



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



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ**  
**ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΙΔΟΥ Γ. ΑΓΓΕΛΙΚΗ**

**Βιολόγος, PhD**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, Επιβλέπουσα**

**ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓ. ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, Μέλος**

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓ. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, Μέλος**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2020**



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM**

**“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS**

**«MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS IN INDUCED  
PLURIPOTENT STEM CELLS»**

**KARAGIANNIDOU G. ANGELIKI**

**BIOLOGIST, PhD**

**Larissa, 2020**

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Γενετική του Ανθρώπου - Γενετική Συμβουλευτική», κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Η συμμετοχή σε ένα υψηλών απαιτήσεων και ταχύρρυθμο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, αρκετά χρόνια μετά από την τελευταία φορά που είχες καθίσει στα φοιτητικά έδρανα, είναι από μόνη της ένα δύσκολο εγχείρημα. Αν συνδυαστεί με την ύπαρξη μίας οικογένειας με μικρό παιδί, με τα εβδομαδιαία ταξίδια μεταξύ Ελλάδας και Κύπρου καθώς και με την επαγγελματική μου απασχόληση σε ένα τμήμα με πολλές υποχρεώσεις και ευθύνες, φαντάζει ανέφικτη. Στην λογική απορία αρκετών, για την αναγκαιότητα απόκτησης ενός μεταπτυχιακού διπλώματος, ούσα ήδη κάτοχος διδακτορικού, η προφανής απάντηση είναι ότι πάντα είναι χρήσιμο ένα επιπλέον πτυχίο, η ουσιαστική απάντηση είναι ότι πάντα είναι χρήσιμες οι επιπλέον γνώσεις. Ωστόσο, κατά την διάρκεια αυτού του έτους, δεν ήταν λίγες οι φορές που σκέφτηκα να τα παρατήσω. Με στήριξαν το πείσμα μου και κάποιοι άνθρωποι που θέλω ολόψυχα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής του Παν/μιου Θεσσαλίας Ασπασία Τσέζου, που με εμπιστεύτηκε με την ανάθεσή της, τόσο για την ουσιαστική συμβολή και συμβουλή της σχετικά με τον σχεδιασμό και την δόμηση αυτού του εγχειρήματος μου, όσο και για την κατανόηση που έδειχνε στις συνεχείς εκπρόθεσμες παραδόσεις μου. Χωρίς αυτά η εργασία μου θα ήταν ακόμα ημιτελής. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής μου, την κα Τζέτη Μαρία, Αν. Καθηγήτρια Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και την κα Τραχάνα Βαρβάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας του Παν/μιου Θεσσαλίας, για το χρόνο που μου διέθεσαν.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου, τον Αν. Καθηγητή Αιματολογίας Παναγιώτη Τσιριγώτη και τους Αιματολόγους Σταμούλη Μαρία και Γκίρκα Κωνσταντίνο, της Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του Π.Γ.Ν. «Αττικόν», όπου εργάζομαι τα τελευταία χρόνια, για την απεριόριστη κατανόηση που έδειξαν, όχι μόνο κατά την περίοδο συγγραφής της διπλωματικής εργασίας μου, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια του έτους που παρακολουθούσα το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών. Συχνά οι «φοιτητικές» υποχρεώσεις μου, με ανάγκαζαν να τους επιβαρύνω και με την δική μου εργασία ή να απουσιάζω από τα καθήκοντά μου, αλλά είχα πάντα την αμέριστη υποστήριξη και ενθάρρυνσή τους.

Τέλος, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τον σύζυγό μου Γιάννη και την κόρη μου Δήμητρα. Προκειμένου να είμαι φοιτήτρια, εργαζόμενη και μαμά ταυτόχρονα, τους επιβάρυνα με αρκετές δικές μου υποχρεώσεις και τους στερήσα πολλές ώρες παιχνίδι, αλλά η κατανόησή τους ήταν πάντα ένα στήριγμα, ενώ η μεγαλύτερη επιβράβευσή μου ήταν η έκδηλη χαρά τους και τα «μπράβο μαμά» που άκουγα, σε κάθε μάθημα που πέρανα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. Περίληψη</b>	<b>5</b>
<b>II. Abstract</b>	<b>7</b>
<b>1. Εμβρυϊκή ανάπτυξη ανθρώπου- Σχηματισμός των τριών βλαστικών δερμάτων</b>	<b>9</b>
<b>2. Βλαστικά ή στελεχειαία κυττάρα (Stem cells)</b>	<b>11</b>
2.1. Ενήλικα ή Σωματικά Βλαστικά Κύτταρα	13
2.2. Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (EBK)	14
2.2.1. Άλλες μέθοδοι δημιουργίας κυτταρικών σειρών EBK	16
2.2.1.1. Μέθοδοι της πυρηνικής μεταφοράς και της κυτταρικής σύντηξης	17
2.3. Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα- Induced pluripotent stem cells, iPSc	19
2.3.1. Μεταγραφικοί παράγοντες επαναπρογραμματισμού	21
2.3.2. Μέθοδοι επαναπρογραμματισμού επαγόμενων βλαστοκυττάρων	22
2.3.2.1. Μέθοδοι επαναπρογραμματισμού με την ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Integrating method)	23
2.3.2.2. DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Non- Integrating DNA-based methods)	24
2.3.2.3. Μη - DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Non- Integrating Non-DNA-based methods)	26
2.3.3. Κλινικές εφαρμογές των iPSCs	28
<b>3. Γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες των iPSCs</b>	<b>33</b>
3.1. Γενετικές Ανωμαλίες	35
3.1.1. Ανευπλοειδίες	35
3.1.2. Υποχρωμοσωμικές ποικιλομορφίες- CNVs και SNVs	37
3.1.3. p53 και DNA βλάβες ως απόκριση στον επαναπρογραμματισμό- Ακεραιότητα γονιδιώματος iPSCs	39
3.2. Επιγενετικές τροποποιήσεις στα iPSC	40
3.2.1. Παραλλαγές στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος	41

3.2.2.	Παραλλαγές στην επιγενετική κατάσταση των iPSCs	42
3.2.2.1.	Επιγενετική μνήμη αρχικού σωματικού κυττάρου	43
3.2.2.2.	Ανώμαλη μεθυλίωση DNA	43
<b>4.</b>	<b>Μιτοχόνδρια</b>	<b>45</b>
4.1.	Δομή και χημική σύσταση	45
4.2.	Λειτουργία	46
4.2.1.	Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην παραγωγή ενέργειας	46
4.2.2.	Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση και την κυτταρική γήρανση	48
4.3.	Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)	50
4.3.1.	Το «σημείο ρύθμισης μιτοχονδριακού DNA» (mtDNA set point)	54
4.3.2.	Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA	55
4.3.3.	Ο ρόλος της μιτοχονδριακής πολυμεράσης γ	57
<b>5.</b>	<b>Το μιτοχονδριακό DNA στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα</b>	<b>57</b>
5.1.	Ρύθμιση της αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα	58
5.2.	Ο ρόλος των προγονικών σωματικών κυττάρων στην εμφάνιση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα	59
5.3.	Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων του mtDNA στην λειτουργία των επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων	62
5.4.	Μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και αντιγονικότητα των επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων	63
<b>6.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>69</b>

## I. Περίληψη

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν αδιαφοροποίητα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της αυτοανανέωσης, της πολυδυναμίας και της *in vivo* λειτουργικής ανασύστασης ιστών. Το απεριόριστο πολλαπλασιαστικό δυναμικό καθώς και η ικανότητα διαφοροποίησης τους σε όλους τους τύπους ιστών, αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο στο κομμάτι της έρευνας, ερχόμενο όμως σε σύγκρουση με ηθικούς φραγμούς και διλήμματα. Την λύση έδωσαν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, (iPSCs) που πρωτοδημιουργήθηκαν το 2006 από τους Takahasi και Yamanaka, με εισαγωγή μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας σε σωματικά κύτταρα, ανοίγοντας νέου ορίζοντες στην Εξατομικευμένη και Αναγεννητική Ιατρική.

Ωστόσο οι προβληματισμοί που σχετίζονται με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους, μέχρι στιγμής, περιορίζουν την χρήση τους στην κλινική πράξη. Οι κυριότερες ανησυχίες αφορούν στις επιπτώσεις που έχει ο επαναπρογραμματισμός στην ποιότητα και τη γενετική σταθερότητα των iPSCs. Το είδος των προγονικών σωματικών κυττάρων αλλά και η μέθοδος του επαναπρογραμματισμού, φαίνεται να επηρεάζουν τον αριθμό των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα iPSCs. Η μακρόχρονη καλλιέργεια και οι συνεχείς ανακαλλιέργειες των iPSCs, επιπλέον επιφέρουν γενετικές και επιγενετικές επιπτώσεις. Με δεδομένο ότι η συχνότητα μεταλλάξεων του mtDNA που παρατηρήθηκε στα iPSCs είναι σημαντικά υψηλότερη, σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις του πυρηνικού γονιδιώματος, καθιστάται αναγκαία η διερεύνηση των επιπτώσεων του επαναπρογραμματισμού στο γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων.

Αν και ένα ποσοστό των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων των iPSCs δημιουργείται *de novo*, κατά τη διάρκεια της παραγωγής τους ή της εκτεταμένης καλλιέργειας τους, η πλειονότητα αυτών προέρχεται από τα προγονικά τους σωματικά κύτταρα και μεταφέρεται με ποικίλου βαθμού ετεροπλασμία στα επαγόμενα βλαστοκύτταρα. Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις διατηρούνται ακόμα και στα κύτταρα στα οποία τα iPSCs διαφοροποιούνται, επηρεάζοντας τη λειτουργικότητα και κατ'επέκταση το θεραπευτικό δυναμικό τους.

Επιπλέον, τα νεοαντιγονικά SNPs που παρατηρούνται στο mtDNA των iPSCs, αποτελούν πεδίο που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, αφού μπορεί να αποτελεί ανοσολογικό φραγμό για θεραπευτική χρήση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων.

Ο υψηλής συχνότητας αριθμός μεταλλάξεων στο mtDNA που ενδέχεται να φέρουν τα iPSCs, είναι πιθανόν ικανός να προκαλέσει λειτουργικές βλάβες στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Η χρήση νεαρότερων ηλικιακά δοτών σωματικών κυττάρων μετριάζει τον κίνδυνο μεταφοράς σωματικών μεταλλάξεων στα παραγόμενα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα. Ωστόσο ο έλεγχος της ακεραιότητας του mtDNA θα πρέπει σαφώς να συμπεριλαμβάνεται στα κριτήρια αξιολόγησης μιας κυτταρικής σειράς iPSCs, προκειμένου να είναι ασφαλής και αποτελεσματική η χρήση αυτών των κυττάρων.

**Λέξεις-κλειδιά:** επαγόμενα βλαστοκύτταρα, μεταλλάξεις μιτοχονδριακού DNA, ετεροπλάσμια, κυτταρικός επαναπρογραμματισμός

## II. Abstract

Embryonic stem cells are undifferentiated cells characterized by the ability of self-renewal, pluripotency and in vivo functional tissue reconstitution. The unlimited proliferative potential as well as the ability to differentiate in all cell types, has been an important tool in the field of research, but it is confronted with ethical barriers and dilemmas. This problem was resolved by the production of induced pluripotent stem cells (iPSCs), first developed in 2006 by Takahasi and Yamanaka, by introducing pluripotent transcription factors into somatic cells, opening new horizons in Personalized and Regenerative Medicine.

However, concerns regarding their safety and efficacy have so far limited their application in clinical practice. The main concerns are about the impact of reprogramming on the quality and genetic stability of iPSCs. The type of progenitor somatic cells as well as the reprogramming method appear to affect the number of mutations observed in iPSCs.

Long-term cultures and continuous expansion of iPSCs also have been shown to have genetic and epigenetic effects. Given that the frequency of mtDNA mutations observed in iPSCs is significantly higher, compared to nuclear genome mutations, it is necessary to investigate the effects of reprogramming on mitochondrial DNA.

Although a percentage of the mitochondrial mutations of iPSCs are de novo, generated during their production or expansion, the majority of them originate from their progenitor somatic cells and are transmitted to the induced pluripotent stem cells, with various degrees of heteroplasmy. These mitochondrial mutations persist even in cells in which iPSCs have been differentiated, affecting their function and therefore their therapeutic potential.

In addition, the neoantigenic SNPs observed in the iPSCs' mtDNA consist a field that requires further investigation, as it may become an immune barrier to the therapeutic use of induced pluripotent stem cells.

The high frequency of mtDNA mutations that iPSCs may carry is likely to cause functional abnormalities to differentiated cells. The use of somatic cell from younger donors reduces the risk of transmitting mtDNA mutations to the produced reprogrammed cells. However, mtDNA integrity testing should clearly be included in



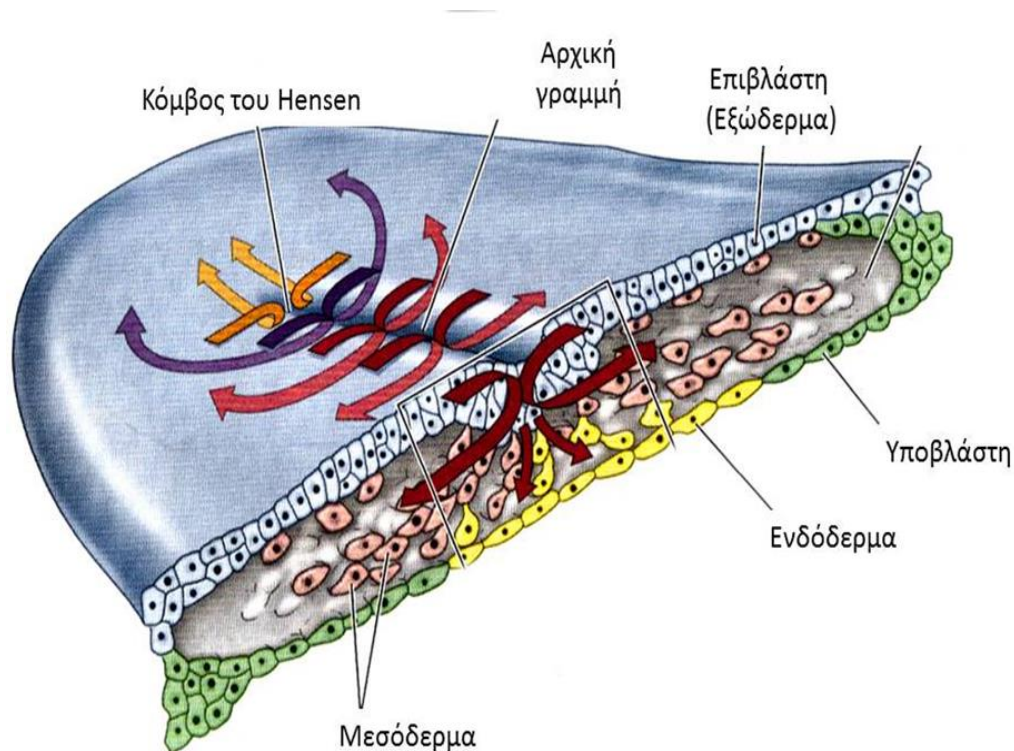
the evaluation criteria of an iPSCs cell line in order to use these cells safely and effectively.

**Key-words:** induced pluripotent stem cells, mtDNA mutations, heteroplasmy, cellular reprogramming

## 1. Εμβρυϊκή ανάπτυξη ανθρώπου - Σχηματισμός των τριών βλαστικών δερμάτων

Μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου, οι αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις (αυλάκωση, cleavage) του ζυγωτού, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας συμπαγούς κυτταρικής σφαίρας, η οποία ονομάζεται μορίδιο (morula). Τα κύτταρα (βλαστομερίδια, blastomeres) της επιφάνειας του μοριδίου αποτελούν την τροφοβλάστη (trophoblast), από την οποία θα αναπτυχθούν οι εμβρυϊκοί υμένες, ενώ τα κύτταρα στο εσωτερικό του μοριδίου αποτελούν την εμβρυοβλάστη (embryoblast), από την οποία θα αναπτυχθεί το έμβρυο. Με την εμφάνιση μιας προοδευτικά αυξανόμενης κοιλότητας στο εσωτερικό του, το μορίδιο μετατρέπεται σε βλαστίδιο ή βλαστοκύστη (blastula ή blastocyst). Τα κύτταρα του εσωτερικού του μοριδίου συγκεντρώνονται στον έναν πόλο του βλαστιδίου, όπου σχηματίζουν την έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (inner cell mass) από την οποία θα αναπτυχθεί στη συνέχεια το έμβρυο, ενώ τα εξωτερικά πεπλατυσμένα κύτταρα θα δώσουν στη συνέχεια την τροφοβλάστη ή τροφοεκτόδερμα (throphoblast), που είναι υπεύθυνη για τη θρέψη της βλαστοκύστης και θα δημιουργήσει τον πλακούντα και τον ομφάλιο λώρο. Ταυτόχρονα αρχίζει η σύνθετη διαδικασία της γαστριδίωσης, για τη μετατροπή της βλαστοκύστης σε γαστρίδιο (gastrula). Ως γαστριδίωση ορίζεται μία σειρά πολύπλοκων μορφογενετικών γεγονότων, που σε συνδυασμό με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, οδηγεί στο σχηματισμό των τριών εμβρυϊκών βλαστικών δερμάτων και κατ'έπекταση στον καθορισμό της αναπτυξιακής μοίρας των κυττάρων αυτών κατά τη διαδικασία της οργανογένεσης (Εικόνα 1). Η διαδικασία αυτή αρχίζει με τη διαφοροποίηση της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης σε εμβρυϊκό δίσκο ή εμβρυϊκή ασπίδα (embryonic disc ή embryonic shield), που αποτελείται από δύο κυτταρικά στρώματα, την επιβλάστη (epiblast) και την υποβλάστη (hypoblast). Κύτταρα της επιβλάστης αρχίζουν να μεταναστεύουν προς τη μέση γραμμή του εμβρύου, σχηματίζοντας την αρχική γραμμή (primitive streak) στην επιφάνεια της επιβλάστης. Στο κέντρο της αρχικής γραμμής παραμένει μία αύλακα, η αρχική αύλακα (primitive groove), μέσω της οποίας τα κύτταρα της επιβλάστης μεταναστεύουν προς τη βλαστική κοιλότητα. Τα κύτταρα της επιβλάστης που εγκολπώνονται και μεταναστεύουν μέσω της αρχικής αύλακας προς την υποβλάστη σχηματίζουν το **ενδόδερμα**, ενώ τα κύτταρα που μεταναστεύουν μεταξύ της επιβλάστης και του ενδοδέρματος σχηματίζουν το

**μεσόδερμα.** Τα υπόλοιπα κύτταρα της επιβλάστης θα σχηματίσουν το **εξώδερμα** (Κουσουλάκος, 2002). Τα κύτταρα των τριών αυτών βλαστικών δερμάτων, με τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις θα σχηματίσουν τους ιστούς και τα όργανα του σώματος, μέσω της διαδικασίας της οργανογένεσης. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα του εξωδέρματος θα σχηματίσουν τόσο το νευρικό σύστημα (κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα), όσο και τους εξωτερικούς ιστούς (επιδερμίδα, ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι αδένες, στοματικό επιθήλιο κ.α.), τα κύτταρα του μεσοδέρματος θα σχηματίσουν το αιμοποιητικό σύστημα, το ουρογεννητικό σύστημα, την καρδιά, τα οστά, τους μυς και τα νεφρά, ενώ τα κύτταρα του ενδοδέρματος θα σχηματίσουν το γαστρεντερικό σύστημα, το πάγκρεας, το ήπαρ, τους πνεύμονες και το φάρυγγα.



**Εικόνα 1:** Γαστριδίωση στο ανθρώπινο έμβρυο και καθορισμός των τριών βλαστικών δερμάτων. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα κύτταρα μεταναστεύουν μέσω της μέσης γραμμής (βέλη) για να σχηματίσουν το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, ενώ τα εναπομείναντα κύτταρα της επιβλάστης θα σχηματίσουν το εξώδερμα. (Πηγή: Dias MS and McLone DG; 2001, pp 31-71)

## 2. Βλαστικά ή στελεχειαία κυττάρια (Stem cells)

Ο όρος βλαστικά κύτταρα (BK) αναφέρεται στα αδιαφοροποίητα εκείνα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από τις εξής τρεις ιδιότητες: Πρώτον, έχουν την ικανότητα της **αυτοανανέωσης** (self-renewal), δηλαδή χαρακτηρίζονται από ένα απεριόριστο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, διατηρώντας την δυνατότητα διαφοροποίησης, χωρίς να υφίστανται βιολογική γήρανση. Η αυτοανανέωση πραγματοποιείται τόσο με συμμετρικές όσο και με ασύμμετρες διαιρέσεις. Οι συμμετρικές διαιρέσεις έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο όμοιων θυγατρικών κυττάρων, τα οποία διατηρούν όλα τα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων, ενώ οι ασύμμετρες διαιρέσεις οδηγούν στην παραγωγή ενός θυγατρικού κυττάρου όμοιου με το μητρικό και σε ένα προγονικό κύτταρο περισσότερο δεσμευμένο, από το οποίο θα προέλθουν τα μεταβατικά – πολλαπλασιαστικά κύτταρα (transit-amplifying cells, TA). Τα TA κύτταρα διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης, ωστόσο αποκτούν περισσότερο διαφοροποιημένες λειτουργίες, ώσπου μετατρέπονται σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (terminally differentiated, TD). Η δεύτερη ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα βλαστικά κύτταρα είναι η **πολυδυναμία**, δηλαδή η δυνατότητα διαφοροποίησης προς πολλούς κυτταρικούς τύπους τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*. Τέλος, χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της ***in vivo* λειτουργικής ανασύστασης** του ιστού από τον οποίο προέρχονται (Ulloa-Montoya et al, 2005).

Τα BK ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης που διαθέτουν χαρακτηρίζονται ως **ολοδύναμα** (totipotent), **πολυδύναμα** (pluripotent), **πλειοδύναμα** (multipotent) και **ολιγοδύναμα** (unipotent) (**Εικόνα 2**).

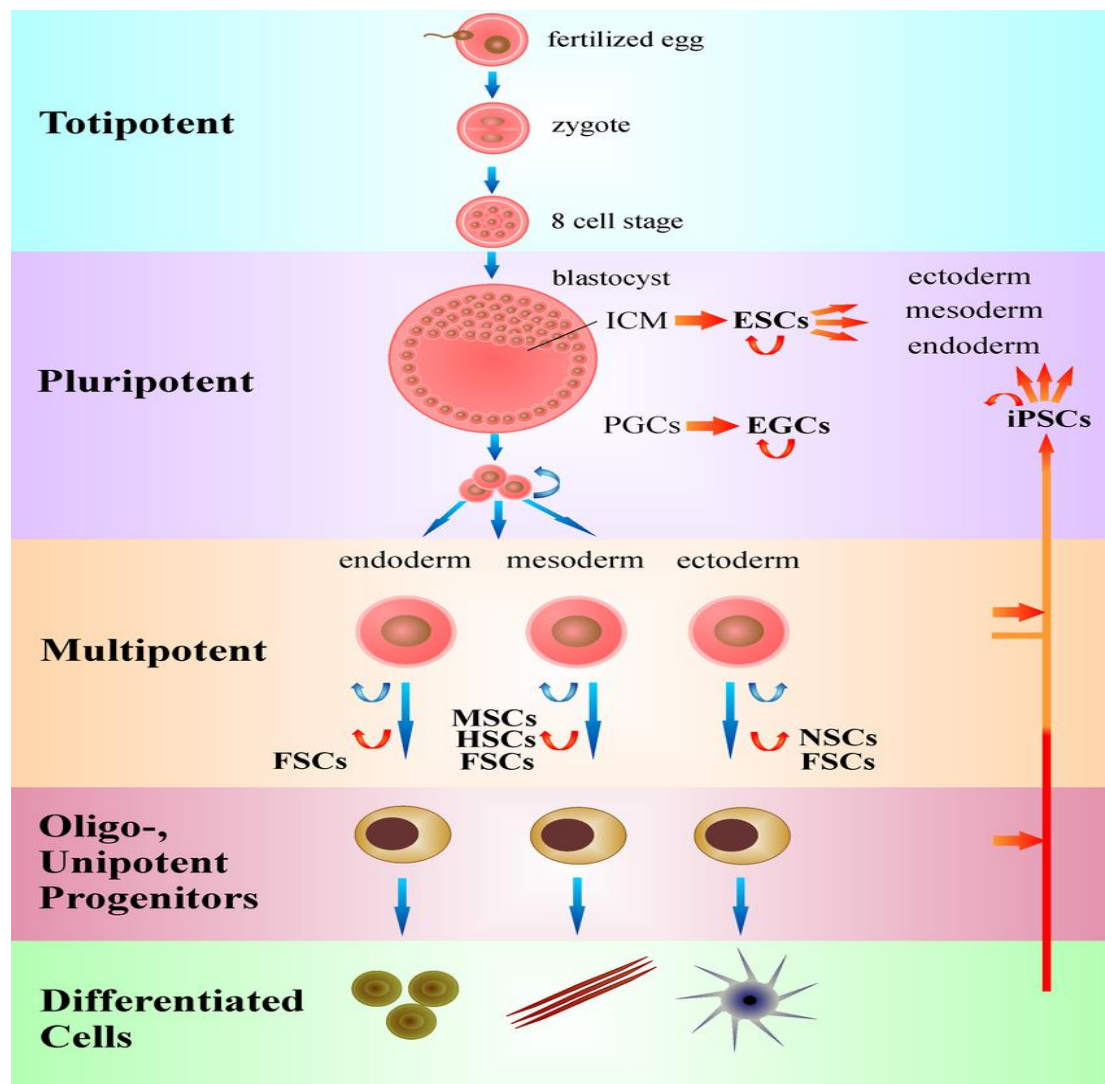
Τα ολοδύναμα BK αποτελούν την πλέον αδιαφοροποίητη μορφή κυττάρων που συναντώνται κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ως τέτοια θεωρούνται το ζυγωτό, καθώς και τα κύτταρα που προκύπτουν κατά τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις μετά τη γονιμοποίηση, μέχρι το στάδιο του μοριδίου. Τα κύτταρα αυτά δεν έχουν υποστεί κανενός είδους διαφοροποίηση και το καθένα έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί προς οποιοδήποτε κύτταρο του εμβρύου αλλά και των ιστών που το υποστηρίζουν κατά την ανάπτυξή του μέσα στη μήτρα (πλακούντα και ομφάλιου λώρου) (Mitalipon και Wolf, 2009).

Πολυδύναμα BK χαρακτηρίζονται τα κύτταρα που προέρχονται από την έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM) της βλαστοκύστης (Thomson et al, 1998). Στο στάδιο αυτό εμφανίζεται για πρώτη φορά το φαινόμενο της διαφοροποίησης. Έτσι, τα

κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης στους κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα **εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα** (Embryonic stem cells, ESCs) (ΕΒΚ) και τα εμβρυονικά γεννητικά κύτταρα (Embryonic germ cells, EGCs).

Ο όρος πλειοδύναμα αναφέρεται στα κύτταρα αυτά που χαρακτηρίζονται από περιορισμένο δυναμικό αυτοανανέωσης και έχουν την δυνατότητα διαφοροποίησης σε περιορισμένο εύρος κυτταρικών σειρών, ανάλογα με την εντόπισή τους. Αυτή η λειτουργικότητα χαρακτηρίζει τα ενήλικα σωματικά ή ιστοειδικά βλαστικά κύτταρα (ΣΒΚ) (Mitalipon και Wolf , 2009) καθώς και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.

Τέλος, ο όρος ολιγοδύναμα χαρακτηρίζει τα κύτταρα αυτά που έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε έναν μόνο τύπο κυττάρων.



