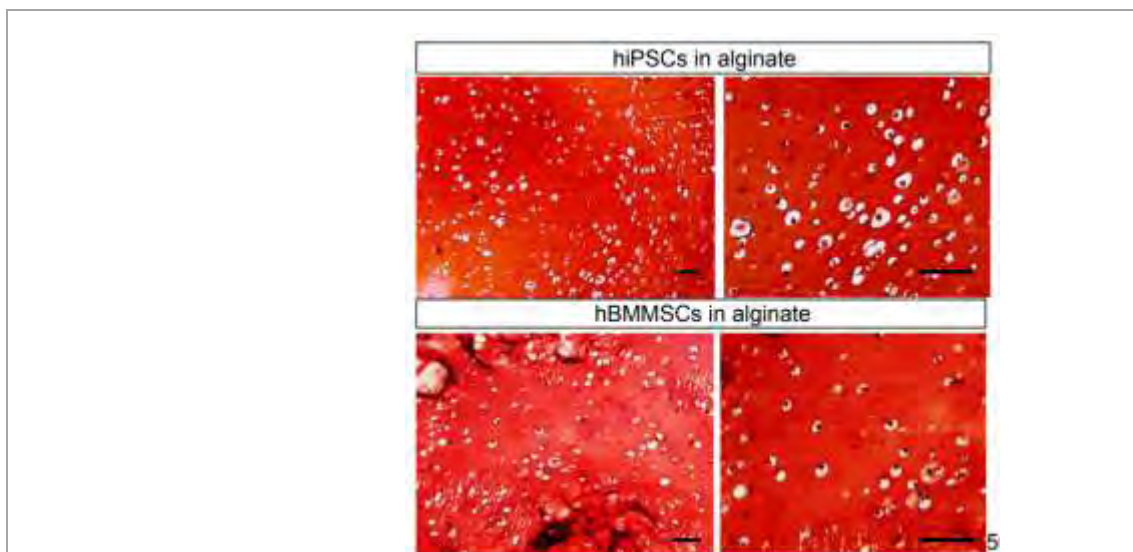
Εικόνα 12: (A-B) Σχηματισμός από εμβρυοειδή σώματα. Κάθε σταγόνα περιέχει  $2-5 \times 10^3$  κύτταρα. (C) συσσωρεύσεις από iPSCs σε ικρίωμα. (D) τα αποτελέσματα των τεστ CCK-8 δείχνουν ότι τα ικρίωματα ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

© Liu, J. *et al.* (2014) 'The effect of 3D nanofibrous scaffolds on the chondrogenesis of induced pluripotent stem cells and their application in restoration of cartilage defects.', *PloS one. Public Library of Science*

**Το 2014 ο Κο και οι συνεργάτες του** απέδειξαν την χονδρογενετική ικανότητα στο εργαστήριο (in vitro) και την επιδιορθωτική ικανότητα σε ζωντανό οργανισμό (in vivo) των ανθρώπινων πολυδύναμων επαγόμενων βλαστοκυττάρων (hiPSCs) σε έλλειμμα χόνδρου. Όσον αφορά την χονδρογενετική ικανότητα των ανθρώπινων iPSCs, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση χονδρογενετικών δεικτών στα επαγόμενα βλαστοκύτταρα

ήταν σχετικά υψηλότερη από αυτή των μεσεγχεματικών κυττάρων του μυελού των οστών. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρισδιάστατα εμβρυοειδή σώματα (3D Embryoid Bodies) ως ενδιάμεσο μέσο για τη διαφοροποίηση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε καλλιέργεια ικανή να επάγει χονδρογένεση με δυο διαφορετικούς τρόπους: σε συμπυκνωμένα iPSCs και σε υδρογέλη αλγινικού οξέος. Έπειτα εμφυτεύτηκαν ανθρώπινα iPSCs, ικανά να επαχθούν σε χονδροκύτταρα, μέσα σε οστεοχόνδρινα ελλείμματα, εντός της επιγονατίδας ανοσοκατεσταλμένου αρουραίου και η κατάσταση των ελλειμμάτων αξιολογήθηκε 12 εβδομάδες μετά. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι στα ελλείμματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα συμπυκνωμένα iPSCs και ο συνδυασμός iPSCs-υδρογέλη δημιουργήθηκε λείος ιστός με καλή αποκατάσταση της αρθρικής επιφάνειας. Απεναντίας, στα ελλείμματα που χρησιμοποιήθηκε μόνο ο μάρτυρας και η υδρογέλη ξεχωριστά υπήρξε ελάχιστο δείγμα αποκατάστασης του χόνδρου (Ko *et al.*, 2014). Παρόλη την επιτυχημένη επιδιόρθωση των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων με τη βοήθεια εξελιγμένων βιοχημικών μέσων, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες μέχρι να εφαρμοστούν τα κύτταρα αυτά στην κλινική πράξη [Εικόνα 13].





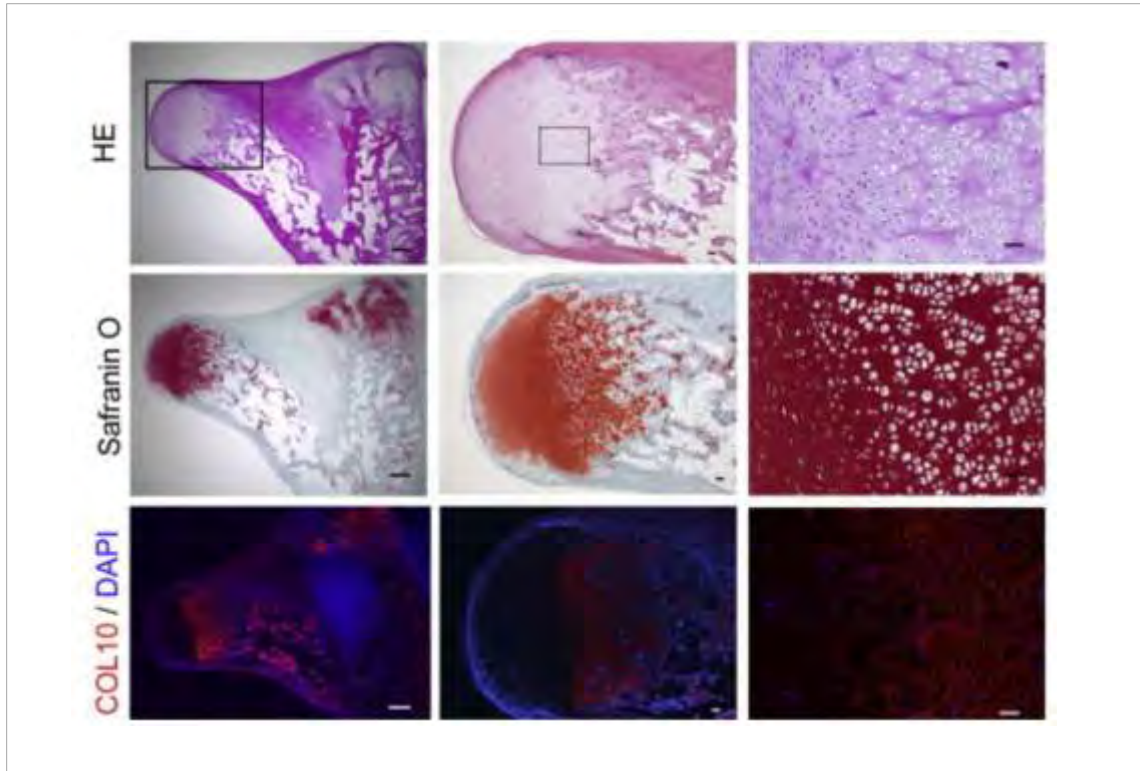
Εικόνα 13: Σύγκριση ανθρώπινων iPSCs (hiPSCs) με ανθρώπινα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών (hBMMSCs) μετά από 21 μέρες. Χρώση με σαφρανίνη σε χονδρογενή καλλιέργεια και σε γέλη αλγινικού οξέος.

© Ko, J.-Y. et al. (2014) 'In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells', *Biomaterials*

**Το 2015 ο Yamashita και οι συνεργάτες του** ανέπτυξαν υαλοειδή χόνδρο χωρίς ικρίωμα από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hiPSCs), τα οποία αφού εμφυτεύτηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ζώα, δεν σχημάτισαν ούτε τεράτωμα αλλά ούτε και έκτοπο ιστό (Yamashita *et al.*, 2015).

Αναλυτικότερα, η έρευνα αυτή κατέδειξε ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι δυνατόν να παράγουν αρθρικό χόνδρο, ο οποίος (i) να λειτουργεί ως γνήσιος χόνδρος σε έναν ζωντανό οργανισμό (in vivo), (ii) να ενσωματώνεται στον παρακείμενο προϋπάρχοντα χόνδρο και (iii) να μην υφίσταται σχηματισμό τερατώματος ή έκτοπου ιστού μετά από εμφύτευση των βλαστοκυττάρων σε ανοσοκατεσταλμένα ζώα.