**Εικόνα 2:** Ιεραρχία των Βλαστικών Κυττάρων, ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης τους. (Πηγή: [Forostyak O., et al 2016](#))

## 2.1. Ενήλικα ή Σωματικά Βλαστικά Κύτταρα

Ενήλικα ΒΚ υπάρχουν σε πολλούς ιστούς του σώματος, αποτελούν τα αδιαφοροποίητα κύτταρα-προγόνους των ώριμων κυττάρων των ιστών αυτών και είναι υπεύθυνα για την ανάπλαση και την αναγέννησή τους μετά από βλάβη. Ο ιστός στον οποίο θα «κατασκηνώσουν» τα ενήλικα ΒΚ καθορίζεται από το εμβρυϊκό δέρμα από το οποίο προέρχονται. Τα κύτταρα αυτά εκ πληρούν και τα τρία κριτήρια των ΒΚ που προαναφέρθηκαν. Παρόλα αυτά, η ικανότητά τους για αυτοανανέωση και διαφοροποίηση είναι περιορισμένη, (Ulloa-Montoya et al, 2005) και έτσι χαρακτηρίζονται ως **πλειοδύναμα (multipotent)**, που σημαίνει ότι είναι ικανά να δώσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους από τους οποίους αποτελείται ο ιστός στον οποίο εδράζουν. Οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι τέτοια κύτταρα υπάρχουν στο μυελό των οστών (Till et al, 1961; Becker et al, 1963; Friedenstein et al, 1966; Friedenstein et al, 1970; Owen 1988), στο περιφερικό αίμα (Kuznetsov et al, 2001), στον εγκέφαλο (McKay, 1997; Momma et al, 2000; Uchida et al, 2000), στο πάγκρεας (Bonner-Weir et al, 2000; Zulewski et al, 2001), στο ήπαρ (Sirica et al, 1990; Thorgeirsson, 1993; Dabeva et al, 1993; Lazaro et al, 1998), στους σκελετικούς μύες (Gussoni et al, 1999; Seale et al, 2000), στο δέρμα (Zhu et al, 1999; Slack, 2000; Taylor et al, 2000) κ.ά. Η συχνότητα με την οποία ανευρίσκονται στους διάφορους ιστούς είναι πολύ μικρή. Για παράδειγμα, έχει υπολογιστεί ότι μόλις 1 στα 10.000-15.000 κύτταρα του μυελού των οστών είναι ενήλικο ΒΚ (Weissman et al, 2000). Στο έργο τους για τη διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης, τα ενήλικα ΒΚ συνεπικουρούνται από το μικροπεριβάλλον που τα περιβάλλει (Greco et al., 2008), το οποίο τους παρέχει προστασία και ταυτόχρονα ρυθμιστική δράση. Αυτό το μικροπεριβάλλον καλείται φωλεά (stem cells niche) και περιεγράφηκε αρχικά από τον Ray Schofield το 1978, στην προσπάθεια να οριοθετηθεί το μικροπεριβάλλον παραμονής των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Schofield R., 1978). Η φωλεά αποτελεί έναν προσδιορισμένο χώρο που έχει αναγνωρισθεί σε πολλούς ιστούς και ρόλος του είναι η ρύθμιση του αριθμού και της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων, η προσαρμογή τους σε συνθήκες πίεσης ή αλλαγών (Kosinski et



al., 2007) καθώς και η διατήρησή τους σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η ρυθμιστική δράση της φωλέας και κατ' επέκταση ο καθορισμός της «κυτταρικής μοίρας» των ενήλικων βλαστικών κυττάρων πραγματοποιείται κυρίως σε δύο επίπεδα: μέσω της επαφής του βλαστικού κυττάρου με το μικροπεριβάλλον του και μέσω των εκκρινόμενων παραγόντων. Η επαφή των κυττάρων με το περιβάλλον τους καθορίζεται από την πολωμένη προσκόλληση των βλαστικών κυττάρων στα υποστηρικτικά κύτταρα της φωλέας, την επαφή τους με την εξωκυττάρια ουσία και τη συμμετοχή του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού. Οι εκκρινόμενοι παράγοντες επηρεάζουν τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της μεταγραφής, προέρχονται από κύτταρα πλησίον των βλαστικών ή πιο απομακρυσμένα και οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι οι αυξητικοί παράγοντες, κυταροκίνες και μόρια όπως τα Wnt, BMP και Hedgehog (Yamashita Y., 2009).

## 2.2. Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (EBK)

Τα κύτταρα που προέρχονται από τα πρώιμα στάδια του εμβρύου (προπυρήνα, μορίδιο και βλαστοκύστη) χαρακτηρίζονται ως Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα (EBK) (Embryonic stem cells) και αποτελούν τα κύτταρα-πρόγονους όλων των ιστών του οργανισμού. Ο όρος εμβρυονικός επινοήθηκε για να υποδηλώσει την προεμβρυϊκή περίοδο, η οποία καλύπτει τις πρώτες εννέα εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Οι μοναδικές ιδιότητες της πολυδυναμίας, της αυτο-ανανέωσης και του υψηλού πολλαπλασιαστικού δυναμικού, που χαρακτηρίζουν τα EBK, τα ορίζουν ως τα πιο άωρα κύτταρα της ζωής.

Η πρώτη επιτυχής απομόνωση και καλλιέργεια EBK πραγματοποιήθηκε το 1981, από την έσω κυτταρική μάζα βλαστοκύστεων ποντικού, από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες (Evans et al, 1981; Martin, 1981). Η ευκολία με την οποία τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού μπόρεσαν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν, τα κατέστησε ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της αναπτυξιακής βιολογίας. Η επιτυχής διαφοροποίησή τους στο εργαστήριο οδήγησε στην παραγωγή κυττάρων προερχόμενων από τα τρία βλαστικά δέρματα και παρείχε πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου, όπως κατά την ανάπτυξη της αιμαγγειοβλάστης (Keller 2005, Keller 1995). Δεκατρία χρόνια αργότερα, το 1994, η έρευνα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων κατέκτησε ένα

νέο ορόσημο, όταν ο Bongso και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν την απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων της έσω κυτταρικής μάζας (Inner Cell Mass, ICM) βλαστοκύστεων ανθρώπου, με μορφολογία όμοια των βλαστικών κυττάρων, αν και η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών μπόρεσε να διατηρηθεί για μόνο δύο ανακαλλιέργειες (Bongso et. al., 1994). Το 1998, δημοσιεύτηκε η απομόνωση και η μακρά καλλιέργεια της πρώτης κυτταρικής σειράς ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (αEBK), από ανθρώπινες βλαστοκύστες που είχαν παραχθεί από εξωσωματική (in vitro) γονιμοποίηση και είχαν παραχωρηθεί για ερευνητικούς σκοπούς.

Η καλλιέργεια των αEBK κατέστη δυνατή με τη χρήση υποστηρικτικού καλλιεργητικού υποστρώματος, το οποίο αποτελείτο από ινοβλάστες επίμυος, και καλλιεργητικού υλικού εμπλουτισμένου με τον παράγοντα bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Thomson et. al, 1998). Οι **κυτταρικές σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ΚΣΕΒ)**, χαρακτηρίζονται από την ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς να υφίστανται διαφοροποίηση (long-term self-renewal). Ο πληθυσμός των κυττάρων κάθε κυτταρικής σειράς, αποτελεί κλώνους ενός αρχικού προγονικού κυττάρου και παρουσιάζει το ίδιο αναπτυξιακό δυναμικό με αυτό.

Τα EBK χαρακτηρίζονται από μεγάλα σε μήκος τελομερίδια και εκφράζουν το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο τελομεράση με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν αντίσταση στη βιολογική διαδικασία της αναπαραγωγικής γήρανσης (Heins et al., 2004) και φαίνεται να διατηρούν φυσιολογικό καρυότυπο κατά τη μακρά καλλιέργειά τους in vitro (Buzzard et al., 2004). Λόγω της δυνατότητας της αυτοανανέωσης που επιδεικνύουν, διατηρούν την πολυδυναμία τους ακόμα και μετά την παραμονή τους στην καλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα (Reubinoff et al., 2000). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) (Heins et al., 2004).

Η ανακάλυψη των EBK άνοιξε νέα παράθυρα στον τομέα της ιατροβιολογικής έρευνας καθιστώντας τα κύτταρα αυτά ένα σημαντικό εργαλείο. Τα EBK θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη μελέτη της ανθρώπινης αναπτυξιακής και εξελικτικής βιολογίας και στην εξιχνίαση των μηχανισμών εκείνων που οδηγούν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη παρεμβάσεων για την αποφυγή τους. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή ουσιών που προορίζονται για



θεραπευτική χρήση, ή την ανάπτυξη νέων μεθόδων γενετικής τροποποίησης. Η μεγαλύτερη βέβαια πρόκληση αφορά το πεδίο των μεταμοσχεύσεων και της ανανεωτικής ιατρικής. Άμεσος στόχος των ερευνητών είναι η χρησιμοποίηση των EBK για τη λειτουργική αποκατάσταση πασχόντων οργάνων, αντιμετωπίζοντας νοσήματα όπως η νόσος του Parkinson, ο σακχαρώδης διαβήτης, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ατελής οστεογένεση, η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση, βλάβες του νωτιαίου μυελού, η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας κ.ά.

Μέχρι σήμερα έχουν παραχθεί περισσότερες από 400 ανθρώπινες τέτοιες σειρές, οι οποίες εμφανίζουν μία σημαντική ποικιλομορφία όσον αφορά τα αναπτυξιακά τους χαρακτηριστικά, τη διαφοροποιητική τους ικανότητα, τον καρυότυπό τους και το πρότυπο γονιδιακής τους έκφρασης. Οι διαφορές αυτές αντανakλούν τη γενετική ετερογένεια των παραγόμενων κυτταρικών σειρών αEBK, καθώς προέρχονται από έναν γενετικά ποικίλο πληθυσμό (Abeyta et al., 2004; Bhattacharya et al., 2004). Μεγάλα διεθνή δίκτυα, όπως το ESTOOLS στην Ευρώπη ([www.estools.gr](http://www.estools.gr)), έχουν δημιουργηθεί προκειμένου να συγκρίνουν τις παραγόμενες κυτταρικές σειρές και να διαμοιράζουν τη γνώση στο πεδίο έρευνας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.

Τα τρία σημαντικότερα προβλήματα που έπρεπε να επιλυθούν, προκειμένου τα EBK να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο, αφορούσαν στην αύξηση της πιθανότητας δημιουργίας όγκου, στα πλαίσια κυτταρικής θεραπείας, ως αποτέλεσμα ατελούς διαφοροποίησης των χορηγούμενων EBK, στην πιθανή απόρριψη τους από τον λήπτη, εξαιτίας ασυμβατότητας στο HLA σύστημα λήπτη και EBK και τέλος στα ηθικά και νομικά θέματα που εγείρονται σχετικά με την καταστροφή βλαστοκύστεων, προκειμένου να δημιουργηθούν κυτταρικές σειρές EBK.

### **2.2.1. Άλλες μέθοδοι δημιουργίας κυτταρικών σειρών EBK**

Τα παραπάνω προβλήματα έστρεψαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην αναζήτηση εναλλακτικών τεχνικών δημιουργίας τέτοιων κυτταρικών σειρών, οι οποίες δε θα προέρχονται από καταστροφή εμβρύων και θα είναι σε θέση να παρέχουν εξατομικευμένη κυτταρική θεραπεία στους ασθενείς. Μία πολλά υποσχόμενη λύση φαίνεται πως μπορούν να αποτελέσουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Induced pluripotent stem cells, iPSCs), που δημιουργούνται μετά από επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν παρόμοιες

ιδιότητες με τα EBK, ενώ δεν απαιτείται η καταστροφή εμβρυικών ιστών για την παραγωγή τους (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 : Το χρονικό της δημιουργίας και εξέλιξης iPSCs (Πηγή: Singh et al., 2015)

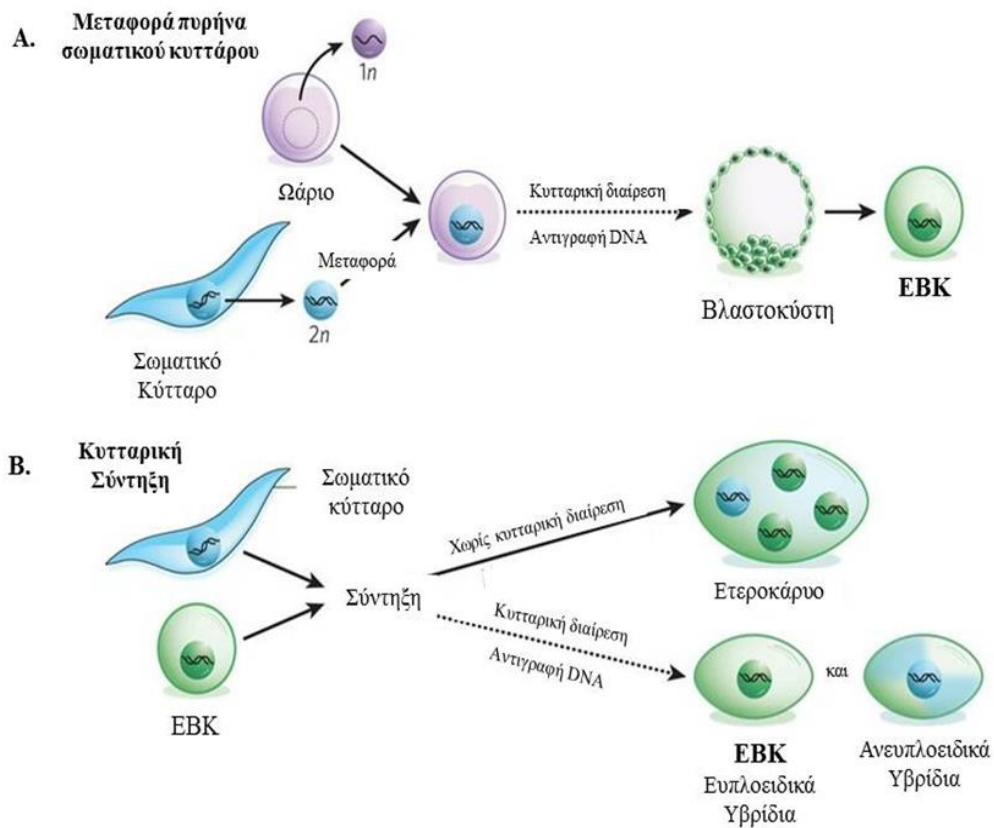
### 2.2.1.1. Μέθοδοι της πυρηνικής μεταφοράς και της κυτταρικής σύντηξης

Από τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε στην ανεύρεση των παραγόντων εκείνων που δίνουν στα βλαστικά κύτταρα τις ιδιότητες της πολυδυναμίας και αυτοανανέωσης. Οι πρώτες μελέτες χρησιμοποίησαν την τεχνική της μεταφοράς πυρήνα σωματικού κυττάρου, όπου κατά τη μέθοδο αυτή ο πυρήνας από ένα σωματικό κύτταρο μεταφέρεται σε ένα αποπυρηνποιημένο ωάριο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διπλοειδούς κυττάρου, ανάλογου του ζυγωτού. Η πρώτη προσπάθεια πραγματοποιήθηκε το 1958 με τη μεταφορά πυρήνα επιθηλιακού κυττάρου εντέρου σε ωάριο βατράχου από το οποίο είχε αφαιρεθεί ο πυρήνας, οδηγώντας στην ανάπτυξη φυσιολογικών βατράχων (Gurdon et al., 1958). Έκτοτε, η έρευνα αυτή δοκιμάστηκε και σε άλλα είδη, μέχρι το 1997 όποτε και δημοσιεύθηκε η κλωνοποίηση σε πρόβατο, με μεταφορά πυρήνα μαστικού κυττάρου σε αποπυρηνποιημένο ωάριο και εμφύτευση του σε μήτρα θηλυκού ατόμου. Η δημιουργία βιώσιμου εμβρύου απέδειξε ότι το επιγένομα (epigenotype) των σωματικών κυττάρων μπορεί να διαγραφεί και τα κύτταρα να δημιουργήσουν ένα νέο

οργανισμό, επιστρέφοντας στην κατάσταση της παντοδυναμίας (totipotency) (Wilmut et al., 1997).

Η δημιουργία κυτταρικών σειρών που προκύπτουν με την κλωνοποίηση, θα μπορούσε να αποτελέσει την απάντηση στο αίτημα για εξατομικευμένη κυτταρική θεραπεία του δότη του σωματικού κυττάρου, χωρίς τον κίνδυνο απόρριψης, αφού φέρουν τον ίδιο γονότυπο (**θεραπευτική κλωνοποίηση**). Ωστόσο η κλινική εφαρμογή της μεθόδου στον άνθρωπο, εμφανίζει προβλήματα, αφού η χρησιμοποίηση ανθρώπινων ωαρίων και το χαμηλό ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου θέτουν ηθικά και τεχνικά θέματα. Εντούτοις, η επίτευξη της κλωνοποίησης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το κυτταρόπλασμα του ωαρίου περιέχει όλους εκείνους τους παράγοντες που είναι ικανοί και ευθύνονται για την επαναφορά των διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο της αναπτυξιακής τους πορείας, με μια διαδικασία που ονομάζεται πυρηνικός επαναπρογραμματισμός.

Το 2005, ο Cowan και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν την **κυτταρική σύντηξη** ενός ανθρώπινου EBK και ενός δερματικού κυττάρου ενήλικα, με παροδικό σπάσιμο των κυτταρικών τους μεμβρανών με τη βοήθεια παλμού συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος. Με τη μέθοδο αυτή δημιουργείται ένα ετεροκάρυο και ακολούθως ένα «υβριδικό» κύτταρο, στο οποίο επικρατεί ο φαινότυπος του περισσότερο αδιαφοροποίητου κυττάρου (Hochedlinger & Jaenisch, 2006). Το κύτταρο αυτό εμφανίζει παρόμοιο αναπτυξιακό πρότυπο, παραγωγή πρωτεϊνών και χαρακτηριστικά πολυδυναμίας τυπικών για τα EBK (Cowan et. al., 2005). Τα παραπάνω πειράματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι κάποιοι παράγοντες που βρίσκονταν μέσα στα EBK έχουν τη δυνατότητα να επαναπρογραμματίσουν τα ενήλικα διαφοροποιημένα κύτταρα. Το κυριότερο πρόβλημα που παρουσιάζουν αυτές οι κυτταρικές σειρές, είναι ότι τα «υβριδικά» κύτταρα είναι τετραπλοειδή και προκειμένου να έχουν κλινική εφαρμογή πρέπει να απομακρυνθεί ο πυρήνας του EBK από το υβρίδιο, διατηρώντας ωστόσο το δυναμικό πολυδυναμίας τους (**Εικόνα 4**).



**Εικόνα 4:** Δημιουργία σειρών EBK με αποδιαφοροποίηση σωματικών κυττάρων.

A. Μεταφορά πυρήνα σωματικού κυττάρου σε ένα αποπυρηνωποιημένο ωάριο.

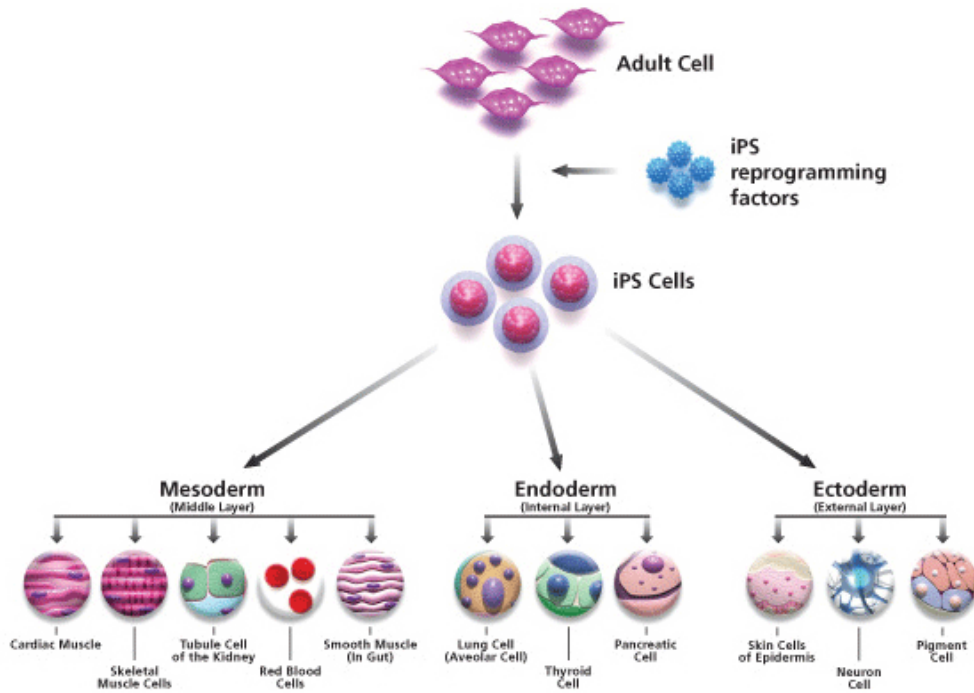
B. Κυτταρική σύντηξη ενός EBK και ενός ώριμου σωματικού κυττάρου. (Πηγή: S. Yamanaka and H. Blau; 2010)

### 2.3. Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα- Induced pluripotent stem cells, iPSc

Το 2006 δημοσιεύτηκε η αποδιαφοροποίηση και ο επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών ποντικού σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, με τη μεταφορά τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων Oct3/4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4), Sox2 (SRY box 2), c-Myc (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog) και Klf4 (Kruppel-Like Factor 4), μέσω ρετροϊών. Τα κύτταρα που προκύπτουν ονομάζονται επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSc) και ομοιάζουν των EBK στη μορφολογία, την έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών, την

πολλαπλασιαστική ικανότητα και την ενεργότητα της τελομεράσης. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά, *in vitro* διατηρούν φυσιολογικό καρύοτυπο κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων, ενώ κατά την *in vivo* χορήγησή τους δημιουργούν τερατώματα (Takahashi & Yamanaka, 2006). Ένα χρόνο αργότερα επιτυγχάνεται με την χρήση των ίδιων μεταγραφικών παραγόντων, η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων από ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Takahashi et al 2007; Yu et al, 2007), ενώ μέχρι σήμερα η μέθοδος έχει εφαρμοστεί και σε άλλους τύπους σωματικών κυττάρων τόσο ποντικού όσο και ανθρώπου (Stadtfeld & Hochedlinger 2010; Patel & Yang 2010).

Αν και η ανακάλυψη αυτή χάρισε στους πρωτοπόρους της παραγωγής των iPSCs, S. Yamanaka Sir και J. Gordon το βραβείο Νόμπελ, αρκετά χρόνια αργότερα, το 2012, τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για μελλοντική κλινική χρήση και έρευνα. Η παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων και ιστών θα μπορούσε να βρει άμεση εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική και τις μεταμοσχεύσεις, ενώ η δημιουργία κυτταρικών σειρών από ασθενείς που πάσχουν από γενετικές ασθένειες αποτελεί ένα ανεκτίμητο εργαλείο στην κατανόηση των μηχανισμών αυτών των ασθενειών και στη δοκιμή πιθανών φαρμακευτικών θεραπειών. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι ότι η χρήση τους δεν εγείρει ηθικά θέματα, αφού δεν προέρχονται από εμβρυικούς ιστούς καθώς και η δυνατότητα που παρέχουν για δημιουργία εξατομικευμένων κυτταρικών σειρών για κάθε ασθενή, δίνοντας έτσι λύση στο πρόβλημα της ανοσοαπόρριψης σε θεραπείες μεταμόσχευσης (**Εικόνα 5**).



**Εικόνα 5:** Δημιουργία iPSCs μέσω επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων και διαφοροποίησης τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. (Πηγή: [www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols))

### 2.3.1. Μεταγραφικοί παράγοντες επαναπρογραμματισμού

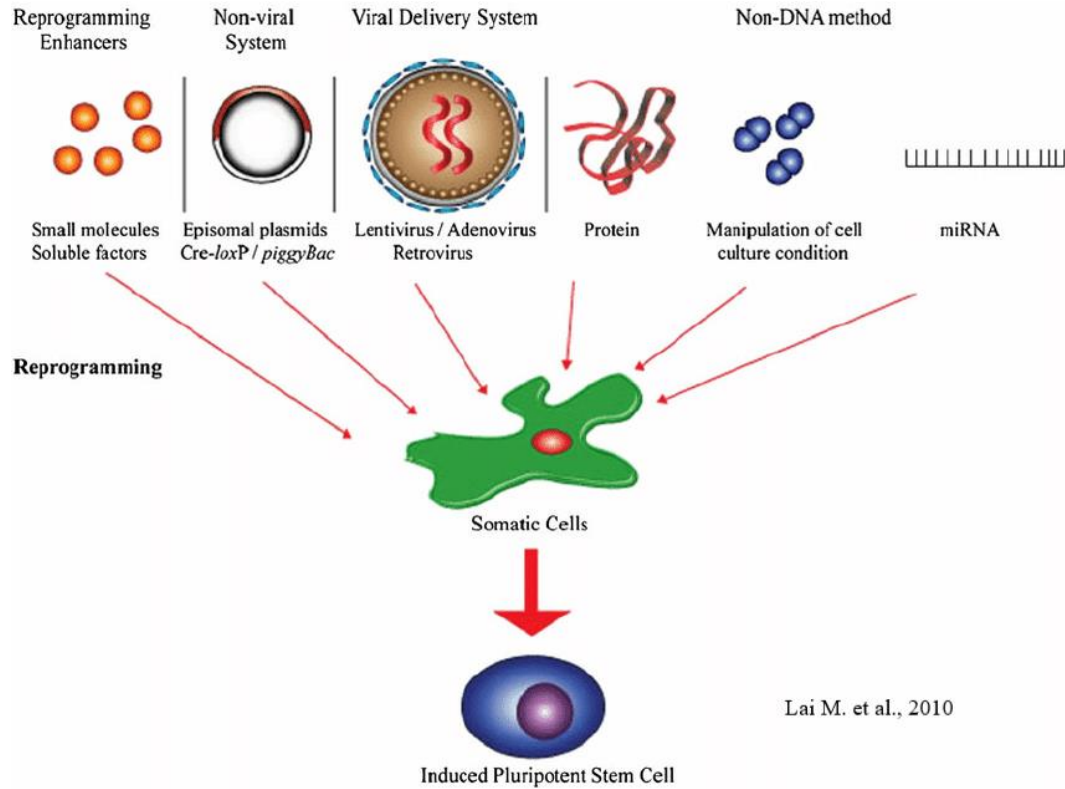
Ένα πλήθος επιγενετικών μηχανισμών είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της πολυδυναμίας τόσο των Εμβρυονικών Βλαστικών Κυττάρων, όσο και των iPSCs. Τελικός αποδέκτης της δράσης των μηχανισμών αυτών, είναι ένα σύνολο κομβικών γονιδίων, που με την ενεργοποίησή τους μετατρέπουν τα εξωκυττάρια σήματα σε ενδοκυτταρική ανταπόκριση, ρυθμίζοντας την έκφραση ή την αποσιώπηση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη. Τα κομβικά αυτά γονίδια κωδικοποιούν ρυθμιστικά μόρια RNA και ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων το οποίο δρα συνεργατικά και είναι αυτορρυθμιζόμενο, με τον κάθε ένα να ρυθμίζει την έκφραση των άλλων αλλά και του εαυτού του, μέσω τροποποιήσεων της χρωματίνης και σηματοδοτικών μονοπατιών. Η μελέτη των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας και η αποσαφήνιση της συμβολής τους στην έκφραση της πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, οδηγεί στην κατανόηση του μηχανισμού του επαναπρογραμματισμού στα iPSCs.



Οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες που έχει αναγνωρισθεί ότι αποτελούν αυτό το δίκτυο είναι οι OCT-4, Sox-2 και Nanog και ο ρόλος τους είναι διττός: αφενός καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που επάγουν τη διαφοροποίηση και ελέγχουν αντίστοιχες επιγενετικές τροποποιήσεις και αφετέρου προάγουν την αυτοανανέωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EBK, διατηρώντας την έκφραση γονιδίων που απαιτούνται για την πολυδυναμία (Niwa H., 2007; Schulz et al., 2007). Κοινά χαρακτηριστικά των Oct-4, Sox2 και Nanog είναι η ικανότητά τους i) να προσδένονται στον δικό τους εκκινητή προκειμένου να διατηρήσουν την έκφρασή τους, ii) να καταλαμβάνουν συνεργαστικά τα γονίδια-στόχους, iii) να στοχεύουν τόσο σε γονίδια που παρουσιάζουν ενεργή έκφραση όσο και σε αυτά που είναι σιωπηλά στα EBK, αλλά ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης (Jaenisch et al., 2008). Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες c-Myc και Klf4 αναστέλλουν τις διαδικασίες κυτταρικού θανάτου (γήρανση-απόπτωση), αναδιαμορφώνοντας τη δομή της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Yamanaka et al., 2007). Η συνεργατική δράση των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων και με άλλους, όπως οι Sall4, Tbx3, Dax1, Nac1 και Zfp δημιουργούν ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων, που εξασφαλίζει στα βλαστικά κύτταρα την ικανότητα αυτοανανέωσης και την πολυδυναμία (Woong and Yoon, 2011).

### **2.3.2. Μέθοδοι επαναπρογραμματισμού επαγόμενων βλαστοκυττάρων**

Προϋπόθεση της κλινικής εφαρμογής θεραπειών με iPSCs είναι η παραγωγή τους με μεθόδους απλές, αποδοτικές για χρήση σε κλινική κλίμακα αλλά κυρίως ασφαλείς. Οι ρετροϊοί που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως φορείς, προκειμένου να εισέλθουν οι απαραίτητοι μεταγραφικοί παράγοντες στα κύτταρα-στόχους, με την τυχαία ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα των κυττάρων, ενέχουν τον κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων ή δημιουργίας γενετικής αστάθειας, εξαιτίας χρωμοσωμικών μεταθέσεων. Σημαντική εξέλιξη προς την κατεύθυνση αυτή ήταν η επιτυχής ανάπτυξη τεχνικών επαναπρογραμματισμού, με συστήματα μεταφοράς, των μεταγραφικών παραγόντων, που δεν ενσωματώνονται, άρα και δεν επηρεάζουν το DNA των κυττάρων-στόχων, όπως οι ιοί Sendai αλλά και η χρήση Μη-DNA μεθόδων, όπως οι ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες ή τα τροποποιημένα μόρια mRNA (Kaji et al., 2009; Zhou et al., 2009; Fusaki et al., 2009; Warren et al., 2010) (**Εικόνα 6**).



**Εικόνα 6:** Τεχνικές επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων για την δημιουργία iPSCs. (Πηγή:Lai M. et al; 2011)

### 2.3.2.1. Μέθοδοι επαναπρογραμματισμού με την ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Integrating method)

Σε αυτή την μέθοδο επαναπρογραμματισμού, ως μέσο μεταφοράς των μεταγραφικών παραγόντων έχουν χρησιμοποιηθεί ένα πλήθος γενετικά τροποποιημένων ιών ως φορείς. Οι συνηθέστεροι τύποι ιών είναι οι ρετροϊοί και οι λεντιοί.

Η μεταφορά των παραγόντων πολυδυναμίας με φορείς ρετροϊούς έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μία πληθώρα τύπων σωματικών κυττάρων όπως οι ινοβλάστες, τα αιμοποιητικά κύτταρα, τα νευρικά κύτταρα. Η απόδοση του επαναπρογραμματισμού εξαρτάται τόσο από την ενεργότητα του ενζύμου ιντεργκράση όσο και από τον τύπο



του κυττάρου-στόχου. Ενδεικτικά εμφανίζεται σε ποσοστό 0,1% για ινοβλάστες ποντικού και 0.01% για ινοβλάστες ανθρώπου (Gonzalez et al., 2011). Οι γενετικά τροποποιημένοι ιοί κατασκευάζονται με διαγραφή των γονιδίων τους pol, env και gag και εισαγωγή στις θέσεις αυτές των αλληλουχιών των παραγόντων επαναπρογραμματισμού, με διατήρηση των απαραίτητων αλληλουχιών για την μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος LTRs και Ψ cis-acting. Κατά την διαμόλυνση των κυττάρων-στόχων, ο τροποποιημένος ρετροϊός εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου κατά τη μίτωση και ενσωματώνεται τυχαία στο γενετικό του υλικό. Η τυχαία αυτή ενσωμάτωση, ενέχει τον κίνδυνο αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων των κυττάρων-στόχων, τα οποία σχετίζονται με τους μηχανισμούς κυτταρικής διαίρεσης, όπως με το ογκογονίδιο c-Myc. Το αποτέλεσμα είναι η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων και η ογκογένεση (Aoi et al., 2008). Επιπλέον, η χρήση πολλαπλών ιικών φορέων, προκειμένου να εισέλθουν όλοι οι απαιτούμενοι μεταγραφικοί παράγοντες, και η ένθεση τους σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος, μπορεί να οδηγήσει σε γενωμική αστάθεια και δυσλειτουργία των γονιδίων των κυττάρων στόχων (Okita et al., 2007).

Οι λεντοϊοί χρησιμοποιούνται με παρόμοιο τρόπο για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων-στόχων. Βασικό τους πλεονέκτημα, σε σχέση με τους ρετροϊούς, είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνουν στο γονιδιώμα τους ταυτόχρονα και τους τέσσερις παράγοντες επαναπρογραμματισμού (Sommer et al., 2009), αυξάνοντας την απόδοση επαναπρογραμματισμού ινοβλαστών ανθρώπου στο 0,1-2% (Seifinejad et al., 2010). Ωστόσο όπως και με τους ρετροϊούς, η ενσωμάτωση τους στο γενετικό υλικό του κυττάρου-στόχου είναι τυχαία, με αποτέλεσμα την συχνή ενεργοποίηση πρώτο-ογκογονιδίων και του επακόλουθου κινδύνου ογκογένεσης (Kaiser et al., 2007).

### **2.3.2.2. DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Non- Integrating DNA-based methods)**

Σε μία προσπάθεια εύρεσης αποδοτικότερων και ασφαλέστερων μεθόδων επαναπρογραμματισμού, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα που δεν περιλάμβαναν την ενσωμάτωση γενετικού υλικού στα κύτταρα-στόχους.

Οι αδενοϊοί είναι DNA ιοί, οι οποίοι αν και οδηγούν στο σχηματισμό τερατωμάτων, κατά την διαμόλυνση των κυττάρων στόχων δεν ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό

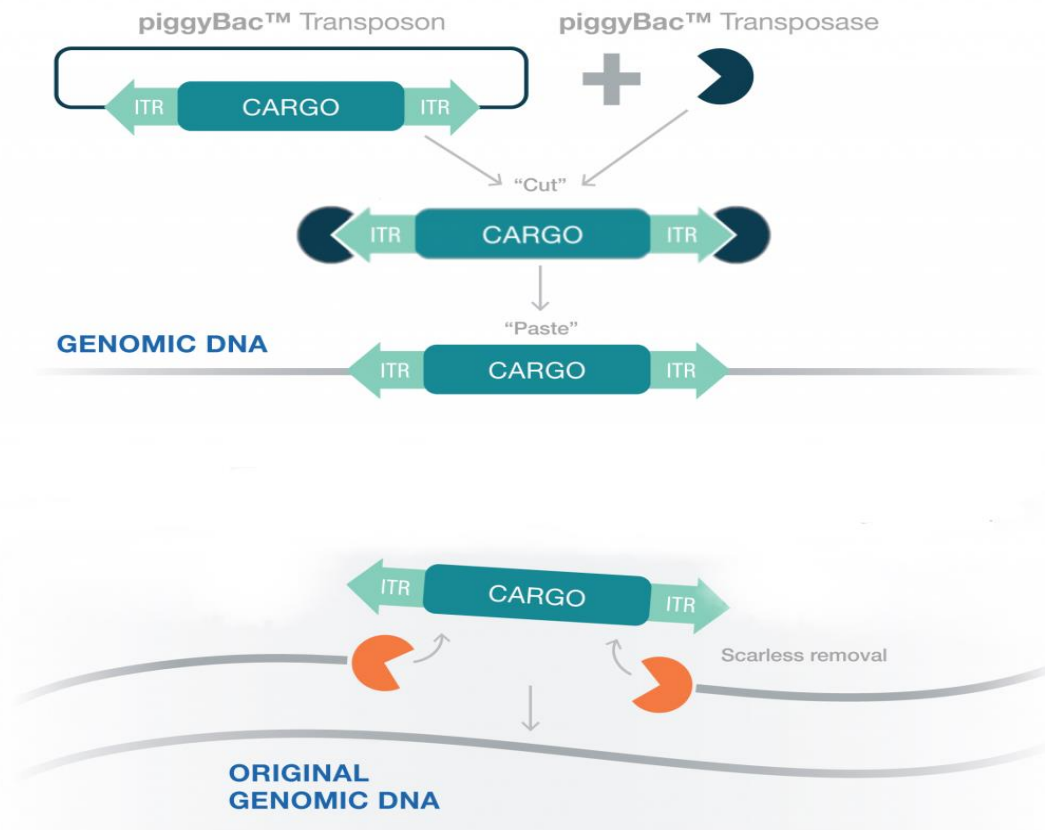
στο γονιδίωμα του ξενιστή. Τα μειονεκτήματα ωστόσο της χρήσης τους είναι η μειωμένη απόδοσή τους στον επαναπρογραμματισμό, συγκριτικά με τους ρετροϊούς ή τους λεντοϊούς και η δυσκολία ελέγχου των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα στόχους, ενώ είναι απαραίτητες επαναλαμβανόμενες διαμολύνσεις (Stadfeld et al., 2008).

Μία ασφαλής εναλλακτική των ρετροϊών είναι ο ιός Sendai, ένας single stranded RNA ιός, ο οποίος μπορεί να μεταφέρει τους παράγοντες στα κύτταρα χωρίς ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα τους. Ωστόσο η απόδοση της συγκεκριμένης τεχνικής είναι χαμηλή (Fusaki et al., 2009).

Μία ενδιαφέρουσα πρόταση ήταν η χρήση του Cre-loxP ανασυνδιασμού. Σε αυτή χρησιμοποιήθηκαν λεντιοί που περιείχαν LoxP θέσεις στα άκρα της 3'LTR αλληλουχίας τους. Μετά την ενσωμάτωση και έκφραση των διαγονιδίων, η έκφραση του Cre οδηγούσε στην εκτομή τους. Δυστυχώς διαπιστώθηκε ότι η εκτομή των διαγονιδίων είχε ως αποτέλεσμα γενετική αστάθεια και γενωμικές ανακατατάξεις στα κύτταρα στόχους (Chang et al., 2009).

Η χρήση των παραπάνω ιών έδειξε ότι τα σωματικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν και χωρίς ο φορέας των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας να ενσωματώνει το γενετικό του υλικό σε αυτά. Το ενδιαφέρον έτσι στράφηκε στη δημιουργία μη ιικών φορέων επαναπρογραμματισμού, οι οποίοι είναι πιο ασφαλείς και εύκολοι στην κατασκευή τους. Η ομάδα του Okita το 2008 ανέφερε πρώτη φορά τη χρήση πολυσιτρονικών πλασμιδίων, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα των κυττάρων, με χρήση της ουσίας Lipofectamine ως μέσο διαμόλυνσης. Με αυτή την τεχνική το ποσοστό ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα των κυττάρων είναι πολύ χαμηλό, της τάξης του 1-0,1% (Okita et al., 2008).

Μεγάλες προσδοκίες δημιουργήθηκαν για το PiggyBac τραπεζόνοιο, το οποίο έχει την ικανότητα τόσο της ενσωμάτωσης όλων των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού, όσο και της εκτομής τους από το γονιδίωμα του κυττάρου (Elick et al., 1996). Η απομάκρυνση των γονιδίων αυτών από το γονιδίωμα του κυττάρου-στόχου εξασφαλίζεται με την έκφραση του ενζύμου τραπεζοζάση, που αυτό φέρει. Η τραπεζοζάση παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια στην εκτομή των διαγονιδίων, ενώ η απόδοση επαναπρογραμματισμού της τεχνικής αυτής είναι εφάμιλλη της χρήσης ρετροϊών (Wang et al., 2008, Yusa et al., 2009). **(Εικόνα 7)**



**Εικόνα 7:** Οι μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας κλωνοποιούνται σε ένα τρανσποζόνιο-φορέα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται διαμόλυνση των κυττάρων-στόχων με το τρανσποζόνιο και την τρανσποζάση. Η τρανσποζάση «κόβει» τα γονίδια-«φορτίο» και τα ενσωματώνει σε τυχαίες TTAA θέσεις, όπου και εκφράζονται, ενώ στην συνέχεια τα απομακρύνει από το DNA του κυττάρου (Πηγή: [www.herbiolabs.com](http://www.herbiolabs.com))

### 2.3.2.3. Μη - DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Non- Integrating Non-DNA-based methods)

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με στόχο την μείωση ενσωμάτωσης γενετικού υλικού στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα, προκειμένου να μειωθούν οι πιθανοί κίνδυνοι. Ωστόσο σε όλες απαιτείται η χρήση γενετικού υλικού, κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μη αναμενόμενες γενετικές τροποποιήσεις (Lai et al., 2011).

Μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική αποτέλεσε η χρήση των πρωτεϊνικών προϊόντων των μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού, με απευθείας εισαγωγή τους στα

διαφοροποιημένα κύτταρα, με τη βοήθεια πεπτιδίων πολυαργινίνης (CPPs, Cell-Penetrating Peptides) (Zhou et al., 2009). Τα ανασυνδυασμένα αυτά πρωτεϊνικά μόρια, εξαιτίας των στερεοχημικών ιδιοτήτων τους, μπορούν και διέρχονται της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-στόχων. Ο επαναπρογραμματισμός επιτυγχάνεται μετά από τέσσερις διαδοχικές διαμολύνσεις των κυττάρων, παρουσία του αναστολέα αποακετυλάσης ιστονών (HDAC) και βαλπροϊκού οξέος (VPA). Αν και η αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού με αυτή την μέθοδο ήταν υψηλή σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF), δεν εμφάνιζε τα ίδια αποτελέσματα και σε ενήλικα κύτταρα (Park et al., 2008). Επιπλέον, ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών απαιτεί επαναλαμβανόμενες διαμολύνσεις, δυσχεραίνοντας την όλη διαδικασία (Gump et al., 2007).

Σημαντικές προοπτικές έχει εμφανίσει και η χρήση συνθετικών μορίων mRNA που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας, για την διαμόλυνση των κυττάρων στόχων. Η μέθοδος αυτή είναι ασφαλής και εμφανίζει απόδοση μεγαλύτερη από αυτή των συστημάτων διαμόλυνσης με ιούς (Warren et al., 2010).

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες στράφηκαν στον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα microRNAs (miRNA) στον έλεγχο της πολυδυναμίας. Αποδείχθηκε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας Sox2, Oct4 και Nanog, προσδένονται στους εκκινητές των περισσότερων miRNAs και ρυθμίζουν την έκφραση αυτών (Barros-delJesus et al., 2008- Marson et al., 2008). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή ομάδων miRNAs, οι οποίες είναι ιδιαίτερα συντηρημένες, κατά την διαφοροποίηση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, τόσο ποντικού (miR-290) όσο και ανθρώπου (miR-302), σε εμβρυϊκά σωματίδια (embryoid bodies) (Suh et al., 2004). Με αύξηση της έκφρασης του miR-302 η ομάδα του Lin επαναπρογραμματίσει ανθρώπινα ενήλικα σωματικά κύτταρα σε iPSCs. Η έκφραση αυτού του miRNA οδήγησε σε καταστολή των επιγενετικών ρυθμιστών AOF2, DNMT1 και MECP1/2, με αποτέλεσμα την καθολική μεθυλίωση του DNA και την τροποποίηση των ιστονών. Τα παραπάνω πειράματα επιπλέον έδειξαν την αναγκαιότητα της επιγενετικής τροποποίησης του προτύπου μεθυλίωσης, για τον αποτελεσματικό επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Lin et al., 2011).

### 2.3.3. Κλινικές εφαρμογές των iPSCs

Το γεγονός ότι τα iPSCs μπορούν να προέλθουν απευθείας από ιστούς ενηλίκων ασθενών, αφενός μειώνει την χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, με όλους τους ηθικούς και νομικούς περιορισμούς που αυτή περιέχει, αφετέρου δίνει την δυνατότητα δημιουργίας εξατομικευμένων σειρών πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, γεγονός που εκμηδενίζει τον κίνδυνο ανοσοαπόρριψης κατά τις μεταμοσχεύσεις. Η χρήση των iPSCs στρέφεται κυρίως προς 2 κατευθύνσεις, την **αναγεννητική ιατρική** και την εξατομικευμένη ιατρική, η οποία αφορά στην **μοντελοποίηση** ασθενειών και την μελέτη φαρμάκων (**Εικόνα 8**).

Η πρώτη κλινική δοκιμή για χρήση διαφοροποιημένων ανθρώπινων εμβρυικών βλαστοκυττάρων εγκρίθηκε το 2009 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ και αφορούσε στην θεραπεία ασθενών που φέρουν τραυματισμούς στην σπονδυλική στήλη (Alper, J. 2009). Σημαντικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης κλινικής δοκιμής ήταν οι ηθικοί προβληματισμοί και η πιθανότητα ανοσοαπόρριψης των μοσχευμάτων λόγω ελλιπούς ιστοσυμβατότητας των χρησιμοποιούμενων ESCs. Η δυνατότητα παραγωγής επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων, με απώτερο στόχο την δημιουργία εξατομικευμένων κυττάρων για την αναγέννηση εκφυλισμένων ή κατεστραμμένων ιστών, άνοιξε νέους δρόμους στην **αναγεννητική ιατρική**. Τα παραγόμενα iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν in vitro σε κύτταρα του πάσχοντος ιστού και με τοπική χορήγησή τους να συμβάλλουν στην αναγέννηση του ιστού, σε περιπτώσεις μυοσκελετικών κακώσεων, ηπατικών βλαβών, κακώσεων του νωτιαίου μυελού κ.α (Tan et al., 2012; Rowe et al., 2019).

Ένας επιπλέον στόχος της αναγεννητικής ιατρικής είναι η θεραπεία ασθενειών με γενετικό υπόβαθρο. Ένα πλήθος μελετών εστιάζουν στην γονιδιακή θεραπεία ασθενειών, μέσω γενετικής τροποποίησης iPSCs, με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε προκλινικό, μέχρι στιγμής, επίπεδο. Η πρώτη ασθένεια στην οποία χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς γενετικά τροποποιημένα iPSCs ήταν η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Στη μελέτη που δημοσιεύτηκε από τον Hanna J. και τους συνεργάτες του το 2007, αναφέρεται η δημιουργία iPSCs από ινοβλάστες ποντικού, στους οποίους έχει προκληθεί γενετική μεταλλαγή προκειμένου να εκφράζουν τον φαινότυπο της νόσου. Στη συνέχεια, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, πραγματοποιήθηκε γενετική επιδιόρθωση της μεταλλαγής, διαφοροποίηση των iPSCs σε προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και μεταμόσχευση σε ποντίκι. Με την τεχνική αυτή παρατηρήθηκε μείωση

των επιπέδων έκφρασης της HBS αιμοσφαιρίνης και σημαντική έκφραση της HBA, υποδηλώνοντας τον επιδιορθωμένο φαινότυπο (Hanna et al., 2007).

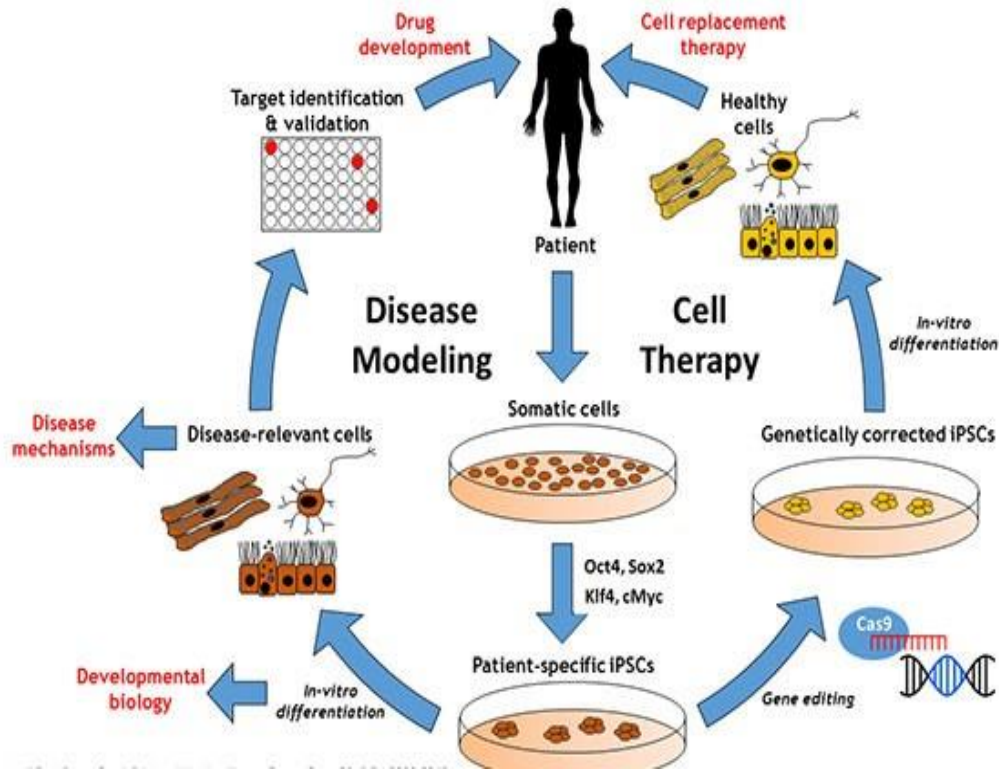
Έκτοτε έχουν δημοσιευθεί αρκετές προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές όπου η χρήση των iPSCs θα μπορούσε να αποτελέσει την πιθανή θεραπεία σε ένα πλήθος ασθενειών. Αρχικά, μεγάλο ενδιαφέρον έχουν προκαλέσει οι εκφυλιστικές ασθένειες των οφθαλμών, αφού η απόπειρα αποκατάστασής τους έχει τα εξής χαρακτηριστικά: εύκολη τοπική χορήγηση κυττάρων, ικανότητα ανοσοανοχής μη ιστοσυμβατών κυττάρων και δυνατότητα άμεσου ελέγχου των πιθανών ανεπιθύμητων αντιδράσεων. Προκλινικές μελέτες για την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας δείχνουν ότι τοπική έγχυση προγονικών νευρικών κυττάρων, που έχουν προέλθει από διαφοροποίηση iPSCs, μπορούν να διατηρήσουν την ικανότητα όρασης μετά από χορήγηση σε οφθαλμό αρουραίου (Tsai et al., 2015). Το 2017 έλαβε χώρα μία κλινική μελέτη για την θεραπεία της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, που σχετίζεται με την νεοαγγειακή ηλικία. Αυτόλογα επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς (RPE), που προήλθαν από διαφοροποίηση iPSCs, μεταμοσχεύθηκαν και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο επίπεδο όρασης του ασθενούς, τα μεταμοσχευμένα κύτταρα παρέμειναν άθικτα ένα χρόνο μετά τη χορήγησή τους (Mandai et al., 2017). Αρκετές προκλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί και για νευρολογικές και μυοσκελετικές ασθένειες. Σε ποντίκια με βλάβη στον νωτιαίο μυελό η χορήγηση νευρικών σφαιριδίων, προερχόμενων από iPSCs, οδήγησε σε βελτίωση της κινητικής λειτουργίας, χωρίς επακόλουθη ογκογένεση, ενώ παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των νευρικών σφαιριδίων σε νευρικά κύτταρα και αγγειογένεση (Nori et al., 2011). Ιδιαίτερα σημαντικά αποτελέσματα παρατηρούνται επίσης και στην περίπτωση της μυϊκής δυστροφίας Duchene, όπου με τη χρήση ανθρώπινων τεχνητών χρωμοσωμάτων (HACs) δημιουργήθηκαν επιδιορθωμένοι μυϊκοί ιστοί προερχόμενοι από iPSCs από ποντικό και άνθρωπο (Kazuki et al., 2010). Προκλινικές μελέτες επίσης έχουν πραγματοποιηθεί και για μεταβολικές ασθένειες, όπως ο διαβήτης τύπου I. Ανθρώπινα iPSCs από ινοβλάστες διαφοροποιήθηκαν σε β-παγκρεατικά κύτταρα, χορηγήθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, που έφεραν τη νόσο και παρατηρήθηκε φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης (Zhu et al., 2016). Τέλος, η πρώτη κλινική μελέτη για την θεραπεία της νόσου του Parkinson με iPSCs ξεκίνησε το 2018, από την ερευνητική ομάδα του Takahasi σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο του Kyoto. Διαφοροποιημένα iPSCs σε προγονικά ντοπαμινεργικά κύτταρα, εγχύθηκαν στους 7 ασθενείς από τους οποίους



προήλθαν. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, τόσο σχετικά με την πορεία της νόσου όσο και με τις πιθανές παρενέργειες, αναμένεται να ολοκληρωθούν δύο χρόνια μετά την έναρξη της (UMIN Kyoto Trial, 2018).

Συχνός περιοριστικός παράγοντας στην θεραπεία αρκετών ασθενειών είναι η αδυναμία κατανόησης των παθογενετικών μηχανισμών της κάθε νόσου. Η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων έχει συμβάλει σημαντικά στην μελέτη της παθογένειας διαφόρων ασθενειών και την **μοντελοποίηση** αυτών.

Τα ζωικά μοντέλα, μιμούμενα ως ένα βαθμό τα ανθρώπινα κυτταρικά μικροπεριβάλλοντα, χρησιμοποιήθηκαν για πολλά χρόνια ως βάση για την διερεύνηση των μηχανισμών αυτών. Ωστόσο, εμφάνιζαν αρκετούς περιορισμούς στη μελέτη ανθρώπινων ασθενειών, καθώς αδυνατούσαν να προσομοιάσουν πλήρως το ανθρώπινο κυτταρικό περιβάλλον, λόγω των διαφορών στο γονιδίωμά τους και κατ'επέκταση στην έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών που καθορίζουν τις βιολογικές λειτουργίες. Η ανακάλυψη των iPSCs έδωσε μία σημαντική λύση στους περιορισμούς αυτούς, με την δημιουργία πλέον νοσοειδικών iPSCs σειρών (disease-specific iPSCs) από ασθενείς με γνωστά γενετικά νοσήματα. Αυτές οι κυτταρικές σειρές φέρουν τον γονότυπο της γενετικής δυσλειτουργίας και με την επακόλουθη διαφοροποίηση τους προς τον κυτταρικό τύπο ο οποίος πάσχει, χρησιμεύουν ως πρότυπο για την μελέτη της παθογένειας και επακολούθως της θεραπείας της νόσου.