Αρχικά, αποδείχτηκε ότι τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι σε θέση να επιβιώσουν και να σχηματίσουν αρθρικό ιστό, είτε υποδόρια, είτε ορθοτοπικά χωρίς τον σχηματισμό τερατώματος ή έκτοπου ιστού. Συγκεκριμένα, η υποδόρια εμφύτευση επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) δημιούργησε υαλοειδή χόνδρο με κολλαγόνο τύπου II, το οποίο είναι το κατεξοχήν συστατικό της εξωκυττάριας μάζας [Εικόνα 14].



Εικόνα 14: Παρατηρήσεις από hiPSCs την 42η μέρα, εμφυτευμένα υποδόρια σε ανοσοκατεσταλμένο ποντικό. Χρώση με ηωσίνη-αιματοξυλίνη και σαφρανίνη. Οι μεγεθυμένες εικόνες απεικονίζονται στα δεξιά άκρα (μπάρα κλίμακας αριστερά 500  $\mu\text{m}$ , μέση και δεξιά 50  $\mu\text{m}$ ).

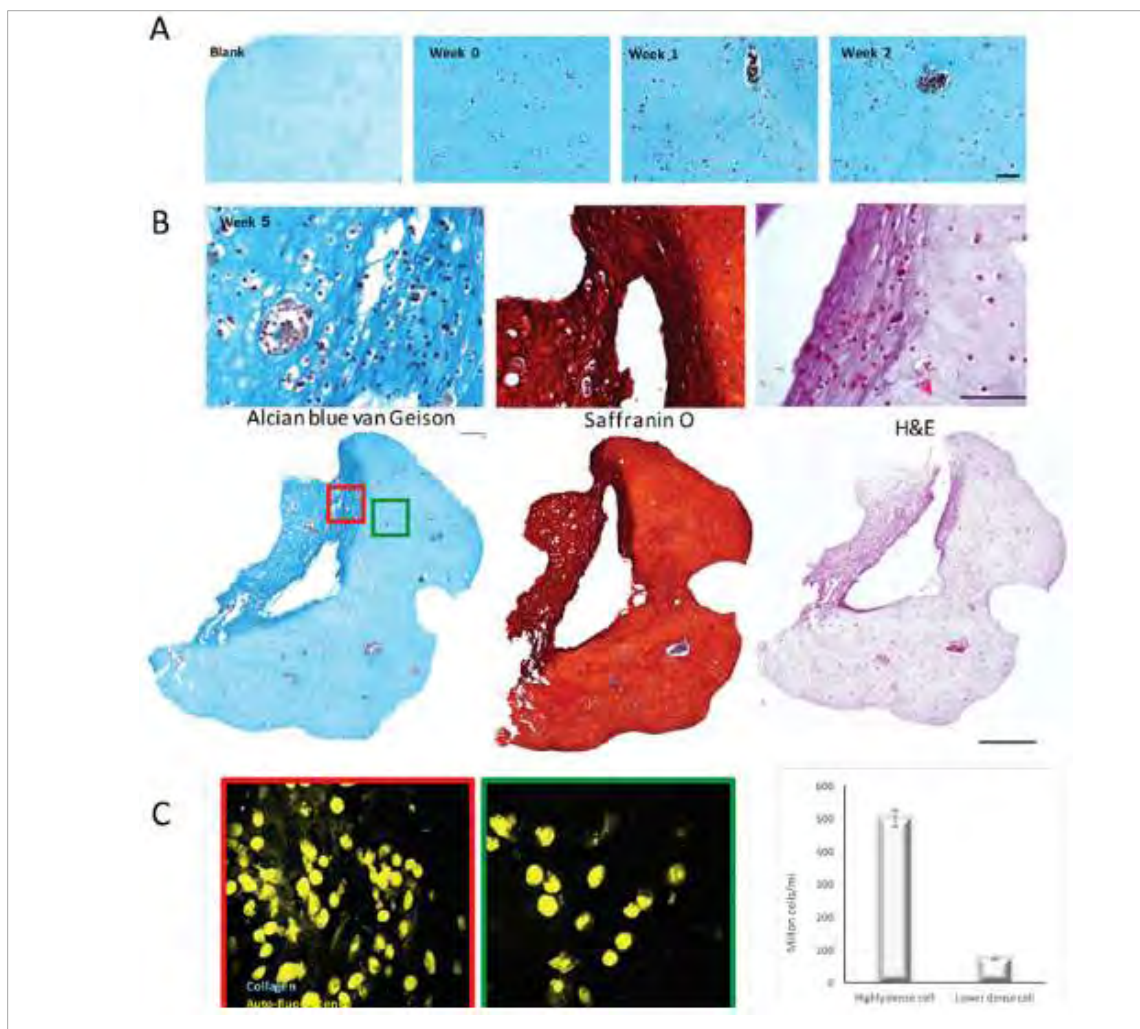
© Yamashita, A. et al. (2015) 'Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs.', *Stem cell reports*

Επιπρόσθετα, η εμφύτευση πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε ελαττωματικές αρθρώσεις ανοσοκατεσταλμένων αρουραίων κατέδειξε ότι ο νέος ιστός επιβιώνει και μάλιστα δύναται να ενσωματωθεί στον προϋπάρχοντα χόνδρο. Ανάλογο πείραμα έγινε και σε μεγαλύτερα ζώα, όπου μετά από εμφύτευση iPSCs σε παθολογικές αρθρώσεις χοιριδίων, τα βλαστοκύτταρα επιβίωσαν και μάλιστα επιδιόρθωσαν τις αρθρώσεις. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των πειραμάτων ήταν ότι κανένα από τα ανοσοκατεσταλμένα ζώα δεν ανέπτυξε όγκο ή έκτοπο ιστό (Yamashita *et al.*, 2015). Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τα ανθρώπινα πολυδύναμα επαγόμενα βλαστοκύτταρα αποτελούν πιθανόν μια βιώσιμη πηγή κυττάρων για την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου.

Για τη δημιουργία αρθρικού ιστού χωρίς ικρίωμα από τα iPSCs, έγινε η μεταφορά των βλαστοκυττάρων σε τρισδιάστατο εναιώρημα καλλιέργειας. Τελικά φάνηκε ότι με αυτό

το είδος καλλιέργειας διευκολύνεται η έκφραση δεικτών υπεύθυνων για τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα, ενώ παράλληλα εξαλείφονται τα μη χονδροκύτταρα, ενισχύοντας έτσι την καθαρότητα του χόνδρου.

Μια πρωτοπόρα προσέγγιση για την εφαρμογή της ιστικής μηχανικής στον αρθρικό ιστό είναι η τρισδιάστατη βιοτύπωση (3D bioprinting) επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) με ένα βιομελάνι κυτταρίνης σε ένα καλλιεργητικό μέσο που μιμείται αρθρικό χόνδρο, σε συνδυασμό με ανθρώπινα χονδροκύτταρα. Αυτή η τρισδιάστατη αποτύπωση είναι μια πολύ ακριβής μέθοδος, η οποία επιτρέπει τη διανομή των κυττάρων στο βιοϋλικό με τέτοιο τρόπο ώστε να μοιάζει στην μικροαρχιτεκτονική των ιστών. **Η ομάδα του Nguyen το 2017** χρησιμοποίησε αυτή τη μέθοδο, όπου τύπωσαν με βιομελάνι μείγμα ανθρώπινων iPSCs με χονδροκύτταρα σε καλλιεργητικό μέσο που επάγει τη χονδρογενή διαφοροποίηση. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν ότι μετά από την 3D βιοτύπωση, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούσαν να διατηρήσουν τον πολυδυναμικό φαινότυπο τους και μάλιστα παρατηρήθηκε σχηματισμός αρθρικού ιστού που εξέφρασε κολλαγόνο τύπου II ύστερα από 5 εβδομάδες σε καλλιέργεια (Nguyen *et al.*, 2017) [Εικόνα 15].



Εικόνα 15: (A) 3D βιοτύπωση αρθρικού ιστού (χρώση με αλκαλικό μπλε, σαφρανίνη και ηωσίνη-αιματοζυλίνη) (μπάρα κλίμακας: 100  $\mu\text{m}$ ). (B) Τρισδιάστατα 3D-βιοτυπωμένα χονδροκύτταρα, μεγεθυμένα στην άνω σειρά και ολόκληρη η δομή στην κάτω σειρά (μπάρα κλίμακας: 100  $\mu\text{m}$  έως 500  $\mu\text{m}$ ). (C) Περιοχές που αντιστοιχούν στα κόκκινα και πράσινα κουτιά της εικόνας (B), δείχνουν την υψηλή πυκνότητα κυττάρων (κίτρινο χρώμα) και από ίνες κολλαγόνου (μπάρα κλίμακας 50  $\mu\text{m}$ ).

© Nguyen, D. et al. (2017) 'Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink.', *Scientific reports*.