**Εικόνα 8:** Η χρήση των iPSCs στην έρευνα και την αναγεννητική ιατρική (Πηγή: Stadtfeld and Hochedinger *Genes Dev.* 2010; 24:2239-2263)

Το 2008 αναφέρθηκαν οι πρώτες δύο επιτυχημένες προσπάθειες δημιουργίας νοσοειδικών iPSCs κυτταρικών σειρών. Η πρώτη μελέτη αναφέρεται στην δημιουργία iPSCs από ασθενείς με διάφορες νόσους μενδελικής ή πολυπαραγοντικής κληρονομικότητας (Park et al., 2008), ενώ η δεύτερη στην δημιουργία κυτταρικών σειρών από ασθενή με οικογενή αμυοατροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), οι οποίες στην συνέχεια διαφοροποιήθηκαν σε κινητικούς νευρώνες *in vitro* (Dimos et al., 2008). Έκτοτε έχουν δημοσιευθεί πολλές έρευνες για την δημιουργία νοσοειδικών iPSCs από ένα πλήθος ασθενειών όπως νευροεκφυλιστικές (ALS- Li et al., 2015, Σύνδρομο Rett- Djuric et al., 2015, SCA 2- Xia et al., 2013), μεταβολικές (MELAS- Hamalainen et al., 2013, Νόσος Gaucher- Panicker et al., 2012, Οικογενής υπερχοληστερολαιμία- Rashid et al., 2010), αιματολογικές (AML- Chao et al., 2017, Diamond Blackfan- Ge et al., 2015, Severe Combined Immunodeficiency- Huang et al., 2015, Οικογενής διαταραχή Αιμοπεταλίων- Sakurai et al., 2014), σκελετικές (Νόσος Menkes- Kim et al., 2015, Σκελετική Δυσπλασία- Saitta et al., 2014, Σύνδρομο Marfan- Quatro et al., 2012), οφθαλμολογικές (Μελαγχρωστική αμφιβληστροπάθεια (RP)- Schwarz et al., 2015,



Εκφύλιση ωχράς κηλίδας- Chag et al., 2014, Συγγενής Αμαύρωση Leber (LCA)- Lustremant et al., 2013), κακοήθειες (Σύνδρομο Li Fraumeni- Lee et al., 2015, Αδενοκαρκίνωμα Παγκρεατικού Πόρου- Kim et al., 2013, Καρκίνος Γαστρεντερικού- Miyoshi et al., 2010).

Η δυνατότητα μελέτης της φυσιολογίας και της αιτιοπαθογένειας διαφόρων ασθενειών με την χρήση των iPSCs, έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στον σχεδιασμό νέων και εξατομικευμένων φαρμάκων για την θεραπεία τους. Έχει πραγματοποιηθεί μία πληθώρα ερευνών σχετικά με τον σχεδιασμό τέτοιων φαρμάκων με ελπιδοφόρα αποτελέσματα, ωστόσο αυτές μέχρι σήμερα είτε έχουν παραμείνει σε εργαστηριακό επίπεδο είτε χρειάζονται περαιτέρω έλεγχο για την αξιολόγηση της τοξικότητας των φαρμάκων αυτών. Ένας επιπλέον περιοριστικός παράγοντας στη δημιουργία εξατομικευμένων φαρμάκων είναι οι περιπτώσεις ασθενειών που έχουν πολυπαραγοντικό ή μη γενετικό υπόβαθρο (Yanhong et al., 2017).

Οι πρώτες έρευνες πραγματοποιήθηκαν για μία πιθανή θεραπεία του Alzheimer. Από iPSCs ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια της πρεσενιλίνης, δημιουργήθηκαν νευρώνες και παρατηρήθηκε ανταπόκριση της αμυλοειδούς β σε αναστολείς της γ-σεκρετάσης (Yagi et al., 2011). Επίσης, σε μία άλλη αντίστοιχη μελέτη φαίνεται ότι αναστολείς της β-σεκρετάσης μειώνουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Tau (Israel et al., 2012). Σε καρδιακές νόσους και συγκεκριμένα στο σύνδρομο LQT, που οφείλεται σε διαταραχές των διαύλων καλίου νατρίου, έχουν επίσης αναφερθεί πιθανοί θεραπευτικοί μηχανισμοί. Σε iPSCs ασθενών χορηγήθηκαν είτε αναστολείς των συγκεκριμένων ιοντικών καναλιών είτε φάρμακα που ενισχύουν την διέλευση των ιόντων, ως πιθανοί ρυθμιστές των διαταραχών (Itzhaki et al., 2011). Τέλος, δοκιμές σχεδιασμού φαρμάκων in vitro έχουν γίνει και για άλλες ασθένειες όπως το σύνδρομο Down, η χορεία του Huntington, η νόσος Parkinson, μιτοχονδριακές ασθένειες, η αναιμία Diamond Blackfan, η οικογενής υπερχοληστερολαιμία, το σύνδρομο Gaucher, το σύνδρομο Rett, κ.α. (Elitt et al., 2018 ; Wattanapanitch et al., 2018).

Στις πρώτες μελέτες μοντελοποίησης ασθενειών, η διαφοροποίηση των iPSCs πραγματοποιούνταν σε 2D μονοστιβάδες κυττάρων (2D monolayers). Η μέθοδος αυτή όμως έχει το μειονέκτημα ότι αδυνατεί να αναπαραστήσει την δομή ιστών και οργάνων, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών κυττάρων και του εξωκυττάρου περιβάλλοντος, όπως συμβαίνει in vivo σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό. Λύση στο παραπάνω πρόβλημα έδωσε η επίτευξη της δημιουργίας των οργανοειδών (organoids),

τριδιάστατων πολυκυτταρικών συσσωματώματων που προέρχονται από βλαστοκύτταρα. Τα οργανοειδή διαφοροποιούνται και αυτοοργανώνονται με τέτοιο τρόπο, που μπορούν να αναπαραστήσουν τα δομικά χαρακτηριστικά και τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις ώριμων ιστών. Η ανακάλυψη αυτή αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο στην εξέλιξη της έρευνας των iPSCs για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη μιας νόσου και τον σχεδιασμό πιθανής θεραπείας της (McCaleuy et al., 2017; Liu et al., 2018). Ωστόσο, και αυτή η μέθοδος παρουσιάζει περιορισμούς, καθώς ο σχηματισμός των οργανοειδών εξαρτάται σημαντικά από την αυτοοργάνωση, με αποτέλεσμα να παρατηρείται κυτταρική ετερογένεια ακόμη και μεταξύ οργανοειδών που προέρχονται από την ίδια κυτταρική σειρά. Παρόλο που τα οργανοειδή δε μπορούν να αντικατοπτρίσουν πλήρως την δομή και την φυσιολογία ενός ανθρώπινου ιστού, προσφέρουν τεράστιες δυνατότητες έρευνας και μέχρι τώρα έχουν δημιουργηθεί διάφοροι τύποι ιστών όπως νευρικός, γαστρεντερικός, ηπατικός, καρδιακός, με σκοπό να μελετηθούν οι αντίστοιχες ασθένειες που εμφανίζονται στα όργανα που αναπαριστούν (Rowe et al., 2019).

### 3. Γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες των iPSCs

Το γονιδίωμα των iPSC μπορεί να φέρει ένα ευρύ φάσμα ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένης της ανευπλοειδίας, ποικιλομορφιών αριθμού υποχρωμοσωμικών αντιγράφων (copy number variation, CNV) και ποικιλομορφιών ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide variations, SNV). Επιπλέον, σε πολλές δημοσιευμένες μελέτες φαίνεται ότι τα iPSCs συχνά εμφανίζουν την επιγενετική μνήμη των σωματικών κυττάρων από τα οποία προήλθαν (Kim et al., 2010), πρόωρη γήρανση κατά την καλλιέργεια τους (Feng et al., 2010), βράχυνση των τελομερών τους και μειωμένη δραστηριότητα της τελομεράσης (Vaziri et al., 2010). Αυτές οι ανωμαλίες μπορεί να έχουν δημιουργηθεί με διάφορους τρόπους κατά τη διάρκεια της παραγωγής ή της καλλιέργειάς τους, με κυριότερους να είναι οι εξής:

Αρχικά, τα iPSCs προέρχονται από διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα που μπορεί να φέρουν προϋπάρχουσες γενετικές ανωμαλίες. Αυτές οι ανωμαλίες μπορεί να επηρεάσουν την κλινική ποιότητα των επαναπρογραμματισμένων iPSCs (Rohani et al., 2014), επιδρώντας στην γενετική σταθερότητά τους, όπως έδειξε η ομάδα του Yu (Yu et al., 2015). Επίσης, λόγω της χαμηλής απόδοσης του επαναπρογραμματισμού και της

κλωνικής φύσης της παραγωγής τους, μεμονωμένες κυτταρικές σειρές iPSCs είναι δυνατόν να φέρουν γενετικές ανωμαλίες από μεμονωμένα αρχικά κύτταρα, ακόμη και αν οι ανωμαλίες αυτές εμφανίζονται σε χαμηλή συχνότητα μεταξύ των προγονικών κυττάρων. Επιπλέον, εάν ορισμένες από αυτές τις γενετικές ανωμαλίες στα αρχικά σωματικά κύτταρα, διευκολύνουν τον επαναπρογραμματισμό των iPSCs, θα επικρατήσουν και θα εμφανίζονται στις παραγόμενες κυτταρικές σειρές.

Δεύτερον, η ίδια η διαδικασία επαναπρογραμματισμού των κυττάρων στην κατάσταση της πολυδυναμίας πιθανώς να είναι μεταλλαξιόγonos και μπορεί να εισάγει *de novo* ανωμαλίες, όπως τα CNVs και οι ελλείψεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Hussein et al., 2011, Laurent et al., 2011). Επιπλέον, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην αποσυμπυκνωμένη μορφή της, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μετάβασης των κυττάρων από την διαφοροποιημένη στην πολυδύναμη κατάσταση, μπορεί να προκαλέσει γενετικές ανωμαλίες στα iPSCs (Liang et al., 2012), ενώ ανωμαλίες στις επιγενετικές τροποποιήσεις και στα πρότυπα μεθυλίωσης που προκαλούνται από τον επαναπρογραμματισμό έχουν επίσης αναφερθεί στα iPSCs (Desmarais et al., 2012). Καθώς η ολική υπομεθυλίωση συνδέεται ιδιαίτερα τόσο με την γήρανση όσο και με την καρκινογένεση, τυχόν λάθη στην διαδικασία της επιγενετικής αναδιαμόρφωσης θα μπορούσαν να έχουν άμεσο αντίκτυπο στην γενετική σταθερότητα των παραγόμενων κυττάρων (Johnson et al., 2012).

Ελλιπής επαναπρογραμματισμός, χρήση μη ασφαλών μεθόδων επαναπρογραμματισμού ή ακόμα και η αδυναμία του επαναπρογραμματισμού να αντιστρέψει μια προϋπάρχουσα ανωμαλία (Rohani et al., 2014), μπορεί να οδηγήσει τόσο σε επιγενετικές όσο και γενετικές ανωμαλίες σε μία κυτταρική σειρά iPSC (Liang G and Zhang Y, 2013). Αντιθέτως, έχει αναφερθεί ότι η ίδια η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού μπορεί να διορθώσει χρωμοσωμικές ανωμαλίες που υπάρχουν στα σωματικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, ινοβλάστες ασθενούς που περιείχαν δαχτυλιοειδή χρωμοσώματα παρουσίασαν αυτόνομες κυτταρικές διορθώσεις κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού τους σε iPSCs. Στα παραγόμενα βλαστικά κύτταρα το μη φυσιολογικό χρωμόσωμα αντικαταστάθηκε από το άγριου τύπου ομόλογο του (Bershteyn et al., 2014). Απομένει να διευκρινιστεί, σε επόμενες μελέτες, ποιες ανωμαλίες μπορούν και ποιες δεν μπορούν να διορθωθούν κατά την διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού.

Τρίτον, η παρατεταμένη καλλιέργεια των iPSCs μπορεί να ευθύνεται για την εισαγωγή ή επικράτηση γενετικών αλλοιώσεων που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων ποικιλομορφιών αριθμού αντιγράφων (CNVs) λόγω εκτεταμένης καλλιέργειας έχει ήδη τεκμηριωθεί σε iPSCs (Martins-Taylor et al., 2011), ενώ παραλλαγές του αριθμού χρωμοσωμικών αντιγράφων καθώς και ένα σημαντικό ποσοστό ελλείψεων έχουν επιπλέον αναφερθεί σε καλλιεργούμενα iPSCs (Laurent et al., 2011).

Εκτός από τις παραπάνω αιτίες όμως, ορισμένες αλλοιώσεις μπορεί να προκύπτουν ακόμη και από την έμφυτη γενετική αστάθεια της πολυδύναμης κατάστασης *in vitro* (Liang G and Zhang Y, 2013).

Είναι προφανές ότι τα παραπάνω προκάλεσαν σοβαρές ανησυχίες σχετικά με την κλινική χρησιμότητα τους, ειδικά όσον αφορά στις θεραπείες μεταμόσχευσης (Rohani et al., 2014).

### **3.1. Γενετικές Ανωμαλίες**

#### **3.1.1. Ανευπλοειδίες**

Ανωμαλίες στον αριθμό των χρωμοσωμάτων αναφέρονται συχνά σε *in vitro* καλλιεργημένα προγονικών βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των iPSCs και των ESCs. Μια αναδρομική μελέτη από το International Stem Cell Initiative αποκάλυψε ότι περίπου μία στις τρεις κυτταρικές σειρές ανθρώπινων hESCs ή hiPSCs εμφανίζουν ανωμαλίες στον καρυότυπο σε τουλάχιστον μία ανακαλλιέργεια (Amps et al., 2011), ενώ σε μία δεύτερη μελέτη φαίνεται ότι το 13% των καλλιεργειών hESCs και hiPSCs φέρουν καρυοτυπικές ανωμαλίες (Taapken et al., 2011), με πιο συχνή την τρισωμία 12 και λιγότερα συχνές τις τρισωμίες του χρωμοσώματος 8 και του χρωμοσώματος X (Amps et al., 2011; Mayshar et al., 2010; Taapken et al., 2011). Τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα ανευπλοειδίας των προγονικών βλαστικών κυττάρων πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζουν την προσαρμογή αυτών των κυττάρων στις συνθήκες της καλλιέργειας *in vitro* (Baker et al., 2007), με την συχνότητα εμφάνισης ανευπλοειδιών γενικά να αυξάνεται κατά την διάρκεια των συνεχών ανακαλλιεργειών, αν και ανωμαλίες μπορούν να ανιχνευθούν και σε πρώιμα περάσματα, όπως επίσης και φυσιολογικοί καρυότυποι μπορούν να βρεθούν και μετά από μεγάλο αριθμό ανακαλλιεργειών (Amps et al., 2011; Taapken et al., 2011). Επιπλέον, μπορεί η

ανευπλοειδία να ανιχνευθεί σε συγκεκριμένο υποπληθυσμό της καλλιέργειας των hiPSCs, γεγονός που υποδεικνύει την θετική επιλογή αυτών των ανωμαλιών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (Amps et al., 2011; Mayshar et al., 2010; Taarcken et al., 2011). Η απόκτηση ενός επιπλέον αντιγράφου συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων φαίνεται να προσδίδει πλεονέκτημα ανάπτυξης των κυττάρων που τα φέρουν, αυξάνοντας πιθανώς τη δοσολογία γονιδίων που είναι επωφελή για την αυτοανανέωση ή τον πολλαπλασιασμό τους. Για παράδειγμα, στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 12 εδράζονται τα γονίδια πολυδυναμίας NANOG και GDF3, κάτι που μπορεί να εξηγήσει την συχνά παρατηρούμενη τρισωμία αυτού του χρωμοσώματος σε καλλιεργημένες σειρές hESCs και hiPSCs (Draper et al., 2004; Mayshar et al., 2010). Ωστόσο, παρά τη γενική συσχέτιση μεταξύ επαναλαμβανόμενης ανευπλοειδίας και παρατεταμένης καλλιέργειας, δεν είναι ακόμα σαφές εάν διακυβεύεται γενικά η σταθερότητα του συνόλου των χρωμοσωμάτων στα προγονικά βλαστικά κύτταρα.

Η χρωμοσωμική κατάσταση των iPSCs μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τα σωματικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται καθώς και από την ίδια την διαδικασία επαναπρογραμματισμού. Ο επαναπρογραμματισμός έχει αποδειχθεί ότι είναι συμβατός με ανευπλοειδικά αρχικά σωματικά κύτταρα, όπως στην περίπτωση ινοβλαστών με τρισωμία 21 από ασθενείς με σύνδρομο Down (Park et al., 2008). Σε μία μελέτη όπου τα αρχικά κύτταρα έφεραν τρισωμία 21 και περιείχαν ένα διαγονίδιο στο ένα αντίγραφο του χρωμοσώματος 21, φάνηκε ότι το ποσοστό αυθόρμητης απώλειας αυτού του χρωμοσώματος είναι περίπου  $10^{-4}$  (Li et al., 2012a). Ωστόσο δεν είναι ακόμα γνωστό αν τα ευπλοειδικά και τα ανευπλοειδικά iPSCs εμφανίζουν παρόμοιο ποσοστό απώλειας χρωμοσωμάτων, ενώ είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι υψηλά ποσοστά ανευπλοειδίας στα αρχικά σωματικά κύτταρα δεν μεταφράζονται πάντα σε παρόμοια υψηλά ποσοστά στις παραγόμενες κυτταρικές σειρές iPSCs (Hamada et al., 2012). Φαίνεται αρκετά πιθανό ότι η εμφανιζόμενη ανευπλοειδία, που προέρχεται από διαφορετικά αίτια, υπόκειται σε διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις κατά την διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, έχοντας ως αποτέλεσμα διαφορετικά επίπεδα ανοχής στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα. Ως εκ τούτου, η ανευπλοειδία στις κυτταρικές σειρές των iPSCs μπορεί να κληρονομηθεί από τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται, αλλά εάν ο επαναπρογραμματισμός δρα υπέρ ή κατά της πρόκλησης ανευπλοειδίας εξαρτάται από τον τρόπο που αυτή δημιουργείται (Liang G and Zhang Y., 2013).

### 3.1.2. Υποχρωμοσωμικές ποικιλομορφίες- CNVs και SNVs

Με χρήση καρυοτυπικής ανάλυσης ή μετα-ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης έχει εντοπιστεί ένα πλήθος CNVs επιπέδου Mb, τα οποία μοιράζονται τα hiPSCs και τα hESC. Κάποια από αυτά τα CNVs εμφανίζονται σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές θέσεις, όπως για παράδειγμα πλησίον του γονιδίου πολυδυναμίας NANOG στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 12 ή του DNMT3B στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 20 (Laurent et al., 2011; Martins- Taylor et al., 2011; Mayshar et al., 2010). Αυτή η προτίμηση εμφάνισης των CNVs σε συγκεκριμένες θέσεις, υποδεικνύει ότι μπορεί να επιλέγονται κατά τη διάρκεια της *in vitro* έκπτυξης των κυττάρων. Επιπλέον, τα CNVs μπορούν να κληρονομηθούν στα iPSCs από τα αρχικά σωματικά κύτταρα ή και να δημιουργηθούν κατά τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού. Συγκριτικές γονιδιωματικές αναλύσεις πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNP), ανιχνεύουν υψηλότερη συχνότητα CNVs στα hiPSCs, συγκρινόμενα με τα hESCs, με τα αρχικά σωματικά κύτταρα ή με ανθρώπινα διαφοροποιημένα κύτταρα (Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011).

Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι τα CNVs που εντοπίζονται ειδικά στα iPSCs δημιουργούνται από την διαδικασία του επαναπρογραμματισμού. Μία σχετικά πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα CNVs που εμφανίζονται στα iPSC δημιουργούν ένα γενετικό μωσαϊκό σε κυτταρικές σειρές iPSC στις πρώιμες ανακαλλιέργειές τους. Το μωσαϊκό αυτό χάνεται σταδιακά μέσω της καλλιέργειας των κυττάρων, κάτι που συνάδει με την διαπίστωση ότι τα περισσότερα από αυτά τα CNVs είναι ελλείμματα, πιθανότατα δυσμενή για την επιβίωση των κυττάρων (Hussein et al., 2011). Περαιτέρω διερεύνηση αυτών των CNVs έδειξε ότι συχνά εμφανίζονται σε εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος (Hussein et al., 2011). Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία επαναπρογραμματισμού παράγει *de novo* CNVs, εξαιτίας του αυξημένου στρες που υφίστανται τα κύτταρα (Hussein et al., 2013). Σε μία άλλη μελέτη αναφέρεται η ανίχνευση, σε υψηλή συχνότητα, ελλειμμάτων κυρίως κοντά σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, στις πρώτες ανακαλλιέργειες των iPSCs. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο αυτών των CNVs στον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων (Laurent et al., 2011). Ωστόσο, η ομάδα του Abyzov δεν κατάφερε να επιβεβαιώσει τα ευρήματα των δύο παραπάνω μελετών (Abyzov et al., 2012). Η μελέτη αυτή, όπως και άλλες που βασίζονται στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Cheng et



al., 2012; Gore et al., 2011; Quinlan et al., 2011; Young et al., 2012), έδειξαν ότι η παραγωγή των iPSC δεν οδηγεί απαραίτητα στην παραγωγή de novo CNVs, εφόσον ναι μεν ορισμένα από τα CNVs ενδέχεται να προκύψουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού, ωστόσο η κύρια πηγή δημιουργίας τους είναι ο χαμηλού βαθμού γενετικός μωσαϊκισμός των αρχικών σωματικών κυττάρων (Liang G and Zhang Y., 2013).

Τα SNVs έχουν μελετηθεί τόσο σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων iPSCs όσο και ποντικού, με τη χρήση αλληλούχισης υψηλής απόδοσης ολόκληρου του γονιδιώματος ή μόνο των εξονίων (περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες). Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος αποκάλυψε περισσότερα από χίλια SNVs για κάθε εξεταζόμενη κυτταρική σειρά hiPSC και εκατοντάδες στις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές ποντικού, αλλά ο μέσος αριθμός SNVs σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εκτιμάται ότι δεν είναι μεγαλύτερος από λίγες δεκάδες και για τα δύο είδη (Cheng et al., 2012; Gore et al., 2011; Ji et al., 2012; Ruiz et al., 2013; Young et al., 2012).

Ο αριθμός των SNVs σε κάθε κυτταρική σειρά iPSCs φαίνεται να είναι ανεξάρτητος των μεθόδων εισαγωγής των παραγόντων επαναπρογραμματισμού (υικός φορέας, επισωματικός φορέας, ή μόριο mRNA) ή τον τύπο των αρχικών σωματικών κυττάρων (Gore et al., 2011; Ruiz et al., 2013). Επιπλέον, περισσότερα από τα μισά SNVs που εντοπίζονται σε εξώνια στα iPSCs μπορούν να εντοπιστούν και στα αρχικά σωματικά κύτταρα (Gore et al., 2011; Young et al., 2012). Έτσι, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα μόνο η μελέτη της ομάδας των Ji και συν. έχει υποστηρίξει ότι η πλειονότητα των SNVs προέρχεται από τη διαδικασία επαναπρογραμματισμού (Ji et al., 2012), ενώ φαίνεται ότι η κύρια πηγή αυτών που εκδηλώνονται στα iPSCs προέρχεται από τα αρχικά σωματικά κύτταρα (Liang G and Zhang Y., 2013).

Επίσης, οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχουν κοινά SNVs μεταξύ των κυτταρικών σειρών iPSC που εξετάστηκαν (Cheng et al., 2012; Gore et al., 2011; Ji et al., 2012; Ruiz et al., 2013), προτείνοντας τη στοχαστική φύση παραγωγής των iPSC και των σχετιζόμενων με τον επαναπρογραμματισμό μεταλλάξεων. Ωστόσο, σε μία μελέτη φάνηκε ότι όλοι οι κλώνοι iPSCs που επιλέχθηκαν μοιράζονταν ένα σύνολο παραλλαγών που προέρχονταν από τα αρχικά σωματικά κύτταρα (Young et al., 2012), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένα γενετικά μοτίβα των αρχικών κυττάρων ευνοούν τον επαναπρογραμματισμό και πιθανώς επιλέγονται κατά τη δημιουργία των

iPSCs. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό προς το παρόν πώς αυτό το σύνολο παραλλαγών παρέχει ένα πλεονέκτημα επαναπρογραμματισμού στα κύτταρα που το φέρουν.

Επιπλέον, μια μελέτη παρακολούθησης που εξέτασε τη λειτουργικότητα των SNVs που εκδηλώνονται στα iPSCs, υποστήριξε ότι, γενικά, τα γονίδια που φέρουν αυτά τα SNVs δεν διευκολύνουν τη δημιουργία iPSCs (Ruiz et al., 2013), καταλήγοντας ότι τα περισσότερα SNVs που εκδηλώνονται στα iPSCs είναι τυχαία διανεμημένα στο γονιδίωμα και δεν σχετίζονται με την παραγωγή τους.

### **3.1.3. p53 και DNA βλάβες ως απόκριση στον επαναπρογραμματισμό. Ακεραιότητα γονιδιώματος iPSCs**

Οι υποχρωμοσωμικές παραλλαγές του γονιδιώματος, οι οποίες μπορεί να συνεισφέρουν στην εμφάνιση CNVs ή SNVs στα iPSCs, αποτελούν συνήθως αποτέλεσμα βλαβών του DNA και επακόλουθη ανεπιτυχή διόρθωσή τους. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι ένας βασικός μεσολαβητής στην απόκριση βλαβών του DNA (DNA Damage Response -DDR) και προστατεύει τη γενωμική ακεραιότητα των κυττάρων, με πρόσφατες μελέτες να έχουν δείξει τον ρόλο του στη δημιουργία των iPSCs.

Έχει αποδειχθεί ότι ο gH2AX, ένας δείκτης για την ύπαρξη θραύσεων στη δίκλωνη έλικα του DNA (Double Strand Breaks- DSBs), αυξάνεται σε ένα μεγάλο ποσοστό στα υπό επαναπρογραμματισμό κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι τα DSBs πυροδοτούνται κατά την έναρξη του επαναπρογραμματισμού (Gonzalez et al., 2013; Kawamura et al., 2009). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται τόσο στις ογκογονικές ιδιότητες των παραγόντων επαναπρογραμματισμού όσο και στην επεξεργασία του γονιδιώματος, κατά την χρήση ιικών φορέων επαναπρογραμματισμού. Επίσης, πιστεύεται ότι το υψηλό πολλαπλασιαστικό ερέθισμα στο οποίο υποβάλλονται τα κύτταρα από τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού μπορεί να τους προκαλέσει stress, το οποίο οδηγεί σε DDR (Hussein et al., 2013).

Λόγω της παρουσίας p53, τα κύτταρα που εμφανίζουν σημαντικές γενωμικές αλλοιώσεις είναι λιγότερο πιθανό να επαναπρογραμματιστούν πλήρως σε προγονικά κύτταρα. Έχει επίσης δειχθεί ότι οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού ή άλλες στρεσογόνες για τα κύτταρα καταστάσεις, όπως το οξειδωτικό stress, προκαλούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού του p53 (Banito et al., 2009; Kawamura et al., 2009), με



αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος των υπό επαναπρογραμματισμό κύτταρων να υφίσταται διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση (Smith et al., 2010). Επομένως, το p53 αποτρέπει τα υπό κατάσταση stress κύτταρα να προχωρήσουν προς την πολυδυναμία. Σε συνέπεια με τα παραπάνω, κύτταρα με ανεπάρκεια p53 που υποβάλλονται σε επαναπρογραμματισμό, εμφανίζουν εκτεταμένες αλλοιώσεις DNA, αφού ο πολλαπλασιασμός τους δεν ελέγχεται από το επαγόμενο από τον επαναπρογραμματισμό stress (Marioń et al., 2009). Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι ακόμη και με τις βλάβες αυτές, ο επαναπρογραμματισμός μπορεί να προχωρήσει στα κύτταρα με ανεπάρκεια p53, παρά τον μη ελεγχόμενο κυτταρικό κύκλο, κάτι που δείχνει ότι για την εγκαθίδρυση της πολυδυναμίας, ο κίνδυνος στον οποίο εκτίθεται η ακεραιότητα του γονιδιώματος είναι σε κάποιο βαθμό ανεκτός από τα κύτταρα (Liang G and Zhang Y., 2013).