Άλλη πιθανή θεραπευτική προσέγγιση του αρθρικού χόνδρου με πολυδύναμα επαγόμενα βλαστοκύτταρα περιλαμβάνει την χρήση των εξωσωμάτων. Τα εξωσωμάτια είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια που εκκρίνονται από τα κύτταρα με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης και συντελούν στην διακυττάρια επικοινωνία. Έχουν διάμετρο 40-100

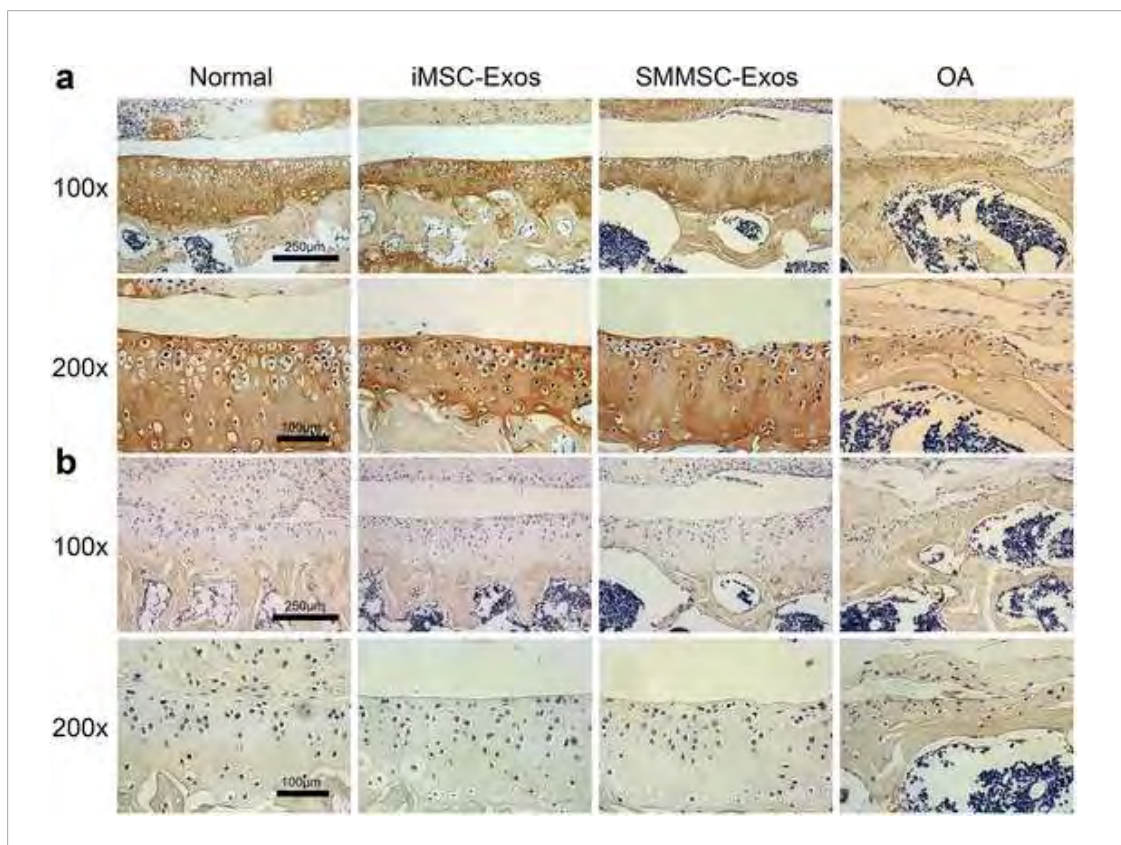


nm και περιέχουν πρωτεΐνες και παράγοντες, που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μετά από συγκεκριμένα ερεθίσματα (Théry, 2011).

**Η έρευνα των Yu Zhu και των συνεργατών του το 2017** συνέκρινε την αποτελεσματικότητα των εξωσωμάτων παραγόμενων από μεσεγχυματικά κύτταρα της αρθρικής μεμβράνης (synovial membrane MSCs exosomes, SMMSC-Exos) με την αποτελεσματικότητα των εξωσωμάτων από μεσεγχυματικά κύτταρα παραγόμενα από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cell-derived MSCs exosomes, iMSC-Exos) για την θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας (Zhu *et al.*, 2017). Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα της αρθρικής μεμβράνης λόγω της κοινής κυτταρικής καταβολής που έχουν με τα χονδροκύτταρα καθώς και του ρόλου τους στην αναστολή της επιδείνωσης οστεοαρθρίτιδας σε αρουραίο (Archer, Dowthwaite and Francis-West, 2003) (Ozeki *et al.*, 2016).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες για τη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας (MSC-based therapies). Η αποτελεσματικότητα αυτού του είδους της θεραπείας έγκειται στην παρακρινή έκκριση τροφικών παραγόντων των μεσεγχυματικών κυττάρων, όπου μαζί με τα εξωσωμάτια μπορούν να συνεισφέρουν στην επιδιόρθωση των ιστών (Liang *et al.*, 2014).

Αρχικά, η ομάδα του Yu Zhu παρήγαγε μεσεγχυματικά κύτταρα από πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iMSCs) και από κύτταρα της αρθρικής μεμβράνης (SMMSCs). Στη συνέχεια ενέθηκαν τα iMSC-Exos και τα SMMSC-Exos ενδοαρθρικά σε ποντίκια πάσχοντα από οστεοαρθρίτιδα. Χρησιμοποιώντας τον ίδιο αριθμό εξωσωμάτων, τόσο τα iMSC-Exos όσο και τα SMMSC-Exos μείωσαν την οστεοαρθρίτιδα αυτού του ζωικού μοντέλου, αλλά τα iMSC-Exos είχαν ανώτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα συγκριτικά με τα SMMSC-Exos. Επιπρόσθετα, η ιστολογική ανάλυση κατέδειξε ότι ενώ και τα δυο είδη εξωσωμάτων προκαλούν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, τα iMSC-Exos είχαν μεγαλύτερη επίδραση από ότι τα SMMSC-Exos (Zhu *et al.*, 2017) [Εικόνα 16].



Εικόνα 16: Ανοσοϊστοχημική ανάλυση. (α) Το κολλαγόνο τύπου II του αρθρικού χόνδρου απεικονίζεται με καφέ απόχρωση. Ειδικά, στα μεσεγχυματικά κύτταρα από την αρθρική μεμβράνη (SMMSC-Exos) το κολλαγόνο εκφράζεται λιγότερο συγκριτικά με τα μεσεγχυματικά κύτταρα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iMSC-Exos). (β) Χρώση κολλαγόνου τύπου I. Το κολλαγόνο τύπου I βρέθηκε μόνο στα οστεοαρθριδικά κύτταρα (OA).

© Zhu, Y. et al. (2017) 'Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis', *Stem Cell Research & Therapy*.

Επομένως φαίνεται ότι τα παραγόμενα από πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μεσεγχυματικά κύτταρα (iPSC-derived MSCs, iMSCs) και τα εξωσωμάτια αποτελούν δυνητικά εργαλεία για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου, με τα αντίστοιχα προτερήματά τους. Από την μια πλευρά, τα iMSCs δεν προκαλούν ανοσοαπόκριση ούτε και ηθικά ζητήματα όσον αφορά την χρήση τους, καθώς προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή. Από την άλλη πλευρά, τα εξωσωμάτια που εκκρίνονται από τα βλαστοκύτταρα αποτελούν ένα ιδανικό μέσο στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής χωρίς τη συμμετοχή κυττάρων (cell-free regenerative medicine) (Burke et al., 2016).

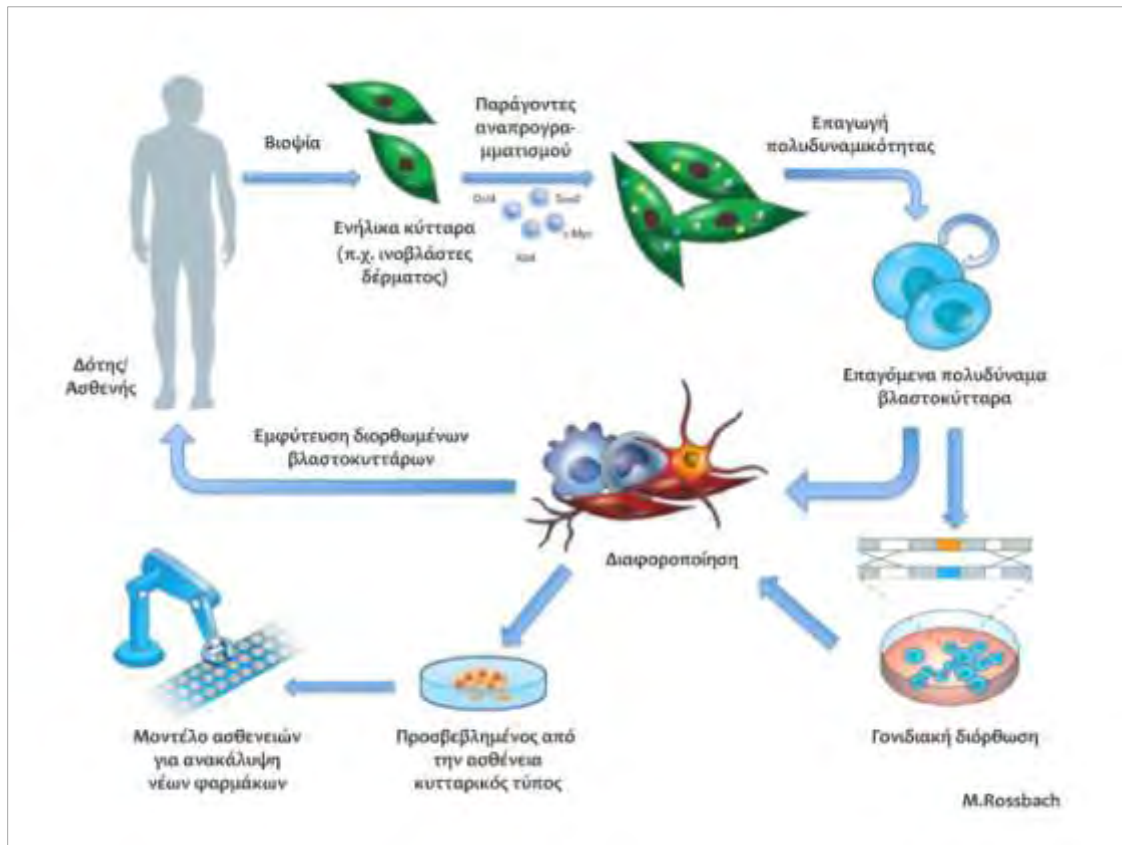
**Το 2019 η ομάδα του Kawata** συνδύασε δυο μικρομοριακές ενώσεις για να επάγει τη διαφοροποίηση επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε χονδροκύτταρα χωρίς καλλιεργητικό μέσο και εξέτασε το ενδεχόμενο των χονδροκυττάρων να σχηματίσουν αρθρικό ιστό *in vivo*. Αρχικά, έγινε επαγωγή των hiPSCs σε χονδροκύτταρα με τη διαμεσολάβηση δυο μορίων, συγκεκριμένα ενός αναστολέα μιας κινάσης (glycogen synthase kinase 3 inhibitor, GSK3 inhibitor) και ενός αγωνιστή του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptor, RAR agonist). Έπειτα εμφύτευσαν τα διαφοροποιημένα από τα μικρομόρια hiPSCs σε υποδόριο ιστό και σε αρθρικό ελαττωματικό ιστό από ανοσοκατεσταλμένο ποντικό (NOD/SCID mice) για να αξιολογήσουν την ωρίμανση του αρθρικού χόνδρου *in vivo*. Μέσα σε 7 περίπου μέρες και στα δυο είδη πειραμάτων το αποτέλεσμα ήταν ίδιο: υαλοειδής ιστός με λειαντική επιφάνεια σχηματίστηκε στα σημεία εμφύτευσης των μοριδίων, ενώ δεν υπήρξαν σημάδια από σχηματισμό τερατώματος (Kawata *et al.*, 2019).

Το πρωτόκολλο αυτό παρήγαγε πιο ομοιογενή διαφοροποίηση επαγόμενων βλαστοκυττάρων συγκριτικά με την έρευνα των Yamashita, όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταροκίνες στις καλλιέργειες, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην άμεση κυτταρική ρύθμιση των μικρών μορίων σε σχέση με την περίπλοκη μεταγωγή σήματος που συμβαίνει με την αλληλεπίδραση των κυτταροκινών (Yamashita *et al.*, 2015). Ωστόσο και στις δυο έρευνες παρατηρήθηκε σχηματισμός των χαρακτηριστικών στρωμάτων του αρθρικού χόνδρου.

Αυτές οι μικρομοριακές ενώσεις χαρακτηρίζονται από ευκολία στη χρήση, απελευθερώνονται εύκολα στα κύτταρα, δεν προκαλούν ανοσογονικότητα και ρυθμίζεται άμεσα η συγκέντρωσή τους (Araoka *et al.*, 2014). Επομένως η χρήση μικρών μορίων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για απεριόριστη πηγή κυττάρων για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου με χαμηλό κόστος, συνδυάζοντας την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων με τις κατάλληλες τεχνικές ιστικής μηχανικής.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη στιγμή που ο Yamanaka και οι συνεργάτες του προκάλεσαν την επαγωγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων με την εισαγωγή τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs) βρίσκονται στο επίκεντρο πολλών μελετών. Χαρακτηρίζονται από πολυδυναμικότητα, οπότε μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο, από μειωμένη ανοσιακή απόκριση, καθώς προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή και δεν παρουσιάζουν ηθικά ζητήματα, σε αντίθεση με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006).



Εικόνα 17: Μελλοντικές εφαρμογές των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων  
© [www.eurostemcell.org](http://www.eurostemcell.org)

Τα κύτταρα αυτά χάρη στις ιδιότητες τους αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την αναγεννητική ιατρική (regenerative medicine), για την μηχανική των ιστών (tissue engineering) καθώς και για την κατανόηση της βιολογίας των ασθενειών μέσα από τη διαλογή των κατάλληλων φαρμάκων ανάλογα με τον ασθενή (drug screening).

Ειδικότερα με τη χρήση της επιστήμης της ιατρικής θα αρχίζει να γίνεται εξατομικευμένη (patient-precised medicine), λαμβάνοντας υπόψη τον ασθενή ως μια ξεχωριστή οντότητα με τις ιδιαιτερότητες του (Shi *et al.*, 2017) [Εικόνα 17].

Η επιγενετική φαίνεται να συντελεί στην ποικιλομορφία των iPSCs και δη η μεθυλίωση του DNA. Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, όσον αφορά το μοτίβο μεθυλίωσης του DNA, χαρακτηρίζονται από ετερογένεια, διότι αφενός διατηρούν την επιγενετική μνήμη από τα γονεϊκά κύτταρα από τα οποία προέρχονται και αφετέρου κατά τον αναπρογραμματισμό τους υφίστανται παροδική υπερμεθυλίωση του DNA και τελικά τείνουν να ομοιάσουν τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα. Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά, οι διάφορες θέσεις μεθυλίωσης των iPSCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως επιγενετικοί δείκτες για την αξιολόγηση των ανθρώπινων βλαστοκυττάρων για μελλοντικές θεραπευτικές εφαρμογές (Kim and Costello, 2017).

Επωφελούμενοι λοιπόν από την ιδιαίτερη φύση των iPSCs και τη συμβολή της επιγενετικής, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στην αποκατάσταση των ιστών και συγκεκριμένα του αρθρικού χόνδρου. Όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα στην εργασία, ο αρθρικός ιστός χαρακτηρίζεται από απουσία αγγείων και νεύρων, γεγονός που δικαιολογεί τη μειωμένη ικανότητα ανανέωσης του μετά από έναν τραυματισμό. Βασιζόμενοι στην παραπάνω ιδιότητα του αρθρικού ιστού, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα φαίνονται ιδεατή λύση για την επιδιόρθωση κακώσεων του.

Οι πρώτες προσπάθειες έγιναν το 2012 από δυο ομάδες ερευνητών, οι οποίες δοκίμασαν την επιδιορθωτική ικανότητα των iPSCs στο εργαστήριο (in vitro). Συγκεκριμένα, η ομάδα του Diekman χρησιμοποίησε κεκαθαμένα, ικανά να επαχθούν σε χονδροκύτταρα, επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα in vitro και κατάφερε αποκατάσταση του αρθρικού ιστού σε καλλιέργεια, αποδεικνύοντας τον ρόλο των iPSCs στη θεραπεία αλλά και σε ιστικά μοντέλα (Diekman *et al.*, 2012). Από την άλλη μεριά η ομάδα του Wei χρησιμοποίησε ανθρώπινα οστεοαρθριτιδικά κύτταρα για τη δημιουργία πολυδύναμων επαγόμενων βλαστοκυττάρων, με τη βοήθεια ικρίωματος με ευεργετικά αποτελέσματα, τονίζοντας έτσι την ωφέλεια των iPSCs τόσο στην ιστική μηχανική, όσο και στη μελλοντική αντικατάσταση παθολογικών κυττάρων (Wei *et al.*, 2012).

Βέβαια, τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα τα επιθυμητά. Η ομάδα του Uto μπορεί να πέτυχε επιδιόρθωση αρθρικών και οστικών ελλειμμάτων και συντήρηση τους με την εισαγωγή επαγόμενων βλαστοκυττάρων σε υδρογέλη από κολλαγόνο επί 8 εβδομάδες, ωστόσο, σε κάποιες περιοχές του χόνδρου παρατηρήθηκε σχηματισμός τερατώματος. Πιθανώς το γεγονός αυτό να μπορούσε να αποφευχθεί με *in vitro* διαφοροποίηση των iPSCs πριν την εμφύτευση (Uto *et al.*, 2013).