Μελέτες δείχνουν ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια επισκευής βλαβών του DNA των iPSCs είναι παρόμοια με αυτά των ESCs, τα οποία θεωρείται ότι έχουν υψηλή απόδοση και πιστότητα (Momcilovic et al., 2011). Στα ESCs ο χαμηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης που παρατηρείται, πιθανώς οφείλεται στα υψηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην σηματοδότηση και την επισκευή βλαβών, συγκρινόμενα με τα διαφοροποιημένα κύτταρα (Maynard et al., 2008; Momcilovic et al., 2011). Επιπλέον, ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR), ένα μονοπάτι επιδιόρθωσης βλαβών DNA πιο ακριβές από την μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non-Homologous End-Joining, NHEJ), φαίνεται ότι προτιμάται για την επιδιόρθωση βλαβών στα ESCs (Serrano et al., 2011; Tichy et al., 2010). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι τόσο στα ESCs όσο και στα iPSCs, τα κύτταρα που φέρουν βλάβες στο DNA μπορούν να αποκλειστούν αποτελεσματικά από τις δεξαμενές πολυδύναμων κυττάρων είτε με επαγωγή διαφοροποίησης τους (Li et al., 2012b; Lin et al., 2005) είτε με απόπτωση (Aladjem et al., 1998). Επομένως, φαίνεται ότι μετά την εγκαθίδρυση της πολυδυναμίας, η γενωμική ακεραιότητα διαφυλάσσεται αποτελεσματικά στις κυτταρικές σειρές των iPSCs.

### 3.2. Επιγενετικές τροποποιήσεις στα iPSC

Η δημιουργία των iPSCs προϋποθέτει την επαναφορά του επιγενετικού προφίλ των κυττάρων (Liang and Zhang, 2013). Ωστόσο, λόγω τόσο ελλιπούς

επαναπρογραμματισμού, όσο και παρατεταμένης καλλιέργειας μπορεί να υπάρχουν επιγενετικές παραλλαγές μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών iPSCs.

### 3.2.1. Παραλλαγές στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος

Σε ποντίκια και ανθρώπους, στα θηλυκά σωματικά κύτταρα συμβαίνει απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X (X Chromosome Inactivation, XCI). Κατά τη διάρκεια επαναπρογραμματισμού θηλυκών σωματικών κυττάρων ποντικού, το ανενεργό X χρωμόσωμα (X inactivated, Xi) επανενεργοποιείται, με αποτέλεσμα την ύπαρξη δύο ενεργών X χρωμοσωμάτων (X activated, Xa) (XaXa) σε iPSCs ποντικού (mouse iPSCs, miPSCs). Το επανενεργοποιημένο X χρωμόσωμα μπορεί να υποστεί εκ νέου απενεργοποίηση κατά την διαδικασία διαφοροποίησης των miPSCs (Maherali et al., 2007).

Σε αντίθεση με τα miPSCs, τα ανθρώπινα iPSCs (hiPSCs) εμφανίζουν μεγάλη μεταβλητότητα όσον αφορά την επιγενετική κατάσταση των χρωμοσωμάτων X (Wutz, 2012). Υπό τις συνηθισμένες συνθήκες παραγωγής και καλλιέργειας τους, η κατάσταση XaXi των σωματικών κυττάρων διατηρείται σε μεγάλο βαθμό κατά την διαδικασία του επαναπρογραμματισμού (Anguera et al., 2012; Cheung et al., 2011; Mekhoubad et al., 2012; Pomp et al., 2011; Tchieu et al., 2010), αν και η κατάσταση XaXa έχει αναφερθεί σε ορισμένες κυτταρικές σειρές hiPSCs (Marchetto et al., 2010). Μετά την διαφοροποίηση, τα XaXa hiPSCs υποβάλλονται σε απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, ενώ τα κύτταρα XaXi διατηρούν την κατάσταση τους μετά την διαφοροποίηση. Ομοίως με τα hiPSCs, η κατάσταση XaXi ανιχνεύθηκε επίσης σε hESCs (Silva et al., 2008), υποδηλώνοντας ότι η απενεργοποιημένη κατάσταση XCI μπορεί να αντικατοπτρίζει τις έμφυτες ιδιότητες των ανθρώπινων προγονικών βλαστικών κυττάρων (PSC) ή τις συνθήκες καλλιέργειας που συνήθως εφαρμόζονται (Liang G and Zhang Y., 2013).

Η παρατηρούμενη ποικιλότητα στην κατάσταση των X χρωμοσωμάτων φαίνεται να σχετίζεται και με την τάση των κυττάρων να χάσουν την ανενεργή κατάσταση του Xi κατά τη διάρκεια παρατεταμένης καλλιέργειας. Η μεταγραφική καταστολή του Xi στα XaXi hiPSCs γίνεται επιρρεπής σε λάθη, όπως φαίνεται σε διάφορες μελέτες, εξαιτίας της απώλειας έκφρασης του Xist και κατασταλτικών τροποποιήσεων της χρωματίνης, όπως η μεθυλίωση του DNA (Anguera et al., 2012; Mekhoubad et al., 2012; Nazor et

al., 2012; Silva et al., 2008; Tchieu et al., 2010). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία hiPSCs που φέρουν ένα Xa και ένα X χρωμόσωμα με λανθασμένη απενεργοποίηση (Xe- X eroded). Έτσι, ενώ ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι το Xe εξακολουθεί να παραμένει μεταγραφικά ανενεργό σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν (Anguera et al., 2012; Tchieu et al., 2010), άλλες μελέτες δείχνουν ότι η λανθασμένη απενεργοποίηση του XCI σχετίζεται με αυξημένη γονιδιακή έκφραση (Mekhoubad et al., 2012; Nazor et al., 2012). Το ιδιαίτερα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από όλες αυτές τις μελέτες είναι ότι τα κύτταρα XaXe φαίνεται να έχουν αναπτυξιακό πλεονέκτημα και σταδιακά να αναλαμβάνουν τον πληθυσμό των hiPSCs, πιθανώς λόγω αυξημένης έκφρασης ογκογονιδίων σε αυτούς τους κυτταρικούς κλώνους (Anguera et al., 2012; Mekhoubad et al., 2012; Tchieu et al., 2010). Επιπλέον τα XaXe hiPSCs εμφανίζουν μειωμένη διαφοροποίηση όταν υποβάλλονται σε κατάλληλες καλλιεργητικές συνθήκες, ιδιότητα που τα προσομοιάζει με καρκινικά κύτταρα (Patel et al., 2017), ενώ το γεγονός ότι η λανθασμένη κατάσταση Xe του X χρωμοσώματος, όταν μεταφέρεται σε διαφοροποιημένα κύτταρα δεν υφίσταται ποτέ XCI, υποδεικνύει τις διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ Xe and Xa (Anguera et al., 2012; Mekhoubad et al., 2012).

### 3.2.2. Παραλλαγές στην επιγενετική κατάσταση των iPSCs

Εκτός από την επιγενετική μεταβλητότητα ολόκληρου του χρωμοσώματος X, τα iPSCs φέρουν επίσης επιγενετικές παραλλαγές σε διάφορα μέρη του γονιδιώματος τους. Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει διαφορές στα επιγενετικά προφίλ μεταξύ κυτταρικών σειρών iPSCs. Ενώ οι τροποποιήσεις ιστονών γενικά εμφανίζουν μικρές διαφοροποιήσεις (Chin et al., 2010; Guenther et al., 2010), έχουν αναφερθεί παραλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε πολλαπλές συγκριτικές μελέτες (Bock et al., 2011; Lister et al., 2011; Nishino et al., 2011; Ruiz et al., 2012). Οι διαφορές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs μπορούν να αποδοθούν είτε στην επιγενετική μνήμη των αρχικών σωματικών κυττάρων είτε σε παρεκκλίνουσα μεθυλίωση που δημιουργείται κατά τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό. Η συνεχής ανακαλλιέργεια μπορεί να μειώσει, να διατηρήσει ή ακόμα και να αυξήσει τις παραλλαγές αυτές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs (Nazor et al., 2012; Nishino et al., 2011).

### 3.2.2.1. Επιγενετική μνήμη αρχικού σωματικού κυττάρου

Λόγω ελλιπούς επαναπρογραμματισμού, οι κυτταρικές σειρές hiPSC ή miPSC ενδέχεται να διατηρούν μέρος της επιγενετικής υπογραφής των αρχικών σωματικών κυττάρων. Ένας τρόπος διατήρησης αυτής της επιγενετικής μνήμης είναι η μη επαρκής αποσιώπηση των γονιδίων εκείνων που είναι ειδικά για την καταγωγή των κυττάρων. Σε αυτούς τους γενετικούς τύπους, η υπομεθυλίωση του DNA και η διαμόρφωση των ιστονών με τρόπο που επιτρέπεται η μεταγραφή, διατηρούνται με παρόμοιο τρόπο στα iPSCs και στα σωματικά κύτταρα από τα οποία αυτά προέρχονται (Bar-Nur et al., 2011; Kim et al., 2010, 2011; Lister et al., 2011; Ohi et al., 2011; Polo et al., 2010; Ruiz et al., 2012).

Επιπλέον, αναλύσεις μεθυλίωσης του DNA σε όλο το γονιδίωμα των iPSCs, έδειξαν ότι η διαμόρφωση των ιστονών δημιουργεί περιορισμούς στην έκφραση όσων γονιδίων δεν σχετίζονται με την ιστοειδική προέλευση των αρχικών σωματικών κυττάρων. Οι γενετικοί τόποι αυτοί εμφανίζονται επιπλέον υπερμεθυλιωμένοι στα iPSCs, σε σύγκριση με ESCs και άρα δεν είναι δυνατή η ενεργοποίησή τους κατά τη διαφοροποίηση (Kim et al., 2010, 2011). Κατά συνέπεια, τα iPSCs που διατηρούν την επιγενετική μνήμη των αρχικών αδιαφοροποίητων κυττάρων, επιδεικνύουν μια προτίμηση διαφοροποίησης προς τις κυτταρικές γραμμές του βλαστικού δέρματος από το οποίο εξ αρχής κατάγονταν (Bar-Nur et al., 2011; Kim et al., 2010, 2011; Polo et al., 2010).

### 3.2.2.2. Ανώμαλη μεθυλίωση DNA

Κατά τον επαναπρογραμματισμό, η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA μπορεί να μεταβληθεί με μη σωστό τρόπο, οδηγώντας στην δημιουργία iPSCs των οποίων το προφίλ μεθυλίωσης διαφέρει τόσο από τα αρχικά σωματικά κύτταρα, όσο και από τα αρχέγονα ESCs.

Ανάλογα με τον γενετικό τόπο που παρατηρείται αυτή η ανώμαλη μεθυλίωση, μπορεί να επηρεάζει μεμονωμένες κυτταρικές σειρές iPSCs ή να εμφανίζεται σε όλες όσες δημιουργούνται και μπορεί να περιέχει συγκεκριμένους αποτυπωμένους τόπους καθώς και άλλες γενωμικές περιοχές.

Η έκφραση των γονιδιακών αποτυπωμένων τόπων υπόκειται σε ρύθμιση από την ειδική για κάθε αλληλόμορφο μεθυλίωση του DNA. Η ριζική αλλαγή στο επιγενετικό τοπίο κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού, εγείρει ανησυχίες ότι ενδέχεται να επηρεάσει την κατάσταση μεθυλίωσης αποτυπωμένων γενετικών τόπων. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι ορισμένες αποτυπωμένες θέσεις είναι ευάλωτες σε επιγενετική αλλοίωση κατά την διάρκεια του επαναπρογραμματισμού ή της παρατεταμένης καλλιέργειας των κυττάρων (Chamberlain et al., 2010; Nazor et al., 2012; Nishino et al., 2011; Pick et al., 2009) και ανάλογα με τον εκάστοτε γενετικό τόπο, ο επαναπρογραμματισμός μπορεί να οδηγήσει σε υπερμεθυλίωση ή υπομεθυλίωση (Nazor et al., 2012; Nishino et al., 2011). Η αλλαγή στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA, τουλάχιστον για κάποιους αποτυπωμένους τόπους, έχει συσχετιστεί με την απώλεια ειδικής έκφρασης των αλληλομόρφων, γεγονός που πιθανώς έχει λειτουργικό αντίκτυπο (Nazor et al., 2012; Pick et al., 2009).

Εκτός από τους αποτυπωμένους τόπους, ο επαναπρογραμματισμός μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλίες στην κατάσταση μεθυλίωσης και άλλων γενετικών περιοχών. Με την τεχνική της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος και την δημιουργία προφίλ μεθυλίωσης, φάνηκε ότι οι διαφορικά μεθυλιωμένες περιοχές (Differentially methylated region- DMRs) μεταξύ hESCs και hiPSCs διαφέρουν και μάλιστα υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η υπερμεθυλίωση είναι η κυρίαρχη ανωμαλία που προκαλείται από τον επαναπρογραμματισμό (Ruiz et al., 2012). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι επιγενετικές ανωμαλίες που δημιουργούνται κατά την διάρκεια του επαναπρογραμματισμού και οι συνεπακόλουθες επιδράσεις τους στην μεταγραφή γονιδίων, μπορεί να μεταδίδονται κατά την διάρκεια διαφοροποίησης των iPSCs και να αλλάζουν τις ιδιότητες των διαφοροποιημένων κυττάρων (Lister et al., 2011; Ruiz et al., 2012).

Μέχρι σήμερα, παραμένει αμφιλεγόμενο εάν τα iPSCs διαφέρουν σημαντικά από τα ESCs όσον αφορά τα επιγενετικά και τα μεταγραφικά τους προφίλ. Συγκεκριμένα, ορισμένες μελέτες έχουν εντοπίσει «hotspots» ή ομάδες γονιδίων στα hiPSCs, των οποίων τα πρότυπα μεθυλίωσης DNA είναι σαφώς διαφορετικά από εκείνα των hESCs, όπως είναι τα γονίδια FAM19A5, FZD10, TCERG1L και TEME132D (Lister et al., 2011; Nishino et al., 2011; Ruiz et al., 2012). Ωστόσο, μια άλλη αναδρομική μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι παραλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA

μεταξύ hESCs και hiPSC, δεν είναι στατιστικά σημαντικότερες από αυτές που παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών hESCs (Bock et al., 2011).

Η απόκλιση μεταξύ αυτών των μελετών πιθανώς οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος του δείγματος, στην μέθοδο παραγωγής των iPSCs καθώς και στις μεθόδους ανάλυσης της μεθυλίωσης του DNA (Yamanaka S., 2012; Johnson et al., 2017) . Ωστόσο, στην κάθε κυτταρική σειρά iPSCs, είναι σημαντικό να διερευνώνται και να χαρακτηρίζονται τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA και τα αποτελέσματα αυτά να λαμβάνονται υπόψη όταν τα iPSCs πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες ελέγχου λειτουργικότητας ή να έχουν θεραπευτική εφαρμογή (Liang G and Zhang Y., 2013).

## **4. Μιτοχόνδρια**

### **4.1. Δομή και χημική σύσταση**

Τα μιτοχόνδρια είναι ωοειδή κυτταροπλασματικά οργανίδια που απαντούν στα ευκαρυωτικά κύτταρα και ανακαλυφθήκαν ως κυτταρικά συστατικά το 1886 από τον Altman, με την χρήση ειδικής χρωστικής, του πράσινου του Janus. Ο όρος μιτοχόνδριο εισήχθη το 1898 από τον Benda και τα οργανίδια αυτά απομονώθηκαν με υπερφυγοκέντρηση το 1904 από τους Bensley και Hoerr. Ωστόσο, τόσο η λεπτομερειακή τους δομή, όσο και η συσχέτιση αυτής με τις βιοχημικές τους λειτουργίες έγινε γνωστή αρκετά χρόνια αργότερα, το 1952. Καταλαμβάνουν περίπου το 18-20% του κυτταροπλασματικού όγκου και δεν είναι στατικά οργανίδια αλλά διαιρούνται και συγχωνεύονται διαρκώς στο κύτταρο, όποτε το περιβάλλον και οι συνθήκες το απαιτούν (Bonda et al., 2010). Με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αποκαλύφθηκε η χαρακτηριστική δομή τους, η εξωτερική μεμβράνη και η εσωτερική που διαφοροποιείται σε πολυάριθμες πτυχώσεις (cristae), και περικλείει μία κοκκιώδη περιοχή που ονομάζεται μιτοχονδριακός χυμός ή μήτρα (matrix). Οι δύο μεμβράνες έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπίδια και πρωτεΐνες, με την εξωτερική να τα περιέχει σε ίδιες αναλογίες και την εσωτερική να είναι πιο πλούσια σε πρωτεΐνες. Η μορφολογία των μιτοχονδρίων και κυρίως η κατανομή των πτυχώσεων φαίνεται να έχει σχέση με τη λειτουργία τους (Μαργαρίτης 1996).

Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει πρωτεΐνες μεταφοράς και είναι διαπερατή στα περισσότερα μικρά μόρια και ιόντα καθώς και ένζυμα μετατροπής λιπιδικών μορίων,



που χρησιμοποιούνται στον μιτοχονδριακό χυμό. Μορφολογικά, έχει διαπιστωθεί κρυσταλλική κατανομή των συστατικών αυτών.

Η εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, η οποία παρέχει δέκα φορές περισσότερη επιφάνεια από όση η πλασματική μεμβράνη ενός κυττάρου, με την ιδιαίτερη λιπιδική (φωσφολιπίδιο καρδιολιπίνη) και την πλούσια πρωτεϊνική της σύσταση (~80%), συμβάλλει στη διεξαγωγή πολύ σημαντικών λειτουργιών. Εκεί έχουν εντοπισθεί αρκετά ένζυμα του κύκλου του Krebs (π.χ. ηλεκτρική αφυδρογονάση), της αναπνευστικής αλυσίδας (κυτοχρώματα b, c1, c, a, a3) και της σύνθεσης ATP, ενώ εμφανίζει υψηλού βαθμού εκλεκτική διαπερατότητα. Στην εσωτερική μεμβράνη ενός τυπικού μιτοχονδρίου εντοπίζονται 5.000–20.000 μονάδες, με την καθεμιά να είναι ικανή να εκτελέσει αυτόνομα μεταφορά ηλεκτρονίων και οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Ο μιτοχονδριακός χυμός που περικλείεται από τις πτυχώσεις περιέχει πολλά συστατικά, όπως ένζυμα του κύκλου του Krebs (κιτρική συνθετάση, ισοκιτρική αφυδρογονάση, φουμαράση, μαλαϊκή αφυδρογονάση), γλουταμική αφυδρογονάση, ένζυμα οξείδωσης λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και DNA, RNA και ριβοσώματα (Μαργαρίτης 1996).

## 4.2. Λειτουργία

Διαδραματίζουν μία ποικιλία ρόλων στον μεταβολισμό της ενέργειας και την κυτταρική ομοιόσταση, συμπεριλαμβανομένων της παραγωγής ATP μέσω της αναπνοής και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), την παραγωγή ειδών δραστικού οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), την μεταβολική ομοιόσταση καθώς και την έναρξη και πραγματοποίηση της απόπτωσης (Mohamed Yusoff AA, 2015).

### 4.2.1. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην παραγωγή ενέργειας

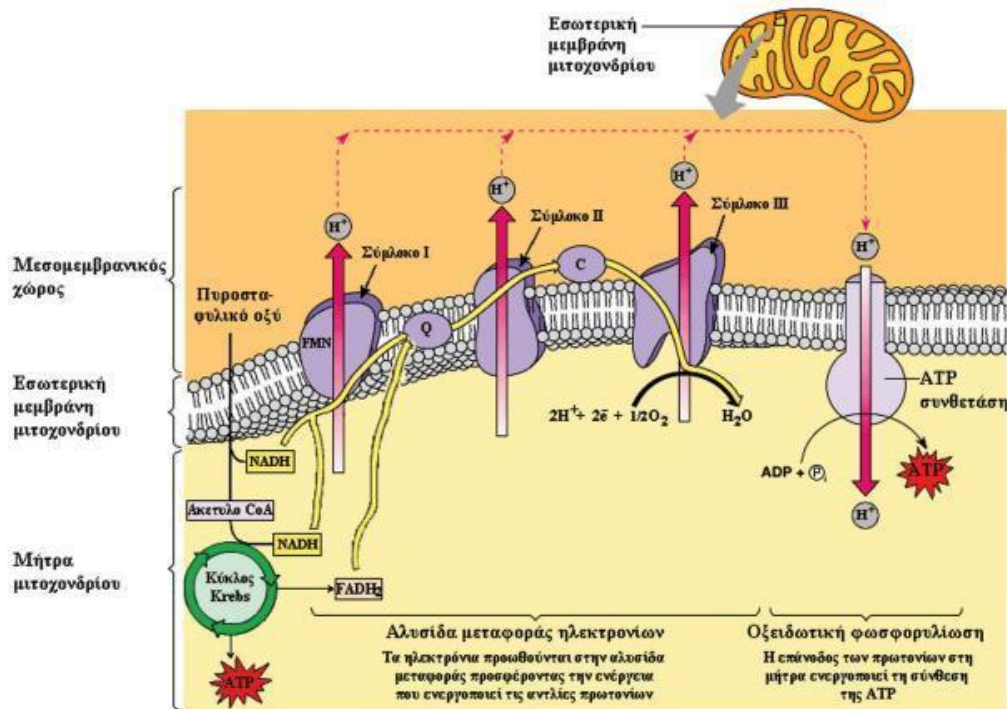
Η κύρια λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP), μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη, την οξείδωση και τον καταβολισμό σακχάρων, λιπαρών οξέων και αμινοξέων, και στη μετέπειτα μετατροπή της ενέργειας που απελευθερώθηκε με την οξείδωση σε ATP. Η διαδικασία της

οξειδωσης επιτελείται στη μήτρα των μιτοχονδρίων με τον κύκλο του Krebs, του οποίου η στοιχειομετρία είναι:



Τα πλούσια σε ενέργεια μόρια NADH και FADH<sub>2</sub> που σχηματίζονται, φέρουν από ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που θα αξιοποιηθούν για την παραγωγή ATP, με τη μεταφορά τους μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που ονομάζεται αναπνευστική αλυσίδα.

Η διαδικασία αυτή επιτελείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων καθώς και στο μεσομεμβρανικό χώρο. Εκεί βρίσκονται μεταφορείς ηλεκτρονίων, που μεταβιβάζουν ηλεκτρόνια από τα NADH και τα FADH<sub>2</sub> στο οξυγόνο και αποτελούνται από 3 βασικά ενζυμικά σύμπλοκα. Το πρώτο σύμπλοκο ονομάζεται NADH-αφυδρογονάση και περιέχει την προσθετική ομάδα FMN. Τα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται πρώτα στην FMN και μετά στην ουμπικινόνη, ένα κινητό μεταφορέα, που τα μεταφέρει στο δεύτερο σύμπλοκο, το οποίο περιέχει το κυτόχρωμα b. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια παραλαμβάνονται από το κυτόχρωμα c και τελικά μεταφέρονται στο ενζυμικό σύμπλοκο III της κυτταροχρωμικής οξειδάσης που μεταξύ άλλων περιέχει το κυτόχρωμα a. Αυτό το σύστημα μεταφορέων ηλεκτρονίων και ενζυμικών συμπλόκων ονομάζεται αναπνευστική αλυσίδα και επαναλαμβάνεται πολλές φορές κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης (**Εικόνα 9**).



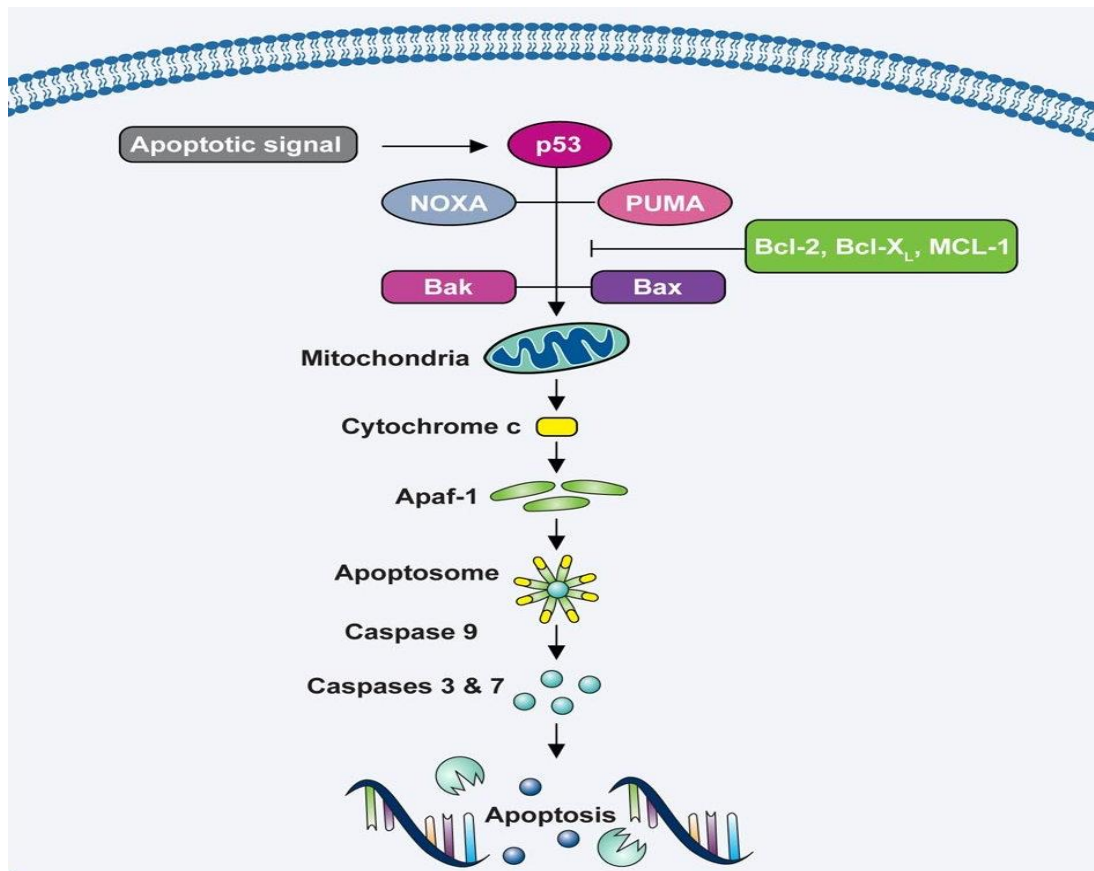
**Εικόνα 9:** Αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Πηγή: <https://slideplayer.gr/slide/11571075/>)

#### 4.2.2. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση και την κυτταρική γήρανση

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων και στον έλεγχο του οξειδωτικού στρες (oxidative stress). Η κυτταρική σηματοδότηση της απόπτωσης συντελείται, είτε με έλλειψη σημάτων επιβίωσης (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες), είτε με παρουσία σημάτων θανάτου (ακτινοβόληση, χημειοθεραπευτικά φάρμακα, συνδέτες, όπως Fas-L και υποδοχέας Fas, TNF και TNF-R). Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση είναι πολύπλοκος (Robertson & Orrenius 2002; van Gurp et al. 2003), ενώ παρατηρείται κατάρρευση του μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων (πτώση επιπέδων ATP), απελευθέρωση ενεργοποιητών πρωτεϊνικής φύσεως (CYTO-C / AIF) και απελευθέρωση υψηλών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (Adam-Vizi 2003). Το μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο τα ROS ρυθμίζουν την απόπτωση, περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ενεργοποίηση των οδών μεταγωγής του σήματος και η ρύθμιση γίνεται από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών BCL-2. Στο δεύτερο στάδιο συμβαίνει διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων, με επακόλουθη

διαφυγή στο κυτταρόπλασμα πρωτεϊνών, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες, ενώ συγχρόνως διαταράσσεται η μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP. Στο τρίτο στάδιο επιτελείται ενεργοποίηση των κασπασών και των νουκλεασών, που προκαλούν τον κερματισμό του DNA (Αγγελοπούλου και Κυριαζόγλου 2005). Στην μιτοχονδριακή ομοίωση συμμετέχουν οι αντι- και προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες BCL-2, δομικά στοιχεία των πόρων της εσωτερικής μεμβράνης, μέσω του ελέγχου της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c καθώς και άλλων προαποπτωτικών παραγόντων από την επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το κυτόχρωμα c συνδυάζεται με τον Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) και την προκασπάση 9, σχηματίζοντας ένα δραστικό σύμπλεγμα, το αποπτώσωμα. Η δραστική κασπάση 9 ενεργοποιεί έναν καταρράκτη από άλλες κασπάσες, όπως την κασπάση 3, δημιουργώντας έτσι έναν αυτορυθμιζόμενο κύκλο ο οποίος επιταχύνει την απόπτωση (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Πηγή: <http://www.biooncology.com/>)

Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, κάτι που φαίνεται ότι σχετίζεται με την γήρανση των κυττάρων (Mandavilli et al. 2002; Rose et al. 2002). Κατά τη διαδικασία της γήρανσης, το μιτοχονδριακό DNA συσσωρεύει μεταλλάξεις (del Bo et al. 2002; Chinnery et al. 2002; Fayet et al. 2002; Lin et al. 2002), με ταυτόχρονη ελάττωση των επιπέδων του (Welle et al. 2003), πιθανόν λόγω της απώλειας της ικανότητας του μιτοχονδριακού DNA να επισκευάζει αλλαγές στο μόριο του (Chen et al. 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι αν και το ποσοστό των μεταλλαγών δεν είναι υψηλό, τα λίγα αυτά κύτταρα που έχουν χάσει τις φυσιολογικές ιδιότητές τους, μπορεί να γίνουν τοξικά για τα υπόλοιπα κύτταρα (de Grey 2002). Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη γήρανση ενισχύεται επιπλέον από την παρατήρηση ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του μιτοχονδριακού DNA φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με το φαινόμενο της γήρανσης (Khaidakov et al. 2003; Niemi et al. 2003). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η συσσώρευση μεταλλαγών στο μιτοχονδριακό DNA με την ηλικία, σχετίζεται με την παθολογία ορισμένων ασθενειών, όπως η νόσος του Parkinson (Gu et al. 2002; Tanaka et al. 2002).