Επιτυχής ήταν ο συνδυασμός της χονδρογενετικής ικανότητας των iPSCs *in vitro* με την επιδιορθωτική ικανότητα των iPSCs *in vivo* για την ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου, τόσο σε υποδύρια όσο και σε ορθοτοπική εμφύτευση των iPSCs σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια με τη συνεισφορά εξελιγμένων βιοχημικών μέσων (Ko *et al.*, 2014).

Αξιοσημείωτο ήταν το πείραμα που διενέργησε η ομάδα του Yamashita, η οποία μόνο *in vivo* και χωρίς τη χρήση ικρίωματος, προκάλεσε από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hiPSCs) την ανάπλαση αρθρικού χόνδρου υποδύρια, ορθοτοπικά σε ποντίκια αλλά και σε μεγαλύτερα ζώα, χωρίς μάλιστα να προκαλέσει τεράτωμα ή έκτοπο ιστό. Η μέθοδος αυτή προσφέρει ελπίδες για την εφαρμογή των iPSCs στην κλινική πράξη, καθόσον ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων, ο σχηματισμός τερατώματος, δεν εμφανίστηκε (Yamashita *et al.*, 2015).

Πρωτοπόρα είναι και η εφεύρεση της τρισδιάστατης βιοτύπωσης (3D bioprint) των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) με χονδροκύτταρα σε βιοϋλικό. Η νέα αυτή τεχνολογία επιτρέπει την ανάπλαση των αρθρικών δομών από αυτόλογα κύτταρα διεσπαρμένα σε ένα βιοσυμβατό υλικό που μιμείται την πρωτότυπη δομή, με υψηλή ακρίβεια. Αυτή τη μέθοδο χρησιμοποίησε η ομάδα του Nguyen, όπου κατάφερε *in vitro* τη βιοτύπωση και τελικά την διαφοροποίηση των iPSCs σε χονδροκύτταρα (Nguyen *et al.*, 2017). Αν και το πείραμα της ομάδας του Nguyen είναι ακόμα σε πρόδρομο στάδιο, η 3D βιοτύπωση με επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορεί να είναι η μελλοντική θεραπεία για την επιδιόρθωση φθαρμένων αρθρώσεων.

Άλλη πιθανή θεραπευτική εφαρμογή των iPSCs στην ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου είναι με τη χρήση εξωσωμάτων που εκκρίνονται από τα βλαστοκύτταρα αυτά. Τα κυστίδια αυτά υπερέχουν έναντι άλλων μεθόδων επιδιόρθωσης, διότι δεν προκαλούν

ανοσοαπόκριση αλλά ούτε και ηθικά διλήμματα και αποτελούν ιδανικό μέσο στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής χωρίς τη συμμετοχή κυττάρων (cell-free regenerative medicine) (Burke *et al.*, 2016). Η εφαρμογή αυτών των σωματίων έγινε από την ομάδα του Yu Zhu, η οποία συνέκρινε τα εξωσωμάτια που εκκρίθηκαν από μεσεγχυματικά κύτταρα της αρθρικής μεμβράνης με τα εξωσωμάτια που εκκρίθηκαν από μεσεγχυματικά κύτταρα παραγόμενα από iPSCs. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν ότι με τα εξωσωμάτια που προέκυψαν από τα iPSCs υπήρξε μεγαλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα *in vivo* σε πειραματόζωα (Zhu *et al.*, 2017).

Τέλος, και οι μικρομοριακές ενώσεις φαίνεται να υποβοηθούν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα στην επιδιόρθωση του αρθρικού χόνδρου, μέσω επαγωγής τους σε χονδροκύτταρα. Τα προτερήματα των μικρομοριακών ενώσεων είναι η ευκολία στη χρήση τους, η απουσία ανοσογονικότητας και η εύκολη ρύθμιση της συγκέντρωσης τους (Araoka *et al.*, 2014). Τις ιδιότητες αυτές επωφελήθηκαν ο Kawata και η ομάδα του, οι οποίοι κατάφεραν με τη χρήση αυτών των μορίων να δημιουργήσουν *in vivo* από ανθρώπινα iPSCs υαλοειδή χόνδρο που ενσωματώνεται στον προϋπάρχοντα χόνδρο χωρίς τη δημιουργία τερατώματος (Kawata *et al.*, 2019). Μάλιστα το πρωτόκολλο αυτό δημιούργησε πιο ομοιογενή διαφοροποίηση επαγόμενων βλαστοκυττάρων συγκριτικά με την έρευνα των Yamashita, όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταροκίνες στις καλλιέργειες, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην άμεση κυτταρική ρύθμιση των μικρών μορίων σε σχέση με την περίπλοκη μεταγωγή σήματος που συμβαίνει με την αλληλεπίδραση των κυτταροκινών. Επομένως η χρήση μικρών μορίων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο συνδυάζοντας την διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων με τις κατάλληλες τεχνικές ιστικής μηχανικής.

Ωστόσο, πολλά είναι τα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν μέχρι την εφαρμογή των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στην κλινική πράξη. Αρχικά πρέπει να βρεθεί η κατάλληλη μέθοδος αναπρογραμματισμού των iPSCs και να υπερκεραστεί το ρίσκο σχηματισμού τερατώματος που επακολουθεί. Παραδείγματος χάριν, η εισαγωγή των iPSCs σε ιικούς φορείς μπορεί να προκαλέσει τυχαία ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα και έτσι να προκληθεί σχηματισμός όγκου. Αντίθετα, ο αναπρογραμματισμός των επαγόμενων βλαστοκυττάρων με την χρήση επισωματικών

δεικτών δεν προκαλεί γενωμική ενσωμάτωση και πιθανώς να είναι πιο ασφαλής η χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική (Tsumaki, Okada and Yamashita, 2015).

Τα πολυδύναμα επαγόμενα βλαστοκύτταρα, στα πλαίσια της πολυδυναμικότητας που τα χαρακτηρίζει, ενέχουν το ρίσκο σχηματισμού τερατώματος. Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν πειράματα που απέδειξαν την απουσία σχηματισμού τερατώματος. Συγκεκριμένα, η έρευνα του Yamashita απέδειξε ότι τα ανθρώπινα iPSCs μπορούν να επιδιορθώσουν τον αρθρικό χόνδρο *in vivo* χωρίς σχηματισμό τερατώματος ή έκτοπου ιστού. Επίσης, η χρήση μικρομοριακών ενώσεων που χρησιμοποίησε η ομάδα του Kawata δεν προκαλεί τερατώματα, καθώς τα μόρια αυτά επιλεκτικά απαλείφουν τα αδιαφοροποίητα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Έτσι οι μικρομοριακές ενώσεις αποτελούν μια βιώσιμη στρατηγική για ασφαλή θεραπεία βασισμένη στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (stem cell-based therapy) (Lee *et al.*, 2013).

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα θεωρούνταν μέχρι πρότινος ασφαλή για αυτόλογη μεταμόσχευση, καθιστώντας τα έτσι ως την ιδανική πηγή για μεταμοσχεύσεις χωρίς ανάγκη ανοσοκαταστολής του ασθενή. Ωστόσο αυτή η υπόθεση αμφισβητήθηκε όταν η ομάδα του Zhao ανακάλυψε ότι μετά από εμφύτευση των iPSCs σε συγγενικό ξενιστή, προκλήθηκε T-κυτταροεξαρτώμενη αντίδραση (Zhao *et al.*, 2011). Εν τέλει, η κατάσταση αυτή αποδόθηκε σε μη επαρκή αναπρογραμματισμό των επαγόμενων βλαστοκυττάρων δυο χρόνια αργότερα, καθώς η ομάδα του Araki έδειξε ότι η εμφύτευση διαφοροποιημένων κυττάρων από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα προκαλεί χαμηλή ανοσογονικότητα (Araki *et al.*, 2013). Επιπρόσθετα, τα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν εξωσωμάτια και μικρομοριακές ενώσεις για ανάπλαση του αρθρικού χόνδρου δεν εμφάνισαν ανοσογονικότητα, παρέχοντας έτσι αρκετές ασφαλείς εναλλακτικές για τη χρήση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων στον αρθρικό ιστό.

Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω πιθανότητα, προτάθηκε η δημιουργία πρότυπης τράπεζας επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων με βάση το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC). Το ενδεχόμενο αυτό μπορεί να λύσει το ρίσκο της ανοσογονικότητας από αυτόλογη μεταμόσχευση iPSCs αλλά κυρίως να μειώσει το κόστος της βασισμένης στα επαγόμενα βλαστοκύτταρα θεραπείας. Συγκεκριμένα, η παραγωγή μιας σειράς iPSCs κυττάρων κοστίζει περί τα 15.000 \$, ενώ το κόστος



δημιουργίας ιστού από iPSCs κατάλληλο για κλινική χρήση ανέρχεται στα 800.000 \$ (Bravery, 2015). Η τράπεζα iPSCs για αλλογενή μεταμόσχευση κυττάρων έχει τη δυνατότητα να μειώσει αυτό το κόστος, καθώς μια παραγωγή κυττάρων αρκεί για να χρησιμοποιηθεί για πολλαπλούς ασθενείς. Επιπλέον, προσθέτοντας τις πρόσφατες εξελίξεις στην γονιδιωματική τροποποίηση, φαίνεται να είμαστε όλο και πιο κοντά στη δημιουργία «παγκόσμια» αποδεκτών iPSCs με καλύτερη ανοσιακή ανοχή.