### 4.3. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια είναι τα μοναδικά κυτταρικά οργανίδια των θηλαστικών που περιέχουν το δικό τους γονιδίωμα. Το 1981 η ομάδα του Anderson περιέγραψε για πρώτη φορά την πρωτοταγή δομή του γονιδιώματος των μιτοχονδρίων (Anderson S. et al., 1981). Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο, μεγέθους 16.6 kb και εμφανίζει από δύο έως δέκα αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο. Αντιστοιχεί, ποσοτικά, στο 0.5% του DNA που περιέχει ο πυρήνας ενός σωματικού κυττάρου. Αποτελείται από την πλούσια σε γουανίνη, βαριά αλυσίδα και την συμπληρωματική της ελαφριά αλυσίδα, κωδικοποιώντας 37 γονίδια. Από αυτά τα 13 γονίδια κωδικοποιούν υποομάδες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, 2 κωδικοποιούν rRNA και 22 κωδικοποιούν tRNA. Η σύνθεση αυτή δεν επαρκεί για τις λειτουργικές και δομικές ανάγκες του μιτοχονδρίου γι' αυτό και το μιτοχόνδριο χαρακτηρίζεται ως ημιαυτόνομο οργανίδιο. Οι 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μαζί με περίπου 60 πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA σχηματίζουν τα 5 ενζυμικά συμπλέγματα

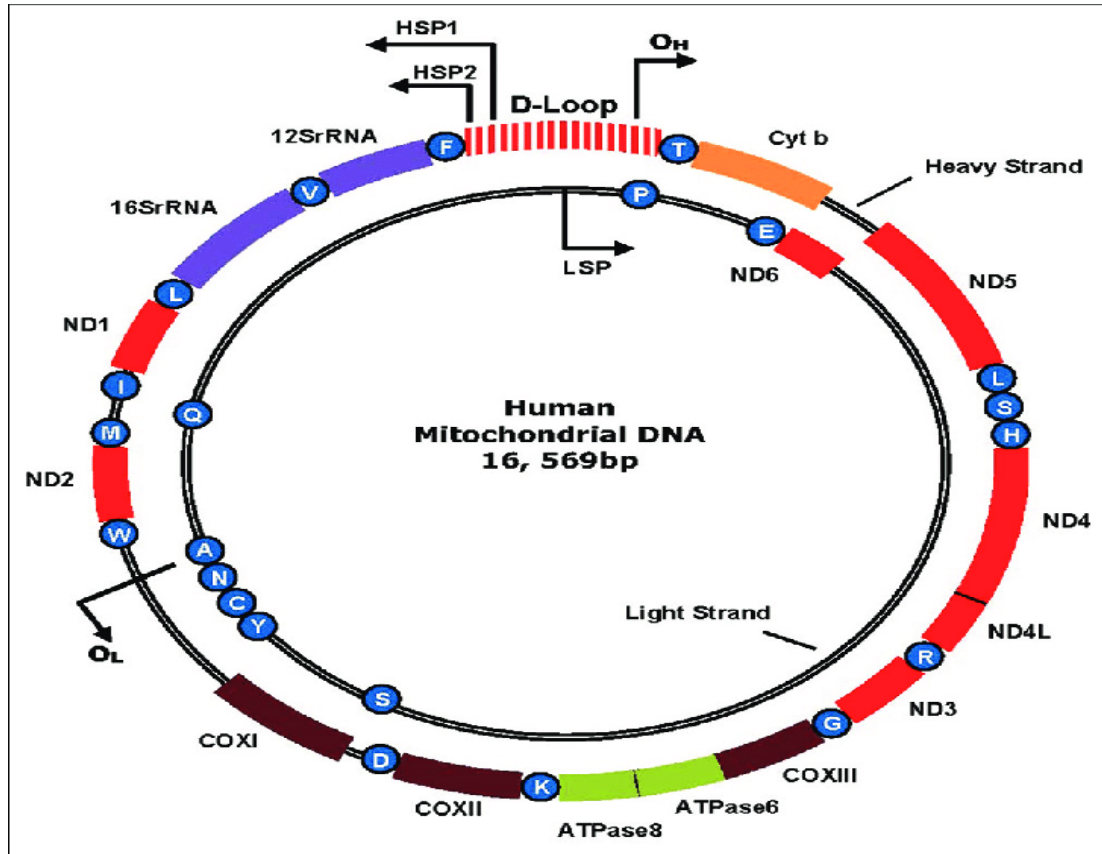
που είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP (Μαργαρίτης 1996).

Τα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA περιέχουν ελάχιστες μη κωδικές περιοχές ανάμεσα τους και σε πολλές περιπτώσεις τα κωδικόνια λήξης δεν κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA, αλλά παράγονται μετα- μεταγραφικά με πολυαδενυλίωση των μορίων mRNA.

Επιπλέον το μιτοχονδριακό DNA περιέχει μία μη κωδική περιοχή μήκους 1.121 bp, γνωστή ως θηλιά D (D-loop), η οποία αποτελεί τη ρυθμιστική περιοχή (control region) του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, αφού εκεί προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται από το πυρηνικό DNA και σηματοδοτούν την έναρξη της αντιγραφής και της μεταγραφής του (Kucej M and Butow RA, 2007) **(Εικόνα11)**.

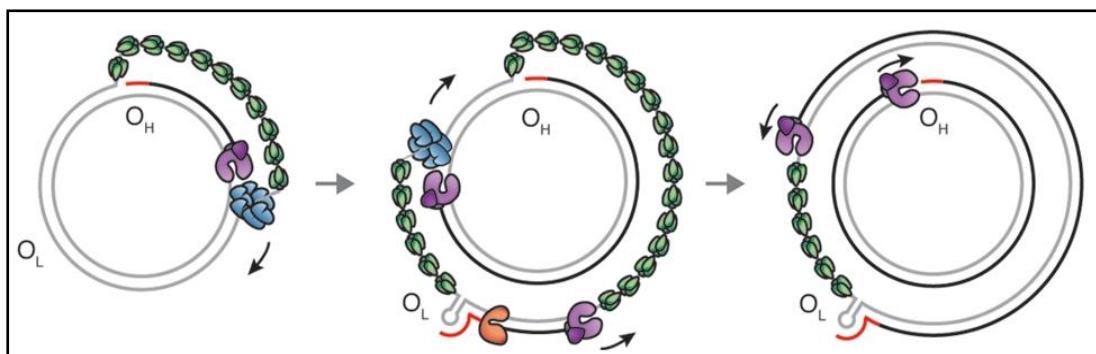
Η θηλιά D περιέχει τρεις μικρές περιοχές, οι οποίες είναι ιδιαίτερα χαμηλά συντηρημένες στον πληθυσμό, σε σχέση με το υπόλοιπο γονιδίωμα. Η λειτουργικότητα αυτών των περιοχών δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή αλλά φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και στην μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA και είτε περιέχουν, είτε βρίσκονται πολύ κοντά στις περιοχές  $O_H$  και  $O_L$ , δηλαδή τις περιοχές στις οποίες ξεκινάει η αντιγραφή της βαριάς (H) και ελαφριάς (L) αλυσίδας του μιτοχονδριακού DNA αντίστοιχα.





**Εικόνα 11:** Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Κωδικοποιεί για δυο rRNAs (12S και 16S rRNA), 13 mRNAs (ND1-6, ND4L, Cytb, COI-III, ATP6, ATP8) και 22 tRNAs (F, V, L1, I, M, W, D, K, G, R, H, S1, L2, T, P, E, S2, Y, C, N, A, και Q). Όλα τα mRNAs του μιτοχονδριακού γενώματος (εκτός από αυτό που μεταφράζεται στην ND6 υπομονάδα) κωδικοποιούνται από την πλούσια σε γουανίνη, βαριά αλυσίδα (Heavy Strand, H) και προκύπτουν από ένα μεγάλο μήκους πολυσιστρονικό μετάγραφο. Η ND6 υπομονάδα, προκύπτει από την πλούσια σε κυτοσίνη, ελαφριά αλυσίδα (Light Strand, L). Στη μη κωδικοποιούσα περιοχή D loop (Control Region/CR) περιέχονται οι υποκινητές της μεταγραφής και των δύο κλώνων του (Heavy Strand Promoter, HSP και Light Strand Promoter, LSP). Η θέση έναρξης της αντιγραφής (OH) της βαριάς αλυσίδας βρίσκεται εντός της D loop ενώ η θέση έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς (OL) εντοπίζεται μέσα σε ένα σύμπλεγμα tRNA γονιδίων (Πηγή: Mohamed Yusoff AA. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors: A mini-review. J Can Res Ther 2015;11:535-44).

Το μιτοχονδριακό DNA, σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA το οποίο αντιγράφεται μια μόνο φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, ανακυκλώνεται συνεχώς, ακόμα και σε ιστούς που δε διαιρούνται, όπως οι σκελετικοί μύες και τα μυελικά κύτταρα (Bogenhagen & Clayton 1977; Birky 2001). Επιπλέον, η ίδια η αντιγραφή δεν πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο, όπως στο πυρηνικό DNA. Στο αρχικό μοντέλο της ασύμμετρης αντιγραφής που είχε προταθεί αρχικά, η αντιγραφή ξεκινάει μόνο για την προγονική βαριά αλυσίδα H και η σύνθεση της συμπληρωματικής της νέας αλυσίδας εκτοπίζει την προγονική αλυσίδα L. Όταν η αλυσίδα H έχει αντιγραφεί περίπου κατά τα δύο τρίτα της, αποκαλύπτεται το σημείο έναρξης αντιγραφής της αλυσίδας L. Πρόσφατα πειραματικά ευρήματα, υποστηρίζουν την θεωρία της συμμετρίας ή μοντέλο του «κυλιόμενου κύκλου», όπου η αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA ξεκινάει σε περισσότερα από ένα σημεία, που ονομάζονται ORI και βρίσκονται σε μία περιοχή μήκους 5.5 kb μεταξύ της θηλιά D και του γονιδίου ND4 (Bowmaker et al. 2003). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η αντιγραφή αρχίζει με ρήγμα που δημιουργείται στη μία αλυσίδα από ειδικό ένζυμο. Έτσι δημιουργείται ένα 5' και ένα 3' άκρο, όπως στο γραμμικό δίκλωνο πυρηνικό DNA (**Εικόνα 12**). Η επικρατούσα ωστόσο άποψη είναι ότι δεν υπάρχει μόνο ένα μοντέλο αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA, αφού είναι πιθανό ότι ο μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα μιτοχόνδρια και ο οποίος έχει τις καταβολές του στην ενδοσυμβίωση, εμφανίζει μία μεγάλη ποικιλία στρατηγικών αντιγραφής, με στόχο την διατήρηση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Στον άνθρωπο ο μηχανισμός της ασύγχρονης αντιγραφής φαίνεται να επικρατεί, αν και η σύγχρονη αντιγραφή εφαρμόζεται επίσης κάτω από κάποιες συνθήκες (Zinonkina L.A. 2019).



**Εικόνα 12:** Το μοντέλο του ‘κυλιόμενου κύκλου’ στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA (Πηγή: <https://falkenberglab.org/>)

Η μεταγραφή και η μετάφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος εξαρτάται από πυρηνικούς μεταγραφικούς και μεταφραστικούς παράγοντες, οι οποίοι μετατοπίζονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Clayton, D.A, 1982). Οι κυριότεροι αυτών είναι η ειδική μιτοχονδριακή πολυμεράση  $\gamma$  (POLG), η οποία συνίσταται από μία καταλυτική υπομονάδα (POLGA) και μία βοηθητική (POLGB), ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM), ο οποίος συντελεί στην έναρξη της μεταγραφής, δημιουργώντας τον DNA / RNA υβριδικό εκκινητή που χρησιμοποιείται από την POLG, τη μιτοχονδριακή ειδική ελικάση Twinkle και τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη δέσμευσης μονόκλωνου DNA (mtSSBP1) (Korhonen et al., 2003). Η μιτοχονδριακή βιογένεση, η έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων και συναρμολόγηση των συμπλοκών της αναπνευστικής αλυσίδας απαιτούν συντονισμένη πυρηνο-μιτοχονδριακή επικοινωνία, προκειμένου να ικανοποιηθούν οι κυτταρικές απαιτήσεις για ATP (Lazarou et al., 2009; Lazarou et al., 2007).

#### **4.3.1. Το «σημείο ρύθμισης» του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA set point)**

Η αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA δεν ξεκινάει στο αναπτυσσόμενο έμβρυο πριν από το στάδιο της βλαστοκύστης και φαίνεται να περιορίζεται στο εξωτερικά κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος (Spikings et al., 2007; Thundathil et al., 2005). Τα πολυδύναμα κύτταρα της έσω μάζας της βλαστοκύστης (ICM) εμφανίζουν μικρή ή καθόλου αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA (Spikings et al., 2007) διαθέτοντας έναν μέσο αριθμό αντιγράφων  $4,83 \times 10^3$  ανά κύτταρο (Cao et al., 2007). Είναι πιθανό ότι στα κύτταρα της έσω μάζας της βλαστοκύστης συνεχίζεται ο περιορισμός της αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA, με σκοπό την συνεχή «αραίωση» του σε κάθε επόμενο διαιρεμένο κύτταρο, προκειμένου τα μη διαφοροποιημένα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESC) να φέρουν τελικά έναν αριθμό μεταξύ 30 και 45 αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA ανά κύτταρο (Facucho-Oliveira et al., 2007). Κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων διαφοροποίησης των ESC, η αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, δημιουργώντας έτσι το «σημείο ρύθμισης μιτοχονδριακού DNA» (mtDNA set point), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα σε όλα τα διαφοροποιημένα κύτταρα να αποκτήσουν τον κατάλληλο αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA, ώστε να είναι σε θέση να ικανοποιήσουν τις εξειδικευμένες ανάγκες τους για ATP

(Bowles et al., 2007). Το «σημείο ρύθμισης του μιτοχονδριακού DNA» στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ορίζεται ως η κατάσταση όπου όλα τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα βρίσκονται υπό τον έλεγχο του δικτυού των γονιδίων πολυδυναμίας OCT4-SOX2-NANOG και διαθέτουν λίγα αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA. Η κατάσταση αυτή ευνοεί την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και να παραμένουν πολυδύναμα αλλά, ταυτόχρονα, διατηρεί τη δυνατότητα τους να υφίστανται διαφοροποίηση και επεκτείνουν τον αριθμό αντιγραφής του mtDNA τους, όταν αυτό απαιτείται. Κατά συνέπεια, το «σημείο ρύθμισης μιτοχονδριακού DNA» διασφαλίζει ότι όλα τα κύτταρα μπορούν να επεκτείνουν τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA τους, ώστε να είναι σε θέση να καλύψουν τις μεταβολικές απαιτήσεις του εξειδικευμένου κυττάρου στο οποίο διαφοροποιούνται πλήρως. Τα παραπάνω επιτρέπουν για παράδειγμα στα προγονικά καρδιακά και μυϊκά κύτταρα να μπορούν να αποκτήσουν αυξημένους αριθμούς αντιγράφων mtDNA, προκειμένου να καλύψουν τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις τους σε ATP, ενώ αντίθετα τα αιμοποιητικά κύτταρα φέρουν λιγότερα αντίγραφα καθώς οι μεταβολικές τους απαιτήσεις τροφοδοτούνται κυρίως μέσω γλυκόλυσης (Kelly et al., 2012).

Ωστόσο, υπάρχει ένα σημαντικό σημείο στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA, το οποίο λαμβάνει χώρα την 6<sup>η</sup> ημέρα της διαφοροποίησης των ESCs κατά την διάρκεια της οποίας παρατηρείται μία σημαντική αύξηση του σε ~ 2.370 αντίγραφα ανά κύτταρο (Facucho-Oliveira et al., 2007). Στη συνέχεια παρατηρείται επιστροφή στα επίπεδα της σταθερής κατάστασης, με περίπου 13 αντίγραφα ανά κύτταρο την 7<sup>η</sup> ημέρα.

#### 4.3.2. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA

Οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA είναι υπεύθυνες για μια ποικιλία ανθρώπινων κληρονομικών ασθενειών και εμπλέκονται σε πολλές σχετιζόμενες με την ηλικία παθήσεις (Park & Larsson, 2011). Τα κυριότερα είδη μεταλλάξεων που παρατηρούνται στο μιτοχονδριακό DNA είναι οι μεγάλες ανακατατάξεις και οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε περιορισμένο αριθμό ζυγών βάσεων. Η πλειοψηφία των τελευταίων αφορά στις σημειακές μεταλλάξεις, που αποτελούν και το πιο συχνό είδος μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA. Ελλείμματα μικρών ή μεγάλων τμημάτων παρατηρούνται σπάνια, ενώ ειδικά τα μεγάλα ελλείμματα περιλαμβάνουν τουλάχιστον

ένα tRNA, κάτι που συνήθως συνεπάγεται προβλήματα στη μεταγραφή και δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (Gellerich et al. 2002). Οι διπλασιασμοί στο μιτοχονδριακό DNA, που έχουν περιγραφεί έως σήμερα, δε θεωρούνται παθογόνοι και μπορούν να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο μόνο έμμεσα (Manfredi et al. 1997). Ωστόσο, τα περισσότερα ελλείμματα, διπλασιασμοί, εισαγωγές, αναστροφές ή άλλες σύνθετες ανακατατάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος επιδρούν σε αρκετά γονίδια, αφού αυτά βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο (37 γονίδια σε 16,5 kb). Μέχρι σχετικά πρόσφατα, θεωρούνταν ότι το μιτοχονδριακό DNA δεν διαθέτει μηχανισμούς επιδιόρθωσης, όμως υπάρχουν δεδομένα πως εμφανίζεται κάποια επιδιορθωτική δραστηριότητα, μικρότερου όμως εύρους συγκρινόμενη με αυτή του πυρηνικού DNA (Croteau et al. 1999; Kang & Hamasaki 2002; Mason et al. 2003).

Ένα ενδιαφέρον φαινόμενο που εμφανίζεται στο μιτοχονδριακό DNA είναι η ετεροπλασμία, όπου μόρια φυσιολογικού και μόρια μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA μπορούν να βρίσκονται μαζί στα μιτοχόνδρια και στα κύτταρα σε διάφορες συγκεντρώσεις και συνεχίζουν να αντιγράφονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου (relaxed replication) (Holt et al., 1988; Lodish et al., 2003). Φαίνεται ότι ο ρυθμός αντιγραφής είναι διαφορετικός για το μεταλλαγμένο και μη μεταλλαγμένο μόριο, γεγονός που μπορεί να μεταβάλλει το ποσοστό της ετεροπλασμίας (intracellular drift), (Birky 1994) υπέρ ή κατά μιας μετάλλαξης (Park & Larsson, 2011). Η κλωνική επέκταση του μεταλλαγμένου μορίου mtDNA στα κύτταρα, ίσως οφείλεται στο πλεονέκτημα που τους προσδίδουν οι μεταλλάξεις που φέρουν (Coskun et al., 2004., Nekhaeva et al., 2002) όπως παρατηρείται κατά την ταχύτερη αντιγραφή μορίων mtDNA μικρότερου μήκους, εξαιτίας ελλειμμάτων (Clarke 2000; Lodish et al., 2003). Όταν η ποσότητα του μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA ξεπεράσει το όριο (επίπεδο οδού), πέραν του οποίου οι συνέπειες των μεταλλαγών δεν περιορίζονται πλέον από τη συνύπαρξη φυσιολογικού μιτοχονδριακού DNA, τότε εκδηλώνεται κλινική παθολογική εικόνα (Rossignol et al. 2003). Επιπλέον, μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι οι περισσότερες μεταλλαγές του μιτοχονδριακού DNA είναι υπολειπόμενες, έτσι τα κύτταρα είναι ανεκτικά σε υψηλά επίπεδα μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA (70–90%) και μόνο πάνω από αυτό το όριο εμφανίζονται βλάβες στην αναπνευστική αλυσίδα (Chinnery et al. 1997; White et al. 1999), ενώ η τιμή αυτής της ουδού διαφέρει ανάλογα με τον ιστό και εξαρτάται από τη φύση της μετάλλαξης, την ηλικία του ατόμου και την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (Edgar & Trifunovic, 2009).

### 4.3.3. Ο ρόλος της μιτοχονδριακής πολυμεράσης γ

Η ειδική μιτοχονδριακή πολυμεράση γ, φαίνεται να είναι ένας σημαντικός αισθητήρας τόσο της πολυδυναμίας όσο και του πολλαπλασιασμού του mtDNA κατά την πρόιμη ανάπτυξη. Μελέτες σε ESCs ποντικού στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μερική καταστολή της έκφραση της POLGA, είχαν ως αποτέλεσμα την απώλεια της πολυδυναμίας (Facucho-Oliveira et al., 2007), υποδηλώνοντας ότι υπάρχει μία δυναμική ισορροπία μεταξύ της επιτυχούς διατήρησης της πολυδύναμης κατάστασης ενός κυττάρου και της έκφρασης της POLGA. Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτή την ισορροπία, οδηγεί σε απορρυθμισμό του «σημείου ρύθμισης μιτοχονδριακού DNA» και επομένως της δυνατότητας ενός κυττάρου για έλεγχο του αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA, με συνέπεια την απώλεια ελέγχου της πολυδυναμίας του. Φαίνεται λοιπόν ότι η ρύθμιση της έκφρασης της POLGA, κατά την διαφοροποίηση και την ανάπτυξη, αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα της αναπτυξιακής διαδικασίας και η ρύθμιση αυτή διενεργείται μέσω της μεθυλίωσης του DNA, και πάλι με έναν κύτταρο-ειδικό τρόπο (Kelly et al., 2012).

## 5. Το μιτοχονδριακό DNA στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα

Ενώ ένας σημαντικός αριθμός μελετών προσπαθεί να προσδιορίσει τις γενωμικές ανωμαλίες στα ESCs και στα iPSCs, με σκοπό την επίτευξη αποτελεσματικής και ασφαλούς κυτταρικής θεραπείας, πολύ λιγότερη έρευνα έχει διενεργηθεί σχετικά με την ακεραιότητα του μιτοχονδριακού DNA στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα. Με δεδομένο ότι οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA εμφανίζονται σε υψηλή συχνότητα καθώς και ότι πολλές ανθρώπινες ασθένειες οφείλονται σε αυτές τις μιτοχονδριακές μεταλλάξεις, όπως τα σύνδρομα Kearns – Sayre , Pearson κ.α (Taylor et al., 2005), είναι εμφανής η αναγκαιότητα διερεύνησης των επιπτώσεων του επαναπρογραμματισμού και στο γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων.



### 5.1. Ρύθμιση της αντιγραφής του μιτοχondριακού DNA στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα

Μελέτες (Thomson et al., 2011, Kelly et al., 2011) υποστηρίζουν την υπόθεσή ότι κύτταρα με ελλιπή επαναπρογραμματισμό αποτυγχάνουν να καθορίσουν το «σημείο ρύθμισης mtDNA», αφού έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση των γονιδίων πολυδυναμίας όπως των Oct4, Nanog, Dppa5, Pramel7 και Ndp52116 (Facucho-Oliveira et al., 2007; Facucho-Oliveira et al., 2009), παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά την έναρξη της διαφοροποίησης. Επιπλέον, στις ίδιες μελέτες, αναφέρεται ότι σε καμία από τις επαναπρογραμματισμένες κυτταρικές σειρές που αναλύθηκαν δεν έλαβε χώρα την 6<sup>η</sup> ημέρα της διαφοροποίησης το σημαντικό γεγονός της αύξησης του αριθμού των αντιγράφων του μιτοχondριακού DNA, αν και τα προς διαφοροποίηση επαναπρογραμματισμένα κύτταρα, προσπάθησαν να αντισταθμίσουν αυτό το συμβάν με μία μικρή αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του mtDNA τους την 7<sup>η</sup> ημέρα.

Ωστόσο, σε πρόσφατη μελέτη (Park et al., 2019), στην οποία έγινε σύγκριση του αριθμού των αντιγράφων του mtDNA μεταξύ μεσεγχυματικών κυττάρων (MSCs), επαγόμενων βλαστοκυττάρων που έχουν παραχθεί από αυτά και μεσεγχυματικών κυττάρων που έχουν προκύψει από διαφοροποίησή τους (iPS- MSCs), φάνηκε ότι τα iPSCs διατηρούν σημαντικά χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων μιτοχondριακού DNA και μάλιστα συγκρινόμενο με αυτόν που παρατηρείται στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα. Επιπλέον, η ίδια η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει άμεσα την αντιγραφή του mtDNA, καθώς είναι μία διαδικασία που εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την έκφραση των πυρηνικών γονιδίων που, μετά την μεταγραφή και μετάφρασή τους, μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια.

Έχει δειχθεί ότι η μερική απενεργοποίηση της POLGA σε μη διαφοροποιημένα ESCs έχει ως αποτελέσματα την μείωση της έκφρασης του Oct4 και την συνεπακόλουθη διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων (Facucho-Oliveira et al., 2007). Επίσης, σε πειράματα με ποντίκια PolgA +/- έχει αποδειχθεί ότι αποτυχία έναρξης της αντιγραφής του mtDNA, ως αποτέλεσμα μειωμένης έκφρασης της POLGA, σε συγκεκριμένα στάδια της πρώιμης ανάπτυξης, έχει ως αποτελέσματα το σύνδρομο εξάντλησης mtDNA (mtDNA depletion syndrome), με σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία των οργάνων (Hance et al., 2005).

Είναι σημαντικό λοιπόν να αποσαφηνιστεί, αν τα σωματικά κύτταρα που έχουν επαναπρογραμματιστεί, είναι ικανά να καθορίζουν το «σημείο ρύθμισης mtDNA» και τον αριθμό αντιγράφων μιτοχondριακού DNA κατά την διαφοροποίηση. Πράγματι, αδιαφοροποίητα iPSCs φαίνεται ότι προετοιμάζονται για αντιγραφή του μιτοχondριακού DNA τους, όπως αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της POLGA. Τα κύτταρα φαίνεται ότι δεν μπορούν να ασκήσουν αυστηρό έλεγχο στην αντιγραφή του μιτοχondριακού DNA, εξ ου και η 2 έως 3 φορές αύξηση του αριθμού αντιγράφων του, καθώς και το διευρυμένο κυτταρόπλασμα που παρατηρήθηκαν την 1η ημέρα της διαφοροποίησης. (St John, et al., 2010; Kelly, RD. & St John, JC., 2010;. Facucho-Oliveira et al., 2009).

Ο έλεγχος της αντιγραφής του mtDNA μετά από τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων, εξαρτάται από την πλήρη επαναφορά της πολυδυναμίας, στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η επαναφορά της έκφρασης του δικτύου OCT4-SOX2-NANOG, στα επίπεδα εκείνα που συμβάλλουν στην διατήρησή της. Αυτό θα επιτρέψει να καθοριστεί και το «σημείο ρύθμισης mtDNA» έτσι ώστε να υπάρχει μία αυστηρή ρύθμιση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA, τόσο κατά την διάρκεια της πολυδύναμης κατάστασης όσο και στην απαίτηση για διαφοροποίηση.

Έτσι, η μελέτη του αριθμού αντιγράφων mtDNA είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση του αποτελεσματικού επαναπρογραμματισμού ενός σωματικού κυττάρου, αφού τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, θα έπρεπε να έχουν ρυθμίσει τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA τους σε χαμηλά επίπεδα, ως αποτέλεσμα της αποδιαφοροποίησής τους (Park et al., 2019; Kelly et al., 2013). Τέλος, είναι εξίσου σημαντικό να καθοριστεί εάν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αυξήσουν τον αριθμό αντιγράφων mtDNA, με κυτταροειδικό τρόπο, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, ως μέσο αξιολόγησης της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται πλήρως.

## **5.2. Ο ρόλος των προγονικών σωματικών κυττάρων στην εμφάνιση μιτοχondριακών μεταλλάξεων στα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα**

Όπως είναι γνωστό, τα σωματικά κύτταρα φιλοξενούν τυχαίες ετεροπλασμικές μεταλλάξεις του μιτοχondριακού DNA, οι οποίες θεωρείται ότι συμβάλλουν στην κυτταρική γήρανση. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η ίδια γήρανση σχετίζεται με αύξηση των

τυχαίων μεταλλάξεων mtDNA, είτε λόγω σφαλμάτων στην αντιγραφή του, είτε λόγω συσσώρευσης βλαβών και ότι ο ρυθμός των μεταλλάξεων του mtDNA είναι σημαντικά υψηλότερος από αυτόν των μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA (Wallace, 2010).

Έχοντας ως δεδομένο ότι η γενετική ακεραιότητα των iPSCs είναι σημαντική, τόσο για τις θεραπευτικές, όσο και για τις ερευνητικές τους εφαρμογές, φαίνεται η αναγκαιότητα μελέτης της έκτασης και της προέλευσης των μεταλλάξεων του mtDNA στα iPSCs, καθώς και οι επιπτώσεις τους στον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων (Prigione et al, 2011).

Δύο σχετικά πρόσφατες μελέτες φώτισαν τον επιπολασμό των μεταλλάξεων mtDNA στα iPSCs καθώς και τις συνέπειές τους στα διαφοροποιημένα κύτταρα που προέρχονται από αυτά. Οι Perales - Clemente και συνεργάτες (2016) μελέτησαν iPSCs και τους προγονικούς τους ινοβλάστες, τόσο από ασθενείς με μιτοχondριακές παθήσεις όσο και από υγιείς δότες και ανέφεραν ότι η πλειονότητα των κλώνων των iPSCs, φέρουν μεταλλάξεις στο mtDNA, και μάλιστα ορισμένες από αυτές σε υψηλές συχνότητες, ανεξάρτητα από το αν προέρχονται από ασθενείς ή υγιείς δότες. Επιπλέον όλες αυτές οι μεταλλάξεις παρουσιάζονται σε χαμηλές συχνότητες και στους προγονικούς τους ινοβλάστες. Οι Kang et al (2016) ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα, δείχνοντας ότι ενώ ορισμένες μεταλλάξεις mtDNA υπάρχουν σε χαμηλά επίπεδα τόσο στο αίμα όσο και στους ινοβλάστες υγιών ενηλίκων δοτών, στα iPSCs που προκύπτουν από επαναπρογραμματισμό αυτών, υπάρχουν αυξημένα φορτία των μεταλλάξεων. Επίσης, έδειξαν ότι κλωνοποιημένες κυτταρικές σειρές ινοβλαστών δείχνουν συγκρίσιμα επίπεδα μεταλλάξεων mtDNA με τα iPSCs, υποδηλώνοντας ότι αν και οι μιτοχondριακές μεταλλάξεις μπορεί να μην ανιχνεύονται σε ολόκληρους ιστούς, υπάρχουν ήδη σε μεμονωμένα αρχικά κύτταρα και δεν δημιουργούνται de novo κατά τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού.

Μία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μελετών είναι ότι οι Kang et al αναφέρουν σαφή αύξηση της συχνότητας των μιτοχondριακών μεταλλάξεων σε συνάρτηση με την ηλικία του δότη των αρχικών σωματικών κυττάρων, ενώ δεν παρατηρείται αυτή η συσχέτιση στη μελέτη των Perales - Clemente et al. Ωστόσο, το παραπάνω θα μπορούσε να εξηγηθεί λόγω των διαφορετικών ορίων της κοόρτης των δύο μελετών, αφού τα ηλικιακά όρια της μελέτης των Perales - Clemente et al (0-40 ετών) συμπίπτουν με την ηλικιακή ομάδα των νεαρών ατόμων (27-50 ετών) της μελέτης των

Kang et al, ενώ η αύξηση των μεταλλάξεων παρατηρήθηκε στα ηλικιωμένα άτομα (60-72 ετών).

Στην δημοσίευση των Kang et al επίσης μελετήθηκε η προέλευση των μεταλλάξεων mtDNA, αναζητώντας κοινές μεταλλάξεις μεταξύ αίματος και ινοβλαστών μεμονωμένων ατόμων καθώς και μεταξύ ζευγαριών μητέρας-κόρης. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι δεν υπάρχουν κοινές μεταλλάξεις μεταξύ μητέρας και κόρης και μόνο ένα μικρό ποσοστό (~10%) των μεταλλάξεων αυτών ήταν κοινές στο αίμα και στο δέρμα μεμονωμένων ατόμων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πλειονότητα των μεταλλάξεων είναι σωματικής προέλευσης και ότι οι περισσότερες εξ αυτών δεν προκύπτουν κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης, αλλά αργότερα κατά την διάρκεια της ζωής ενός ατόμου (Park et al., 2019).

Επιπλέον, από τις ίδιες γυναίκες στις οποίες μελετήθηκαν τα iPSCs για μιτοχονδριακές μεταλλάξεις στο αίμα και στους ινοβλάστες, συλλεχθήκαν ωκύτταρα προκειμένου να δημιουργηθούν κυτταρικές σειρές εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (ESCs) με *in vitro* γονιμοποίηση. Παρατηρήθηκε ότι ενώ στα iPSCs οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις του mtDNA βρίσκονται σε περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, στα ESCs οι μεταλλάξεις είναι κυρίως σε μη κωδικές περιοχές, αποδεικνύοντας περαιτέρω την σωματική προέλευση των μεταλλάξεων του mtDNA στους ενήλικες (Greaves et al., 2014). Αυτή η διαφορά που παρατηρείται στους τύπους μεταλλάξεων μεταξύ των ESCs και των iPSCs, συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες σε πειραματόζωα, όπου είχε δειχθεί ότι η επιλογή έναντι βλαβερών μεταλλάξεων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες λαμβάνει χώρα σε βλαστικά κύτταρα (Stewart et al, 2008).

Η συχνότητα μεταλλάξεων του mtDNA που παρατηρήθηκε στα iPSCs φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις του πυρηνικού γονιδιώματος (Johannesson et al., 2014). Τέλος, ενώ τα περισσότερα στοιχεία συνηγορούν στο ότι οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις προέρχονται από τα προγονικά δερματικά ή αιμοποιητικά κύτταρα των iPSCs, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τη θετική επιλογή των μεταλλάξεων στο mtDNA κατά τη διάρκεια της παραγωγής των iPSC ή της εκτεταμένης καλλιέργειας τους.

### 5.3. Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων του mtDNA στην λειτουργία των επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων

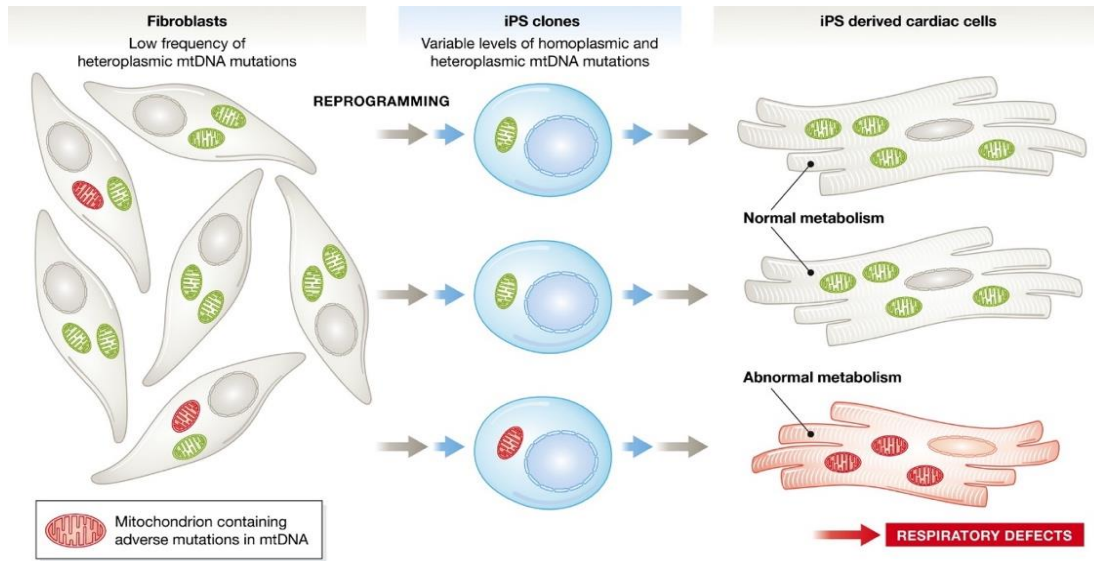
Οι μεταλλάξεις του mtDNA έχουν άμεση επίδραση στην λειτουργία των μιτοχονδρίων και κατ'επέκταση και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων. Οι ομάδες των Kang et al και Perales - Clemente et al συμφωνούν ότι τόσο στα iPSCs όσο και στα κύτταρα από τη διαφοροποίηση των οποίων προέρχονται, το υψηλό (~ 70%) φορτίο ορισμένων μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αναπνευστικής λειτουργίας, ενώ η χαμηλότερη συχνότητα (~ 40%) της ίδιας μετάλλαξης δεν επηρεάζει την αναπνοή. Επιπλέον, όλες οι μεταλλάξεις που κωδικοποιούν πρωτεΐνες δεν οδηγούν σε ελαττωμένη αναπνευστική λειτουργία, ακόμη και αν βρίσκονταν σε υψηλά επίπεδα (~ 80%).

Η ομάδα των Park et al (2019) έδειξε, ότι η αναπνευστική λειτουργία είναι σαφώς μειωμένη στα μεσεγχυματικά κύτταρα που έχουν προέλθει από διαφοροποίηση iPSCs, σε σχέση με τα αρχικά μεσεγχυματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή ATP και την μειωμένη διαχείριση του οξειδωτικού stress από αυτά.

Σχετικά με τα είδη των μεταλλάξεων οι συνώνυμες μεταλλάξεις επιδρώντας στην μεταμεταγραφική διαδικασία και την μετάφραση, επηρεάζουν το μεταβολισμό των κυττάρων, ενώ οι υψηλής ετεροπλασμίας μη συνώνυμες μεταλλάξεις έχουν αρνητική επίδραση στην κυτταρική επιβίωση. Τέλος, τα κύτταρα που έφεραν μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονίδιο του rRNA είχαν την χαμηλότερη αναπνευστική λειτουργία (Park et al., 2019).

Συνοπτικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι συγκεκριμένες ομοιοπλασματικές ή υψηλής συχνότητας ετεροπλασματικές μεταλλάξεις στο mtDNA, έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταβολικής λειτουργίας των iPSCs. Επιπλέον, η μιτοχονδριακή λειτουργία επηρεάζεται ακόμα και σε iPSCs που φέρουν χαμηλό ποσοστό ετεροπλασμίας αλλά πολλαπλό αριθμό μεταλλάξεων, πιθανώς λόγω των συσσωρευτικών αποτελεσμάτων που έχουν οι πολλαπλές βλάβες στο mtDNA.

Είναι φανερό λοιπόν ότι δομικές βλάβες στα γονίδια του mtDNA των iPSCs πιθανότατα θα οδηγήσουν σε διαφοροποιημένα κύτταρα με μειωμένη μεταβολική λειτουργία, ανίκανα να παράγουν την ενέργεια που απαιτείται για την λειτουργία τους. Ως εκ τούτου, το θεραπευτικό δυναμικό αυτών των κυττάρων περιορίζεται (**Εικόνα 13**).



**Εικόνα 13:** Το φαινόμενο της ετεροπλασμίας στο μιτοχονδριακό DNA των iPSCs. Χαμηλής συχνότητας ετεροπλασματικές μεταλλάξεις του mtDNA των προγονικών σωματικών κυττάρων, δημιουργούν διαφόρου βαθμού ετεροπλασμία και ομοπλασμία στα iPSCs με τυχαίο τρόπο, που είναι πιθανόν να οδηγήσει στην παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων με ανώμαλο μεταβολισμό. (Πηγή: Hamalainen R., 2016)

#### 5.4. Μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και αντιγονικότητα των επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων

Η χρήση αυτόλογων iPSCs στην αναγεννητική ιατρική, προϋποθέτει την παραγωγή λειτουργικών αλλά ανοσολογικά «σιωπηλών» κυττάρων. Ωστόσο υπάρχουν αναφορές ότι κυτταρικά μοσχεύματα που προέρχονται από iPSCs μπορεί να είναι ανοσογόνα και να οδηγήσουν σε απόρριψη από τον λήπτη τους, παρόλο που προέρχονται από κύτταρα του ίδιου (Deuse et al., 2019). Θεωρείται ότι στο φαινόμενο αυτό συμμετέχουν αρκετοί παράγοντες, όπως ο ίδιος ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων, η καλλιέργειά τους και η μετέπειτα διαφοροποίησή τους στα κύτταρα του εκάστοτε ζητούμενου ιστού. Έχει δειχθεί ότι η καταστολή ή η υπερέκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας μπορεί να προκαλέσει de novo αντιγονικότητα, η οποία στη συνέχεια μειώνεται κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων (de Almeida et al., 2014; Araki et al., 2013; Guha et al., 2013). Παρ'όλα αυτά, η διαφοροποίηση των iPSCs δύναται να

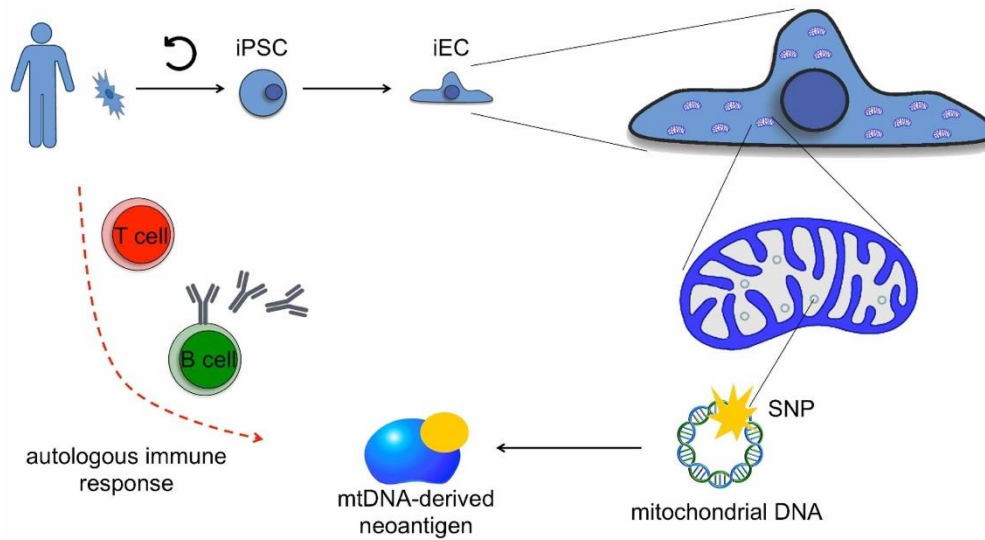


οδηγήσει σε έκφραση ανοσογόνων αντιγόνων που δεν εκφράζονται στα αντίστοιχα σωματικά κύτταρα, προκαλώντας απόρριψη (Zhao et al., 2015). Επιπλέον, μεταλλάξεις που αποκτούνται κατά τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν ως νεοαντιγόνα (Deuse et al., 2019).

Μελέτες αναφέρουν ότι οι μη συνώνυμες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις έχουν επίδραση τόσο στην λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών όσο και στην αντιγονικότητα τους (Kang et al., 2016), ενώ κάποια ελάσσονα μιτοχονδριακά αντιγόνα (Minor Histocompatibility antigens- MiHAs) (Loveland et al., 1990), τα οποία κωδικοποιούνται από το mtDNA, πιστεύεται ότι μπορεί να αποτελέσουν φραγμό για τις μεταμοσχεύσεις (Hanekamp et al., 2009). Με δεδομένο επίσης ότι μεμονωμένοι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) είναι ικανοί να προκαλέσουν τη δημιουργία ανοσογονικών νεοαντιγόνων (Deuse et al., 2015), κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της επίδρασης που έχουν οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA των iPSCs, στην ανοσογονικότητα των κυττάρων.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου ανοσογονικότητας, τόσο για αδιαφοροποίητες ανθρώπινες και ποντικίσιας κυτταρικές σειρές iPSCs, οι οποίες έφεραν SNPs στο mtDNA τους, όσο και για τα διαφοροποιημένα παράγωγα κύτταρα αυτών. Σε όλες τις περιπτώσεις έγχυσης αυτών των κυττάρων παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη και σημαντική μείωση της επιβίωσης των μοσχευμάτων των διαφοροποιημένων κυττάρων. Μάλιστα, η ανοσοαπόκριση ήταν τόσο πιο αυξημένη και η επιβίωση των μοσχευμάτων τόσο πιο μειωμένη, όσο μεγαλύτερος ήταν ο αριθμός ανακαλλιεργειών των iPSCs που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων (Deuse et al., 2019).

Φαίνεται λοιπόν, ότι ενώ η ετεροπλασμία των παραλλαγών SNPs μπορεί να μειωθεί στην κυτταρική καλλιέργεια με την πάροδο του χρόνου, η πιθανότητα για δημιουργία de novo μεταλλάξεων και εμπλουτισμού σπάνιων SNPs, αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των ανακαλλιεργειών. Επιπλέον, αποδεικνύεται ότι η αποκτηθείσα αντιγονικότητα των κυττάρων που φέρουν αυτούς τους πολυμορφισμούς εμμένει και μετά τη διαφοροποίηση των iPSCs και δεν σχετίζεται με την κατάσταση πολυδυναμίας αυτών (**Εικόνα 14**).



**Εικόνα 14:** Εμπλουτισμός των SNPs του μιτοχονδριακού DNA των iPSCs κατά την διάρκεια της καλλιέργειάς τους, έχει ως πιθανή συνέπεια την δημιουργία νεοαντιγόνων που οδηγούν σε ανοσολογική απόκριση του λήπτη, αυτών των αυτόλογων κυττάρων (Πηγή: Deuse T. Nat Biotechnol. 2019;37:252-258)

Πρόσφατες μελέτες συνηγορούν στο ότι οι περισσότερες ετεροπλασμίες του mtDNA που ανευρίσκονται σε υγιείς ιστούς *in vivo*, είναι παρούσες από την εμβρυογένεση, ενώ δεν παρατηρούνται συνήθως *de novo* μεταλλάξεις ή εμπλουτισμός των SNPs του mtDNA, φαινόμενο που κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην λεγόμενη συνεχή ανοσοεπαγρύπνιση (He et al., 2010). Επίσης, είναι γνωστό ότι κύτταρα νεοπλασματικών όγκων, που ξεφεύγουν τις ανοσοεπιτήρησης, εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων του mtDNA σε συγκεκριμένες περιοχές, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κωδικοποίηση είτε RNA, είτε πρωτεϊνών. Με δεδομένο ότι η μακρά *in vitro* καλλιέργεια και έκπτυξη των iPSCs προσομοιάζει την ανάπτυξη κακόηθους όγκου, καθώς συμβαίνει λόγω απουσίας ανοσολογικής ρύθμισης, κυτταρικοί κλώνοι με πλεονέκτημα ανάπτυξης, το οποίο μπορεί να οφείλεται στο mtDNA τους, θα προάγουν την σύνθεση του mtDNA τους σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό. Μέσω λοιπόν της υπεροχής που προκαλεί ο επαναπρογραμματισμός και της κλωνικής ικανότητας αυτών των κυττάρων, δημιουργούνται ισχυροί κυτταρικοί κλώνοι με προορισμό να κυριαρχήσουν (Shakiba et al., 2019).

Συμπερασματικά, ενώ οι περισσότερες μεταλλάξεις του mtDNA που ανευρίσκονται στα iPSCs έχει αποδειχθεί ότι προέρχονται από προϋπάρχουσες μεταλλάξεις στα κύτταρα του δότη και οι de novo μεταλλάξεις είναι μάλλον σπάνιες, εκτεταμένες και μακροχρόνιες καλλιέργειες iPSCs φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο ενίσχυσης SNPs που θα μπορούσαν να δρουν ως νεοαντιγόνα και μάλιστα σε μεγάλη κλίμακα. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει αποδειχθεί μία ξεκάθαρη σύνδεση μεταξύ του εμπλουτισμού των μιτοχονδριακών SNPs των iPSCs και της εμφάνισης νεοαντιγονικότητας.

## 6. Συζήτηση

Η τεχνολογία των iPSCs έχει δημιουργήσει σημαντικές προοπτικές στην έρευνα και στις θεραπείες της Αναγεννητικής Ιατρικής. Ωστόσο οι προβληματισμοί που σχετίζονται με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους, περιορίζει την χρήση τους στην κλινική πράξη. Οι κυριότερες ανησυχίες αφορούν στην ίδια την διαδικασία του επαναπρογραμματισμού των ενήλικων σωματικών κυττάρων, αλλά και στις επιπτώσεις που αυτός έχει στην ποιότητα και τη γενετική σταθερότητα των iPSCs.

Το είδος των αρχικών σωματικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται τα επαγόμενα βλαστοκύτταρα, αλλά και η μέθοδος που επιλέγεται για τον επαναπρογραμματισμό τους, φαίνεται να επηρεάζουν τον αριθμό των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα, με τις μεθόδους ενσωμάτωσης γενετικού υλικού να δείχνουν υψηλότερη πιθανότητα μεταλλαξιογένεσης. Ο κίνδυνος ενεργοποίησης ογκογονιδίων ή αποσίωπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ελλοχεύει πάντα και το πιθανό αποτέλεσμα θα ήταν η πρόκληση καρκινογένεσης. Επιπλέον, η μακρόχρονη καλλιέργεια και οι συνεχείς ανακαλλιέργειες των iPSCs, είναι γνωστό ότι επιφέρουν γενετικές και επιγενετικές επιπτώσεις, κάποιες από τις οποίες παραμένουν προς το παρόν αδιευκρίνιστες.

Ακόμη και το χαρακτηριστικό της πολυδυναμίας που τους προσδίδει την ικανότητα έντονου πολλαπλασιασμού, πιθανόν να επιφέρει de novo μεταλλάξεις, κάτι που καθιστά απαραίτητο τον συνεχή έλεγχο της γενετικής σταθερότητας των iPSCs κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους με διάφορες μεθόδους, όπως ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός(aCGH).

Ένας ακόμη περιορισμός στην χρήση των iPSCs είναι η χαμηλή απόδοση του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, αλλά και η αδυναμία πλήρους διαφοροποίησης

τους στα επιθυμητά σωματικά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση, η ανησυχία έγκειται στην πιθανότητα ύπαρξης μη διαφοροποιημένων κυττάρων μέσα στον κυτταρικό πληθυσμό που πρόκειται να μεταμοσχευθεί κατά την κλινική φάση, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα λοιπόν είναι απαραίτητος τόσο ο λειτουργικός έλεγχος τους όσο και η αδυναμία τους να σχηματίζουν τερατώματα σε ποντίκια, επιβεβαιώνοντας με αυτό τον τρόπο την πλήρη διαφοροποίησή τους, πριν από οποιαδήποτε προκλινική ή κλινική μελέτη.

Με δεδομένο ότι παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων του mtDNA στα iPSCs σε σύγκριση με το πυρηνικό γονιδίωμα, είναι εμφανής η αναγκαιότητα διερεύνησης των επιπτώσεων του επαναπρογραμματισμού και στο γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων.

Η ικανότητα καθορισμού του «σημείου ρύθμισης mtDNA» προτείνεται ότι αποτελεί τόσο έναν δείκτη επιτυχούς επαναπρογραμματισμού των κυττάρων, όσο και της ικανότητας των επαγόμενων βλαστοκυττάρων να διαφοροποιούνται πλήρως, όταν προκύπτει αυτή η απαίτηση. Πολλοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων και η ίδια η διαδικασία επαναπρογραμματισμού, φαίνεται ότι επιδρούν στην ρύθμιση της αντιγραφής του μιτοχονδριακού DNA. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει αποσαφηνιστεί αν τα σωματικά κύτταρα που έχουν επαναπρογραμματιστεί, είναι ικανά να καθορίζουν αυστηρά το «σημείο ρύθμισης» του αριθμού των αντιγράφων του mtDNA τους, τόσο στην πολυδύναμη όσο και στην διαφοροποιημένη κατάστασή τους. Αδυναμία των επαγόμενων βλαστοκυττάρων να διατηρήσουν έναν χαμηλό αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA έχει ως συνέπεια τη μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και της πολυδυναμίας τους, ενώ αδυναμία τους να επεκτείνουν τον αριθμό των αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA κατά την διαφοροποίηση, έχει ως συνέπεια την μειωμένη δυνατότητα των παραγόμενων κυττάρων να ικανοποιήσουν τις εξειδικευμένες μεταβολικές απαιτήσεις τους.