Η μέθοδος της γονιδιωματικής τροποποίησης (gene editing) επιτρέπει την εισαγωγή γενετικών αλλαγών στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα σε καλώς ορισμένες θέσεις, συμπεριλαμβανομένων της διόρθωσης μιας γονιδιακής μετάλλαξης σε iPSCs ασθενών. Ιδιαίτερα, η τεχνολογία του CRISPR/Cas9 έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνών λόγω της απλότητας στη χρήση της αλλά κυρίως λόγω της υψηλής ακρίβειας της σε αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, παρέχοντας έτσι ένα πιο ασφαλές μέσο εφαρμογής των iPSCs στην κλινική πράξη (Ben Jehuda, Shemer and Binah, 2018).

Τέλος, πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη μοντελοποίηση των ασθενειών με βάση τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs-based disease modeling) είναι τα τρισδιάστατα οργανοειδή (3D organoids). Τα οργανοειδή αυτά δημιουργούνται από τον συνδυασμό βλαστοκυττάρων και iPSCs από ανθρώπους και ποντίκια. Ιδιαίτερα τα οργανοειδή από ανθρώπινα επαγόμενα βλαστοκύτταρα χρησιμοποιούνται ευρέως για θεραπευτικές εφαρμογές, καθώς μιμούνται την ενδογενή δομή ενός οργάνου. Έτσι, μελλοντικά αυτά τα βιοϋλικά μπορούν να συνδράμουν στην αποκατάσταση ιστών και οργάνων μετά από βλάβες.

Τα τελευταία 3 χρόνια είναι σε εξέλιξη αρκετές κλινικές μελέτες με τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Το 2014 έγινε η πρώτη κλινική δοκιμή με αυτόλογη εμφύτευση μελαγχρωστικών επιθηλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς διαφοροποιημένα από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα ασθενούς με εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Όμως τον επόμενο χρόνο τέθηκε η προσπάθεια σε αναμονή, καθώς παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις σε δεύτερο ασθενή που πραγματοποίησαν την ίδια εμφύτευση. Περιέργως, δεν υπήρχαν σημάδια απόρριψης του μοσχεύματος από τον πρώτο ασθενή ένα έτος μετά την εμφύτευση των κυττάρων (Mandai *et al.*, 2017).

Συνοψίζοντας, ελπιδοφόρο φαίνεται να είναι το μέλλον για την εφαρμογή των iPSCs στην κλινική πράξη και δη στον αρθρικό χόνδρο. Αρκετές είναι οι τρέχουσες κλινικές μελέτες και έχουν βρεθεί εναλλακτικές που φαίνεται να ξεπερνούν τα μέχρι τώρα εμπόδια. Ο συνδυασμός βιοτράπεζας αλλογενών iPSCs, με την πρόσφατη ανάπτυξη της γονιδιωματικής επιδιόρθωσης (gene editing) και την ανάπτυξη τρισδιάστατων οργανοειδών (3D organoids) μπορεί να κάνει τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μια σημαντική πηγή για εξατομικευμένη κυτταρική θεραπεία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts, B. *et al.* (2002) 'From DNA to RNA'. Garland Science. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/> (Accessed: 29 August 2019).
- Allen, N. D. *et al.* (1994) 'A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells.', *Development (Cambridge, England)*, 120(6), pp. 1473–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8050357> (Accessed: 11 June 2019).
- Allsopp, R. C. *et al.* (1992) 'Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), pp. 10114–10118. doi: 10.1073/pnas.89.21.10114.
- de Almeida, P. E. *et al.* (2014) 'Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance.', *Nature communications*. NIH Public Access, 5, p. 3903. doi: 10.1038/ncomms4903.
- Alshami, A. M. (2014) 'Knee osteoarthritis related pain: a narrative review of diagnosis and treatment.', *International journal of health sciences*, 8(1), pp. 85–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899883> (Accessed: 4 October 2019).
- Araki, R. *et al.* (2013) 'Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells', *Nature*, 494(7435), pp. 100–104. doi: 10.1038/nature11807.
- Araoka, T. *et al.* (2014) 'Efficient and Rapid Induction of Human iPSCs/ESCs into Nephrogenic Intermediate Mesoderm Using Small Molecule-Based Differentiation Methods', *PLoS ONE*. Edited by T. Akagi, 9(1), p. e84881. doi: 10.1371/journal.pone.0084881.
- Archer, C. W., Dowthwaite, G. P. and Francis-West, P. (2003) 'Development of synovial joints', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 69(2), pp. 144–155. doi: 10.1002/bdrc.10015.
- Avilion, A. A. *et al.* (2003) 'Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(1), pp. 126–40. doi: 10.1101/gad.224503.
- Bernecker, C. *et al.* (2019) 'Enhanced ex vivo generation of erythroid cells from human induced pluripotent stem cells in a simplified cell culture system with low cytokine support', *Stem Cells and Development*, p. scd.2019.0132. doi: 10.1089/scd.2019.0132.
- Bhaumik, S. R., Smith, E. and Shilatifard, A. (2007) 'Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis', *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(11), pp. 1008–1016. doi: 10.1038/nsmb1337.
- Bird, A. (2002) 'DNA methylation patterns and epigenetic memory.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(1), pp. 6–21. doi:

10.1101/gad.947102.

Blau, H. *et al.* (1985) 'Plasticity of the differentiated state', *Science*, 230(4727), pp. 758–766. doi: 10.1126/science.2414846.

Blau, H. M. and Baltimore, D. (no date) *Perspective Differentiation Requires Continuous Regulation*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2288865/pdf/jc1125781.pdf> (Accessed: 6 June 2019).

Blau, H. M., Chiu, C.-P. and Webster, C. (1983) 'Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons', *Cell*, 32(4), pp. 1171–1180. doi: 10.1016/0092-8674(83)90300-8.

Bodnar, A. G. *et al.* (1998) 'Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells', *Science*, 279(5349), pp. 349–352. doi: 10.1126/science.279.5349.349.

Boyer, L. A. *et al.* (2005) 'Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.', *Cell*. NIH Public Access, 122(6), pp. 947–56. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.

Bravery, C. A. (2015) 'Do Human Leukocyte Antigen-Typed Cellular Therapeutics Based on Induced Pluripotent Stem Cells Make Commercial Sense?', *Stem Cells and Development*, 24(1), pp. 1–10. doi: 10.1089/scd.2014.0136.

Briggs, R. and King, T. J. (1952) 'Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 38(5), pp. 455–63. doi: 10.1073/pnas.38.5.455.

Bromhall, J. D. (1975) 'Nuclear transplantation in the rabbit egg', *Nature*, 258(5537), pp. 719–722. doi: 10.1038/258719a0.

Burke, J. *et al.* (2016) 'Stem Cell-Derived Exosomes: A Potential Alternative Therapeutic Agent in Orthopaedics.', *Stem cells international*. Hindawi Limited, 2016, p. 5802529. doi: 10.1155/2016/5802529.

Cartwright, P. *et al.* (2005) 'Development', *Development*. The Company of Biologists Ltd, 130(12), pp. 2793–2808. doi: 10.1242/dev.00462.

Chin, M. H. *et al.* (2010) 'Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells.', *Cell stem cell*. NIH Public Access, 7(2), pp. 263–9. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.019.

Cibelli, J. B. (2002) 'Parthenogenetic Stem Cells in Nonhuman Primates', *Science*, 295(5556), pp. 819–819. doi: 10.1126/science.1065637.

Counter, C. M. *et al.* (1992) 'Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.', *The EMBO journal*, 11(5), pp. 1921–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1582420> (Accessed: 19 August 2019).

Cowan, C. A. *et al.* (2005) 'Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells', *Science*, 309(5739), pp. 1369–1373. doi: 10.1126/science.1116447.

Dean, W. *et al.* (1998) 'Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes.', *Development (Cambridge, England)*, 125(12), pp. 2273–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9584126> (Accessed: 11 June 2019).

Diekman, B. O. *et al.* (2012) 'Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(47), pp. 19172–7. doi: 10.1073/pnas.1210422109.

Do, J. T. and Schöler, H. R. (2004) 'Nuclei of Embryonic Stem Cells Reprogram Somatic Cells', *Stem Cells*. John Wiley & Sons, Ltd, 22(6), pp. 941–949. doi: 10.1634/stemcells.22-6-941.

Dover, J. *et al.* (2002) 'Methylation of Histone H3 by COMPASS Requires Ubiquitination of Histone H2B by Rad6', *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp. 28368–28371. doi: 10.1074/jbc.C200348200.

Drukker, M. *et al.* (2002) 'Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 99(15), pp. 9864–9. doi: 10.1073/pnas.142298299.

Egli, D. *et al.* (2007) 'Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes', *Nature*, 447(7145), pp. 679–685. doi: 10.1038/nature05879.

Ehrlich, M. *et al.* (no date) *Nucleic Acids Research Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC320645/pdf/nar00377-0225.pdf> (Accessed: 9 September 2019).

Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981) 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos', *Nature*, 292(5819), pp. 154–156. doi: 10.1038/292154a0.

Fernandez, P. C. *et al.* (2003) 'Genomic targets of the human c-Myc protein.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(9), pp. 1115–29. doi: 10.1101/gad.1067003.

Frank, S. R. *et al.* (2001) 'Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced

- acetylation of histone H4 and gene activation.’, *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(16), pp. 2069–82. doi: 10.1101/gad.906601.
- Frankel, M. S. (2000) ‘In Search of Stem Cell Policy’, *Science*, 287(5457), pp. 1397–1397. doi: 10.1126/science.287.5457.1397.
- Fry, C. J. and Peterson, C. L. (2001) ‘Chromatin remodeling enzymes: who’s on first?’, *Current biology : CB*. Elsevier, 11(5), pp. R185-97. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00090-2.
- Ghosh, Z. *et al.* (2010) ‘Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells.’, *PloS one*. Public Library of Science, 5(2), p. e8975. doi: 10.1371/journal.pone.0008975.
- Guenther, M. G. *et al.* (2010) ‘Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells’, *Cell Stem Cell*, 7(2), pp. 249–257. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.015.
- Gurdon, J. B. (1962) ‘Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells’, *Developmental Biology*. Academic Press, 4(2), pp. 256–273. doi: 10.1016/0012-1606(62)90043-X.
- Gurdon, J. B. and Byrne, J. A. (2003) ‘The first half-century of nuclear transplantation.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 100(14), pp. 8048–52. doi: 10.1073/pnas.1337135100.
- Gurdon, J. B. and Colman, A. (1999) ‘The future of cloning’, *Nature*, 402(6763), pp. 743–746. doi: 10.1038/45429.
- Gurdon, J. B. and Uehlinger, V. (1966) ‘“Fertile” Intestine Nuclei’, *Nature*, 210(5042), pp. 1240–1241. doi: 10.1038/2101240a0.
- Hemberger, M., Dean, W. and Reik, W. (2009) ‘Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington’s canal’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), pp. 526–537. doi: 10.1038/nrm2727.
- Hershey, A. D. and Chase, M. (1952) ‘INDEPENDENT FUNCTIONS OF VIRAL PROTEIN AND NUCLEIC ACID IN GROWTH OF BACTERIOPHAGE’, *The Journal of General Physiology*, 36(1), pp. 39–56. doi: 10.1085/jgp.36.1.39.
- Hochedlinger, K. and Jaenisch, R. (2002) ‘Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells’, *Nature*, 415(6875), pp. 1035–1038. doi: 10.1038/nature718.
- Huang, K. *et al.* (2014) ‘Neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells generated less autogenous immune response’, *Science China Life Sciences*, 57(2), pp. 162–170. doi: 10.1007/s11427-013-4598-6.

- Huber, M., Trattnig, S. and Lintner, F. (2000) ‘Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage’, *Investigative Radiology*, 35(10), pp. 573–580. doi: 10.1097/00004424-200010000-00003.
- Hwang, W. S. (2005) ‘Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts’, *Science*, 308(5729), pp. 1777–1783. doi: 10.1126/science.1112286.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) ‘Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals’, *Nature Genetics*, 33(S3), pp. 245–254. doi: 10.1038/ng1089.
- Ben Jehuda, R., Shemer, Y. and Binah, O. (2018) ‘Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9’, *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(3), pp. 323–336. doi: 10.1007/s12015-018-9811-3.
- Jiang, Y. *et al.* (2002) ‘Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow’, *Nature*, 418(6893), pp. 41–49. doi: 10.1038/nature00870.
- Kanatsu-Shinohara, M. *et al.* (2004) ‘Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis.’, *Cell*. Elsevier, 119(7), pp. 1001–12. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.011.
- Kawata, M. *et al.* (2019) ‘Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds.’, *Stem cell reports*. Elsevier, 13(3), pp. 530–544. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.07.012.
- Kim, J. K., Samaranayake, M. and Pradhan, S. (2009) ‘Epigenetic mechanisms in mammals.’, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Springer, 66(4), pp. 596–612. doi: 10.1007/s00018-008-8432-4.
- Kim, K. *et al.* (2010) ‘Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells.’, *Nature*. NIH Public Access, 467(7313), pp. 285–90. doi: 10.1038/nature09342.
- Kim, M. and Costello, J. (2017) ‘DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory’, *Experimental & Molecular Medicine*. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 49(4), p. e322. doi: 10.1038/EMM.2017.10.
- Kimura, H. *et al.* (2004) ‘Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells.’, *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 24(13), pp. 5710–20. doi: 10.1128/mcb.24.13.5710-5720.2004.
- Ko, J.-Y. *et al.* (2014) ‘In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells’, *Biomaterials*, 35(11), pp. 3571–3581. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.009.
- Kouzarides, T. (2007) ‘Chromatin modifications and their function.’, *Cell*. Elsevier, 128(4), pp. 693–705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Lachner, M., O’Sullivan, R. J. and Jenuwein, T. (2003) ‘An epigenetic road map for

- histone lysine methylation.’, *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 116(Pt 11), pp. 2117–24. doi: 10.1242/jcs.00493.
- Lee, M.-O. *et al.* (2013) ‘Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), pp. E3281–E3290. doi: 10.1073/pnas.1303669110.
- Li, Y. *et al.* (2005) ‘Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4’, *Blood*, 105(2), pp. 635–637. doi: 10.1182/blood-2004-07-2681.
- Liang, X. *et al.* (2014) ‘Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives’, *Cell Transplantation*, 23(9), pp. 1045–1059. doi: 10.3727/096368913X667709.
- Lister, R. *et al.* (2009) ‘Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences’, *Nature*, 462(7271), pp. 315–322. doi: 10.1038/nature08514.
- Lister, R. *et al.* (2011) ‘Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells.’, *Nature*. NIH Public Access, 471(7336), pp. 68–73. doi: 10.1038/nature09798.
- Liu, J. *et al.* (2014) ‘The effect of 3D nanofibrous scaffolds on the chondrogenesis of induced pluripotent stem cells and their application in restoration of cartilage defects.’, *PloS one*. Public Library of Science, 9(11), p. e111566. doi: 10.1371/journal.pone.0111566.
- Lu, C. C., Brennan, J. and Robertson, E. J. (2001) ‘From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo’, *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(4), pp. 384–392. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00208-2.
- Luger, K. *et al.* (1997) ‘Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution’, *Nature*, 389(6648), pp. 251–260. doi: 10.1038/38444.
- Maherali, N. *et al.* (2007) ‘Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.’, *Cell stem cell*. Elsevier, 1(1), pp. 55–70. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.014.
- Mandai, M. *et al.* (2017) ‘Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration’, *New England Journal of Medicine*, 376(11), pp. 1038–1046. doi: 10.1056/NEJMoal1608368.
- Masui, S. *et al.* (2007) ‘Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells’, *Nature Cell Biology*, 9(6), pp. 625–635. doi: 10.1038/ncb1589.
- Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B. L. M. (1992) ‘Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture’, *Cell*, 70(5), pp. 841–



847. doi: 10.1016/0092-8674(92)90317-6.

Meshorer, E. *et al.* (2006) ‘Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells.’, *Developmental cell*. NIH Public Access, 10(1), pp. 105–16. doi: 10.1016/j.devcel.2005.10.017.

Mitsui, K. *et al.* (2003) ‘The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.’, *Cell*. Elsevier, 113(5), pp. 631–42. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3.

Miura, K. *et al.* (2009) ‘Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines’, *Nature Biotechnology*, 27(8), pp. 743–745. doi: 10.1038/nbt.1554.

Muir, H. (1995) ‘The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules’, *BioEssays*, 17(12), pp. 1039–1048. doi: 10.1002/bies.950171208.

Nakatake, Y. *et al.* (2006) ‘Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells.’, *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 26(20), pp. 7772–82. doi: 10.1128/MCB.00468-06.

Nguyen, D. *et al.* (2017) ‘Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink.’, *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 658. doi: 10.1038/s41598-017-00690-y.

Nichols, J. *et al.* (1998) ‘Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.’, *Cell*. Elsevier, 95(3), pp. 379–91. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81769-9.

Nishino, K. *et al.* (2011) ‘DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time.’, *PLoS genetics*. Public Library of Science, 7(5), p. e1002085. doi: 10.1371/journal.pgen.1002085.

Nishino, K. and Umezawa, A. (2016) ‘DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells’, *Human Cell*, 29(3), pp. 97–100. doi: 10.1007/s13577-016-0139-5.

Niwa, H. *et al.* (1998) ‘Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3.’, *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 12(13), pp. 2048–60. doi: 10.1101/gad.12.13.2048.

Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A. G. (2000) ‘Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells’, *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 24(4), pp. 372–376. doi: 10.1038/74199.

Okano, M. *et al.* (1999) ‘DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.’, *Cell*, 99(3), pp. 247–57. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81656-6.

- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) 'Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells', *Nature*, 448(7151), pp. 313–317. doi: 10.1038/nature05934.
- Ooi, S. K. T. *et al.* (2007) 'DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA', *Nature*, 448(7154), pp. 714–717. doi: 10.1038/nature05987.
- Ozeki, N. *et al.* (2016) 'Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats', *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(6), pp. 1061–1070. doi: 10.1016/j.joca.2015.12.018.
- Patterton, D. and Wolffe, A. P. (1996) 'Developmental Roles for Chromatin and Chromosomal Structure', *Developmental Biology*, 173(1), pp. 2–13. doi: 10.1006/dbio.1996.0002.
- Plath, K. *et al.* (2003) 'Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation', *Science*, 300(5616), pp. 131–135. doi: 10.1126/science.1084274.
- Polo, J. M. *et al.* (2010) 'Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells', *Nature Biotechnology*, 28(8), pp. 848–855. doi: 10.1038/nbt.1667.
- Pradhan, S. *et al.* (1999) 'Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp. 33002–33010. doi: 10.1074/jbc.274.46.33002.
- Qiu, J. (2006) 'Unfinished symphony', *Nature*, 441(7090), pp. 143–145. doi: 10.1038/441143a.
- Ramsahoye, B. H. *et al.* (2000) 'Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), pp. 5237–5242. doi: 10.1073/pnas.97.10.5237.
- Reik, W. (2007) 'Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development', *Nature*, 447(7143), pp. 425–432. doi: 10.1038/nature05918.
- Rogers Kara and Fridovich-Keil L. Judith (2018) *epigenetics / Definition, Inheritance, & Disease / Britannica.com, Encyclopaedia Britannica*. Available at: <https://www.britannica.com/science/epigenetics> (Accessed: 16 August 2019).
- Rosner, M. H. *et al.* (1990) 'A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo', *Nature*, 345(6277), pp. 686–692. doi: 10.1038/345686a0.
- Rossetto, D., Avvakumov, N. and Côté, J. (2012) 'Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events.', *Epigenetics*. Taylor & Francis, 7(10), pp. 1098–108. doi: 10.4161/epi.21975.

- Rothbart, S. B. *et al.* (2012) ‘Association of UHRF1 with methylated H3K9 directs the maintenance of DNA methylation’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(11), pp. 1155–1160. doi: 10.1038/nsmb.2391.
- Santos-Rosa, H. *et al.* (2002) ‘Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3’, *Nature*, 419(6905), pp. 407–411. doi: 10.1038/nature01080.
- Schöler, H. R. *et al.* (1990) ‘New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4’, *Nature*, 344(6265), pp. 435–439. doi: 10.1038/344435a0.
- Seki, Y. *et al.* (2005) ‘Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice’, *Developmental Biology*. Academic Press, 278(2), pp. 440–458. doi: 10.1016/J.YDBIO.2004.11.025.
- Seoane, J., Le, H.-V. and Massagué, J. (2002) ‘Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage’, *Nature*, 419(6908), pp. 729–734. doi: 10.1038/nature01119.
- Shahbazian, M. D. and Grunstein, M. (2007) ‘Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation’, *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), pp. 75–100. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114.
- Shi, Y. *et al.* (2017) ‘Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress.’, *Nature reviews. Drug discovery*. NIH Public Access, 16(2), pp. 115–130. doi: 10.1038/nrd.2016.245.
- Shilatifard, A. (2006) ‘Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression’, *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp. 243–269. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422.
- Smith, Z. D. and Meissner, A. (2013) ‘DNA methylation: roles in mammalian development’, *Nature Reviews Genetics*, 14(3), pp. 204–220. doi: 10.1038/nrg3354.
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A. and Rodeo, S. A. (2009) ‘The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.’, *Sports health*. SAGE Publications, 1(6), pp. 461–8. doi: 10.1177/1941738109350438.
- Stockwell, R. A. (1979) *Biology of cartilage cells*. Cambridge University Press. Available at: [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=oAA9AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Stockwell,+R.A.+\(1979\).+Biology+of+Cartilage+Cells.+Cambridge,+Cambridge+Unive rsity+Press&ots=l2DgaPqcS3&sig=j\\_-LGMR--BjYzW1bGVfkCG9wao0&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Stockwell%2C R.A. \(19](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=oAA9AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Stockwell,+R.A.+(1979).+Biology+of+Cartilage+Cells.+Cambridge,+Cambridge+Unive rsity+Press&ots=l2DgaPqcS3&sig=j_-LGMR--BjYzW1bGVfkCG9wao0&redir_esc=y#v=onepage&q=Stockwell%2C R.A. (19 (Accessed: 2 October 2019)).)
- Strelchenko, N. *et al.* (no date) *Reprogramming of human somatic cells by embryonic stem cell cytoplasm*. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60988-1.

- Tada, M. *et al.* (1997) 'Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 16(21), pp. 6510–20. doi: 10.1093/emboj/16.21.6510.
- Tada, M. *et al.* (2001) 'Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.', *Current biology : CB*. Elsevier, 11(19), pp. 1553–8. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00459-6.
- Takahashi, K. *et al.* (2007) 'Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.', *Cell*. Elsevier, 131(5), pp. 861–72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', *Cell*. Elsevier, 126(4), pp. 663–676. doi: 10.1016/J.CELL.2006.07.024.
- Théry, C. (2011) 'Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications', *F1000 Biology Reports*, 3, p. 15. doi: 10.3410/B3-15.
- Thomson, J. A. *et al.* (1995) 'Isolation of a primate embryonic stem cell line.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), pp. 7844–7848. doi: 10.1073/pnas.92.17.7844.
- Thomson, J A *et al.* (1998) 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 282(5391), pp. 1145–7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Torres-Padilla, M.-E. *et al.* (2007) 'Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo', *Nature*, 445(7124), pp. 214–218. doi: 10.1038/nature05458.
- Tsumaki, N., Okada, M. and Yamashita, A. (2015) 'iPS cell technologies and cartilage regeneration', *Bone*, 70, pp. 48–54. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.011.
- Uto, S. *et al.* (2013) 'Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model.', *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, 34(6), pp. 281–8. doi: 10.2220/BIOMEDRES.34.281.
- Waddington, C. H. (1940) *The genetic control of wing development in Drosophila*. Available at: <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jgen/041/01/0075-0113> (Accessed: 13 August 2019).
- Wakayama, T. *et al.* (2001) 'Differentiation of Embryonic Stem Cell Lines Generated from Adult Somatic Cells by Nuclear Transfer', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 292(5517), pp. 740–743. doi: 10.1126/SCIENCE.1059399.
- Watanabe, D. *et al.* (2002) 'Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis', *Mechanisms of Development*, 118(1–2), pp. 187–190. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00242-3.

Wei, Y. *et al.* (2012) 'Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix.', *European cells & materials*, 23, pp. 1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241609> (Accessed: 6 October 2019).

Weiss, Rosenberg and Helfet. (1968) *Sci-Hub* // 10.1097/00004623-196850040-00002, *THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY. AMERICAN VOLUME*. doi: 10.2106/00004623-196850040-00002.

Weissman, I. L. (2000) 'Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.', *Cell*. Elsevier, 100(1), pp. 157–68. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.

Wernig, M. *et al.* (2007) 'In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state', *Nature*, 448(7151), pp. 318–324. doi: 10.1038/nature05944.

Wilmut, I. *et al.* (1997) 'Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 385(6619), pp. 810–813. doi: 10.1038/385810a0.

Wright, W. E. *et al.* (1996) 'Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells', *Developmental Genetics*, 18(2), pp. 173–179. doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3.

Yamanaka, S. (2007) 'Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells.', *Cell stem cell*. Elsevier, 1(1), pp. 39–49. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.012.

Yamanaka, S. and Blau, H. M. (2010) 'Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches.', *Nature*. NIH Public Access, 465(7299), pp. 704–12. doi: 10.1038/nature09229.

Yamashita, A. *et al.* (2013) 'Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 3, p. 1978. doi: 10.1038/srep01978.

Yamashita, A. *et al.* (2015) 'Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs.', *Stem cell reports*. Elsevier, 4(3), pp. 404–18. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.016.

Zaehres, H. *et al.* (2005) 'High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells', *Stem Cells*, 23(3), pp. 299–305. doi: 10.1634/stemcells.2004-0252.

Zhao, T. *et al.* (2011) 'Immunogenicity of induced pluripotent stem cells', *Nature*, 474(7350), pp. 212–215. doi: 10.1038/nature10135.

Zhu, Y. *et al.* (2017) 'Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis', *Stem Cell Research & Therapy*. BioMed Central, 8(1), p. 64. doi: 10.1186/s13287-017-0510-9.

Zindy, F. *et al.* (1998) 'Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization', *Genes & Development*, 12(15), pp. 2424–2433. doi: 10.1101/gad.12.15.2424.