Αν και φαίνεται ότι η πλειονότητα των μεταλλάξεων που παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές των iPSCs προέρχεται από τα προγονικά τους σωματικά κύτταρα, ένα ποσοστό μιτοχονδριακών μεταλλάξεων δημιουργείται σε αυτά *de novo*, κατά τη διάρκεια της παραγωγής τους ή της εκτεταμένης καλλιέργειάς τους. Οι μεταλλάξεις του mtDNA των αρχικών σωματικών κυττάρων μεταφέρονται στα επαγόμενα βλαστοκύτταρα με ποικίλου βαθμού ετεροπλάσμια και έχει αποδειχθεί ότι διατηρούνται ακόμα και στα κύτταρα στα οποία αυτά διαφοροποιούνται.

Έχοντας αποδείξει ότι ο υψηλός βαθμός ετεροπλασμίας μη συνώνυμων μιτοχονδριακών μεταλλάξεων ή μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο του RNA, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και κατ'έπекταση την μείωση της αναπνευστικής λειτουργίας των κυττάρων που τις φέρουν, η παρουσία τέτοιων μεταλλάξεων θέτει σε αμφισβήτηση τη λειτουργικότητα, άρα και το θεραπευτικό δυναμικό που θα έχουν τα διαφοροποιημένα κύτταρα που θα προέρχονται από αυτές τις κυτταρικές σειρές iPSCs.

Επιπλέον, ο παρατηρούμενος επίκτητος ανοσολογικός φραγμός μπορεί να αποτελέσει ένα εγγενές μειονέκτημα των αναγεννητικών θεραπειών που βασίζονται στην χορήγηση αυτόλογων iPSCs. Η διαλογή και η αξιολόγηση νεοαντιγονικών SNPs του mtDNA, αποτελεί σίγουρα μία μεγάλη πρόκληση για την περίπτωση παραγωγής iPSCs σε μεγάλη κλινική κλίμακα. Μέχρι τότε, πρωτόκολλα ανοσοκαταστολής θα πρέπει να εφαρμόζονται, για να εγγυώνται το καλύτερο δυνατό «ταίριασμα» των iPSCs με τον λήπτη τους.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα iPSCs ενδέχεται να φέρουν μεταλλάξεις στο mtDNA σε αρκετά υψηλές συχνότητες, ικανές να προκαλέσουν λειτουργικές βλάβες. Προτείνεται επομένως να συμπεριλαμβάνεται ο έλεγχος του mtDNA, ως κριτήριο κατά την επιλογή κυτταρικών σειρών iPSCs καθώς και να προτιμάται η χρήση νεαρότερων ηλικιακά δοτών σωματικών κυττάρων, μετριάζοντας με αυτό τον τρόπο τον κίνδυνο μεταφοράς σωματικών μεταλλάξεων στα παραγόμενα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα. Προκειμένου να είναι ασφαλής και αποτελεσματική η χρήση των επαγόμενων βλαστοκυττάρων καθώς και των διαφοροποιημένων από αυτά κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς, προτείνεται να συμπεριλαμβάνεται στα κριτήρια αξιολόγησης και ο έλεγχος της ακεραιότητας του mtDNA όπως συμβαίνει και με το πυρηνικό DNA.

## 7. Βιβλιογραφία

- Abyzov, A., Mariani, J., Palejev, D., Zhang, Y., Haney, M. S., Tomasini, L., Vaccarino, F. M. (2012). Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*, 492(7429), 438–442.
- Adam-Vizi V. (2003) Mitochondria: inducers and targets of oxidative stress. *J Neurochem*; 85 Suppl 2:3.
- Aladjem, M.I., Spike, B.T., Rodewald, L.W., Hope, T.J., Klemm, M., Jaenisch, R., and Wahl, G.M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr. Biol.* 8, 145–155
- Alper, J. (2009, March). Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nature Biotechnology*, Vol. 27, pp. 213–214.
- Amps K, Andrews P.W., Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, Baker J, Baker D, Munoz M.B, Beil S et al. (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 29, 1132–1144.
- Anguera, M.C., Sadreyev, R., Zhang, Z., Szanto, A., Payer, B., Sheridan, S.D., Kwok, S., Haggarty, S.J., Sur, M., Alvarez, J., et al. (2012). Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes. *Cell Stem Cell* 11, 75–90
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465.
- Araki, R. et al (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494, 100–104.
- Araki, Ryoko, Eiji Mizutani, Yuko Hoki, Misato Sunayama, Sayaka Wakayama, Hiroaki Nagatomo, Yasuji Kasama, Miki Nakamura, Teruhiko Wakayama, and Masumi Abe. (2017) The Number of Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells and Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Depend on the Method and Somatic Cell Type Used for Their Generation. *STEM CELLS* 35, no. 5: 1189–96.
- Baker, D.E., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* 25, 207–215
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 23, 2134–2139
- Bar-Nur, O., Russ, H.A., Efrat, S., and Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 9, 17–23



Barroso-delJesus, A., Romero-López, C., Lucena-Aguilar, G., Melen, G. J., Sanchez, L., Ligeró, G., ... Menendez, P. (2008). Embryonic Stem Cell-Specific miR302-367 Cluster: Human Gene Structure and Functional Characterization of Its Core Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 28(21), 6609–6619. <https://doi.org/10.1128/mcb.00398-08>

Bershteyn, M., Hayashi, Y., Desachy, G., Hsiao, E. C., Sami, S., Tsang, K. M., ... Wynshaw-Boris, A. (2014). Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 507(7490), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature12923>

Birky, J. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*, Vol. 35, pp. 125–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090231>

Birky C. W. Jr, (1994) Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey mendel's laws?, *J. Heredity* 85: 355-365

Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., et al. (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439–452

Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, 11(4), 719–727. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90286-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90286-0)

Bonda, D. J., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2010). Mitochondrial dynamics in alzheimers disease: Opportunities for future treatment strategies. *Drugs and Aging*, Vol. 27, pp. 181–192

Bowles, E. J., Lee, J. H., Alberio, R., Lloyd, R. E., Stekel, D., et al. (2007). Contrasting effects of in vitro fertilization and nucleartransfer on the expression of mtDNA replication factors. *Genetics*, 176, 1511–1526.

Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt II. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):50961-9.

Cao, L., Shitara, H., Horii, T., Nagao, Y., Imai, H., et al. (2007). The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nature Genetics*, 39, 386–390.

Chamberlain, S.J., Chen, P.F., Ng, K.Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., and Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 17668–17673

- Chen, D., Cao, G., Hastings, T., Feng, Y., Pei, W., O'Horo, C., & Chen, J. (2002). Age-dependent decline of DNA repair activity for oxidative lesions in rat brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 81(6), 1273–1284.
- Cheng, L., Hansen, N.F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F.X., Chou, B.K., Zhou, G., Li, S., Dowey, S.N., et al.; NISC Comparative Sequencing Program. (2012). Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* 10, 337–344
- Cheung, A.Y., Horvath, L.M., Grafodatskaya, D., Pasceri, P., Weksberg, R., Hotta, A., Carrel, L., and Ellis, J. (2011). Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2103–2115
- Chin, M.H., Pellegrini, M., Plath, K., and Lowry, W.E. (2010). Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 263–269.
- Chinnery, P. F., Samuels, D. C., Elson, J., & Turnbull, D. M. (2002, October 26). Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: Is there a common mechanism? *Lancet*, Vol. 360, pp. 1323–1325.
- Chinnery, P. F., Howell, N., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. (1997). Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain*, 120(10), 1713–1721.
- Clarke A., (2000) The biology of mitochondrial disease, *Arch Dis Child* 82(5): 339–340
- Clayton, D. A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28, 693–705.
- Coskun P.E., Beal M.F., Wallace D.C., (2004) Alzheimer' s brains harbor somatic mtDNA control- region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29):10726–10731
- Croteau, D. L., Stierum, R. H., & Bohr, V. A. (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutation Research - DNA Repair*, 434(3), 137–148.
- De Almeida, P. E., Meyer, E. H., Kooreman, N. G., Diecke, S., Dey, D., Sanchez-Freire, V., ... Wu, J. C. (2014). Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nature Communications*, 5.
- De Grey, A. D. N. J. (2002). The reductive hotspot hypothesis of mammalian aging: Membrane metabolism magnifies mutant mitochondrial mischief. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 269, pp. 2003–2009.
- Del Bo, R., Bordoni, A., Boneschi, F. M., Crimi, M., Sciacco, M., Bresolin, N., ... Comi, G. Pietro. (2002). Evidence and age-related distribution of mtDNA D-loop point

mutations in skeletal muscle from healthy subjects and mitochondrial patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 202(1–2), 85–91.

Desmarais, J. A., Hoffmann, M. J., Bingham, G., Gagou, M. E., Meuth, M., & Andrews, P. W. (2012). Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem Cells*, 30(7), 1385–1393.

Deuse, T. (2015) SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell* 16, 33–38

Dias MS, McLone DG (2001) Normal and abnormal early development of the nervous system, in McLone DG (ed): *Pediatric Neurosurgery: Surgery of the Developing Nervous System*. Philadelphia: W.B. Saunders, pp 31-71

Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893), 1218–1221.

Doss, M. X., & Sachinidis, A. (2019). Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*, 8(5), 403.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 53–54.

Edgar D., Trifunovic A., (2009) The mtDNA mutator mouse: dissecting mitochondrial involvement in aging, *Aging (Albany NY)* 1:1028–1032.

Elick TA, Bauser CA, Fraser MJ. Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica*. 1996; 98:33–41

Facucho-Oliveira, J. M., Alderson, J., Spikings, E. C., Egginton, S., & St John, J. C. (2007). Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 120, 4025–4034.

Facucho-Oliveira, J. M., & John St., J. C. (2009). The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic Stem Cell differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(2), 140–158

Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi AR, Blondy P, Lombès A, Fardeau M, Oldfors A. Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *NeuromusculDisord*. 2002 Jun;12(5):484-93.

Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I et al. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *STEM CELLS* 2010; 28:704–712.

Forostyak O., Dayanithi G, Forostyak S. (2016) *CNS Regenerative Medicine and Stem Cells*, OM&P Volume 2, Issue 1, pages 55-62

Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol.* 1996;5:141–51.

Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Müller T, Neudecker S, Zierz S. Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *BiochimBiophys Acta.* 2002 Oct 3;1556(1):41-52.

Gonzalez F, Monasterio M, Tiscornia G, Pulidoa NM, Vassena R, Morera LB. Generation of mouse induces pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:8918–22.

Gonzalez, F., Georgieva, D., Vanoli, F., Shi, Z.D., Stadtfeld, M., Ludwig, T., Jasin, M., and Huangfu, D. (2013). Homologous Recombination DNA Repair Genes Play a Critical Role in Reprogramming to a Pluripotent State. *Cell Reports*

Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63–67.

Greaves, L.C., Nooteboom, M., Elson, J.L., Tuppen, H.A., Taylor, G.A., Commane, D.M., Arasaradnam, R.P., Khrapko, K., Taylor, R.W., Kirkwood, T.B., et al. (2014). Clonal expansion of early to mid-life mitochondrial DNA point mutations drives mitochondrial dysfunction during human ageing. *PLoS Genet.* 10, e1004620.

Gu G, Reyes PE, Golden GT, Woltjer RL, Hulette C, Montine TJ, Zhang J. Mitochondrial DNA deletions/rearrangements in parkinson disease and related neurodegenerative disorders. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Jul;61(7):634-9.

Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249–257

Guha, P., Morgan, J. W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N. P. & Boyd, A. S. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 407–412 (2013).

Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med.* 2007;13:443–8.

Hamada, M., Malureanu, L.A., Wijshake, T., Zhou, W., and van Deursen, J.M. (2012). Reprogramming to pluripotency can conceal somatic cell chromosomal instability. *PLoS Genet.* 8,e1002913

Hance, N., Ekstrand, M. I., & Trifunovic, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Human Molecular Genetics*, 14, 1775–1783.

Hanekamp, J. S. (2009) Cytoplasmic inheritance of transplantation antigens in animals produced by nuclear transfer. *Transplantation* 88,30–37

Hanna, Jacob, Marius Wernig, Styliani Markoulaki, Chiao-Wang Sun, Alexander Meissner, John P. Cassady, Caroline Beard, et al. “Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with IPS Cells Generated from Autologous Skin.” *Science (New York, N.Y.)* 318, no. 5858 (December 21, 2007): 1920–23.

He, Y. et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464, 610–614 (2010).

Hockemeyer D, Soldner F, Cook E, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2008;3:346–53.

Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A., (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies, *Nature* 331:717–719.

Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011;471:58–62.

Hussein, S.M., Elbaz, J., and Nagy, A.A. (2013). Genome damage in induced pluripotent stem cells: assessing the mechanisms and their consequences. *BioEssays* 35, 152–162

Israel, Mason A., Shauna H. Yuan, Cedric Bardy, Sol M. Reyna, Yangling Mu, Cheryl Herrera, Michael P. Hefferan, et al. “Probing Sporadic and Familial Alzheimer’s Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 482, no. 7384 (January 25, 2012): 216–20.

Itzhaki, Ilanit, Leonid Maizels, Irit Huber, Limor Zwi-Dantsis, Oren Caspi, Aaron Winterstern, Oren Feldman, et al. “Modelling the Long QT Syndrome with Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 471, no. 7337 (March 10, 2011): 225–29.

JB Gurdon, TR Elsdale, M Fischberg. Sexually Mature Individuals of *Xenopus Laevis* From the Transplantation of Single Somatic Nuclei *Nature* 1958 Jul 5;182(4627):64–5.

Ji, J., Ng, S.H., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G.M., McPherson, J.D., Nagy, A., and Batada, N.N. (2012). Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30, 435–440

Johannesson B, Sagi I, Gore A, Paull D, Yamada M, Golan-Lev T, Li Z, LeDuc C, Shen Y, Stern S, Xu N, Ma H, Kang E, Mitalipov S, Sauer MV, Zhang K, Benvenisty N, Egli D (2014) Comparable frequencies of coding mutations and loss of imprinting in human pluripotent cells derived by nuclear transfer and defined factors. *Cell Stem Cell*15: 634–642

Johnson AA, Andrews-Pfannkoch C, Nelson TJ et al. Disease modeling studies using induced pluripotent stem cells: Are we using enough controls? *Regen Med* 2017;12:899-903

Johnson AA, Akman K, Calimport SR et al. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Kaiser J. Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. Science.* 2003;299(5606):495.

Kang, E. et al. Age-related accumulation of somatic mitochondrialDNA mutations in adult-derived human iPSCs. *Cell Stem Cell* 18,625–636 (2016).

Kang D, Hamasaki N.(2002) Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr Genet.* Aug;41(5):311-22.

Kang E, Wang X, Tippner-Hedges R, Ma H, Folmes CD, Gutierrez NM, Lee Y, Van Dyken C, Ahmed R, Li Y, Koski A, Hayama T, Luo S, Harding CO, Amato P, Jensen J, Battaglia D, Lee D, Wu D, Terzic A et al (2016) Age-related accumulation of somatic mitochondrial DNA mutations in adult-derived human iPSCs. *Cell Stem Cell*18: 625–636.

Kazuki, Yasuhiro, Masaharu Hiratsuka, Masato Takiguchi, Mitsuhiko Osaki, Naoyo Kajitani, Hidetoshi Hoshiya, Kei Hiramatsu, et al. “Complete Genetic Correction of Ips Cells from Duchenne Muscular Dystrophy.”*Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, no. 2 (February 2010): 386–93.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144

Kelly RD, Mahmud A, McKenzie M, TrounceIA, St John JC (2012) Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific mannerby DNA methylation of the nuclear-encodedDNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res*40(20):10124–10138.

Kelly, R. D., & St John, J. C. (2010). Role of mitochondrial DNA replication during differentiation of reprogrammed stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, 54,1659–1670.

Kelly RD, Sumer H, McKenzie M, Facucho-Oliveira J, Trounce IA, Verma PJ, St John JC(2013) The effects of nuclear reprogramming onmitochondrial DNA replication. *Stem Cell Rev* 9(1):1–15.

Khaidakov M, Heflich RH, Manjanatha MG, Myers MB, Aidoo A. Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutat Res.* 2003 May 15;526(1-2):1-7.



Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, et al. “Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 467, no. 7313 (September 16, 2010): 285–90.

Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119

Korhonen, J. A., Gaspari, M., & Falkenberg, M. (2003). TWINKLE Has 5' → 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 48627–48632.

Kucej M, Butow RA (2007) Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends Cell Biol* 17(12):586–592.

Lai, M.I.; et al. (2011) Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *J Assist Reprod Genet.*, 28(4): 291-301.

Larsson NG, Clayton DA (1995) Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet* 29: 151–178.

Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 2011;8:106-118

Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2007). Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4228–4237.

Lazarou, M., Thorburn, D. R., Ryan, M. T., & McKenzie, M. (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 78–88.

Li, L.B., Chang, K.H., Wang, P.R., Hirata, R.K., Papayannopoulou, T., and Russell, D.W. (2012a). Trisomy correction in Down syndrome induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 615–619

Li, M., He, Y., Dubois, W., Wu, X., Shi, J., and Huang, J. (2012b). Distinct regulatory mechanisms and functions for p53-activated and p53-repressed DNA damage response genes in embryonic stem cells. *Mol. Cell* 46, 30–42

Liang G, Zhang Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Res* 2013;23:49–69

Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell*. 2013 Aug 1;13(2):149-59.

Lin SL, Chang DC, Lin CH, Ying SY, Leu D, Wu DT. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(3):1054–65.

Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* 7, 165–171.

Lin MT, Simon DK, Ahn CH, Kim LM, Beal MF. High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet.* 2002 Jan 15;11(2):133-45

Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73

Liu, Yuan, Zhen Qi, Xintong Li, Yanan Du, and Ye-Guang Chen. “Monolayer Culture of Intestinal Epithelium Sustains Lgr5 + Intestinal Stem Cells.” *Cell Discovery* 4, no. 1 (June 12, 2018): 1-3.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Source J.D., (2003), *Molecular Cell Biology*, 5th Edition, W. H. Freeman

Loveland, B., Wang, C. R., Yonekawa, H., Hermel, E. & Lindahl, K. F. Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell* 60, 971–980 (1990).

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

Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res.* 2002 Nov 30;509(1-2):127-51.

Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am J Hum Genet.* 1997 Oct;61(4):953-60.

Marchetto, M.C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527–539.

Mario' n, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153

Marson SS, Levine MF, Cole GM, Frampton T, Brambrink S, Johnstone MG. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*. 2008;134(3):521–33.

Martins-Taylor K, Nisler BS, Taapken SM et al. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29:488–491.

Mason PA, Matheson EC, Hall AG, Lightowers RN (2003) Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res*. Feb 1;31(3):1052-8.

Maynard, S., Swistowska, A.M., Lee, J.W., Liu, Y., Liu, S.T., Da Cruz, A.B., Rao, M., de Souza-Pinto, N.C., Zeng, X., and Bohr, V.A. (2008). Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 26, 2266–2274

Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531

McCauley, Heather A., and James M. Wells. “Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids: Using Principles of Developmental Biology to Grow Human Tissues in a Dish.” *Development (Cambridge, England)* 144, no. 6 (15 2017): 958–62.

Mei I. Lai , Wai Yeng, Wendy-Yeo, Rajesh Ramasamy, Norshariza Nordin, Rozita Rosli, Abhi Veerakumarasivam, Syahril Abdulah. Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *J Assist Reprod Genet* (2011) 28:291–301

Mekhoubad, S., Bock, C., de Boer, A.S., Kiskinis, E., Meissner, A., and Eggan, K. (2012). Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell* 10, 595–609

Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W., & Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Research*, 31, e61.

Miyoshi, Norikatsu, Hideshi Ishii, Hiroaki Nagano, Naotsugu Haraguchi, Dyah Laksmi Dewi, Yoshihiro Kano, Shinpei Nishikawa, et al. “Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs.” *Cell Stem Cell* 8, no. 6 (June 3, 2011): 633–38.

Mohamed Yusoff AA. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors: A mini-review. *J Can Res Ther* 2015;11:535-44

Momcilovi, O., Navara, C., and Schatten, G. (2011). Cell cycle adaptations and maintenance of genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Results Probl. Cell Differ.* 53, 415–458

Nazor, K.L., Altun, G., Lynch, C., Tran, H., Harness, J.V., Slavin, I., Garitaonandia, I., Müller, F.J., Wang, Y.C., Boscolo, F.S., et al. (2012). Recurrent variations in DNA

methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell* 10, 620–634

Nekhaeva E., Bodyak N.D., Kravtsov Y., McGrath S.B., Van Orsouw N.J., Pluzhnikov A., Wei J.Y., Vijg J., Khrapko K., (2002) Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5521–5526

Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet.* 2003 Jan;112(1):29-33.

Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Sakaguchi, H., Akutsu, H., and Umezawa, A. (2011). DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 7, e1002085

Nori, Satoshi, Yohei Okada, Akimasa Yasuda, Osahiko Tsuji, Yuichiro Takahashi, Yoshiomi Kobayashi, Kanehiro Fujiyoshi, et al. “Grafted Human-Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Neurospheres Promote Motor Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, no. 40 (October 4, 2011): 16825–30.

Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., et al. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat. Cell Biol.* 13,541-549

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448:313–7.

Okita K, Nakagawa M, Hyunjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008; 322:949–53.

Page RL, Ambady S, Holmes WF, Vilner L, Kole D, Kashpur O. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning Stem Cells.* 2009; 11:417–26.

Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886

Park CB, Larsson NG (2011) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 193: 809–818

Park I, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince T. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008; 451:141-6

Park, In-Hyun, Natasha Arora, Hongguang Huo, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Akiko Shimamura, M. William Lensch, Chad Cowan, Konrad Hochedlinger, and George Q.

Daley. (2008) “Disease-Specific Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells.” *Cell* 134, no. 5: 877–86

Perales-Clemente E, Cook AN, Evans JM, Roellinger S, Secreto F, Emmanuele V, Oglesbee D, Mootha VK, Hirano M, Schon EA, Terzic A, Nelson TJ (2016) Natural underlying mtDNA heteroplasmy as a potential source of intra-person hiPSC variability. *EMBO J* 35:1979–1990.

Pick, M., Stelzer, Y., Bar-Nur, O., Mayshar, Y., Eden, A., and Benvenisty, N. (2009). Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2686–2690

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–855

Pomp, O., Dreesen, O., Leong, D.F., Meller-Pomp, O., Tan, T.T., Zhou, F., and Colman, A. (2011). Unexpected X chromosome skewing during culture and reprogramming of human somatic cells can be alleviated by exogenous telomerase. *Cell Stem Cell* 9, 156–165

Prigione A, Lichtner B, Kuhl H, Struys EA, Wamelink M, Lehrach H, Ralser M, Timmermann B, Adjaye J (2011) Human induced pluripotent stem cells harbor homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA mutations while maintaining human embryonic stem cell-like metabolic reprogramming. *Stem Cells* 29: 1338–1348

Quinlan, A.R., Boland, M.J., Leibowitz, M.L., Shumilina, S., Pehrson, S.M., Baldwin, K.K., and Hall, I.M. (2011). Genome sequencing of mouse induced pluripotent stem cells reveals retroelement stability and infrequent DNA rearrangement during reprogramming. *Cell Stem Cell* 9, 366–373

Rohani L, Johnson AA, Arnold A et al. The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell* 2014;13:2–7.

Rose G, Passarino G, Franceschi C, De Benedictis G. The variability of the mitochondrial genome in human aging: a key for life and death? *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Nov;34(11):1449-60.

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):751-62.

Rowe, R. Grant, and George Q. Daley. “Induced Pluripotent Stem Cells in Disease Modelling and Drug Discovery.” *Nature Reviews Genetics* 20, no. 7 (July 2019): 377–88.

Ruiz, S., Diep, D., Gore, A., Panopoulos, A.D., Montserrat, N., Plongthongkum, N., Kumar, S., Fung, H.L., Giorgetti, A., Bilic, J., et al. (2012). Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 16196–16201

Ruiz, S., Gore, A., Li, Z., Panopoulos, A.D., Montserrat, N., Fung, H.L., Giorgetti, A., Bilic, J., Batchelder, E.M., Zaehres, H., et al. (2013). Analysis of protein-coding mutations in hiPSCs and their possible role during somatic cell reprogramming. *Nat. Comm.* 4, 1382

Serrano, L., Liang, L., Chang, Y., Deng, L., Maulion, C., Nguyen, S., and Tischfield, J.A. (2011). Homologous recombination conserves DNA sequence integrity throughout the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 20,363-374

Shakiba, N. et al. Cell competition during reprogramming gives rise to dominant clones. *Science* 364, eaan0925 (2019).

Shi, Yanhong, Haruhisa Inoue, Joseph C. Wu, and Shinya Yamanaka. “Induced Pluripotent Stem Cell Technology: A Decade of Progress.” *Nature Reviews Drug Discovery* 16, no. 2 (February 2017): 115–30.

Silva, S.S., Rowntree, R.K., Mekhoubad, S., and Lee, J.T. (2008). X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 4820–4825.

Smith, Z.D., Nachman, I., Regev, A., and Meissner, A. (2010). Dynamic single cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat. Biotechnol.* 28, 521–526

Spikings, E. C., Alderson, J., & St John, J. C. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction*, 76, 327–335.

St John, J. C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., & Salah, R. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reproductive Update*, 16, 488–509.

Stewart JB, Freyer C, Elson JL, Wredenberg A, Cansu Z, Trifunovic A, Larsson NG (2008) Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol* 6: e10.

Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol.* 2004;270:488–98.

Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsel-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 313–314

Tan, Fei, Xiaoding Xu, Ting Deng, Miao Yin, Xianzheng Zhang, and Jiawei Wang. “Fabrication of Positively Charged Poly(Ethylene Glycol)-Diacrylate Hydrogel as a Bone Tissue Engineering Scaffold.” *Biomedical Materials* 7, no. 5 (September 2012): 055009.



Tanaka M. Mitochondrial genotypes and cytochrome b variants associated with longevity or Parkinson's disease. *J Neurol.* 2002 Sep;249 Suppl 2:II11-8.

Tchieu, J., Kuoy, E., Chin, M.H., Trinh, H., Patterson, M., Sherman, S.P., Aimiwu, O., Lindgren, A., Hakimian, S., Zack, J.A., et al. (2010). Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell* 7, 329–342

Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L. N., Smith, Z., Meissner, A., et al. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulatedifferentiation into germ layers. *Cell*, 145, 875–889.

Thundathil, J., Fillion, F., & Smith, L. C. (2005). Molecularcontrol of mitochondrial function in preimplantation mouseembryos. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 405–413.

Tichy, E.D., Pillai, R., Deng, L., Liang, L., Tischfield, J., Schwemberger, S.J., Babcock, G.F., and Stambrook, P.J. (2010). Mouse embryonic stem cells, but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks. *Stem Cells Dev.* 19, 1699–1711

Tsai, Der-Chong, Shih-Jen Chen, Chin-Chou Huang, May-Kang Yuan, and Hsin- Bang Leu. “Age-Related Macular Degeneration and Risk of Degenerative Dementia among the Elderly in Taiwan: A Population-Based Cohort Study.”*Ophthalmology*122, no. 11 (November 1, 2015): 2327-2335.e2

Vaziri H, Chapman KB, Guigova A et al. Spontaneous reversal of the developmental aging of normal human cells following transcriptional reprogramming. *Regen Med* 2010; 5:345–363.

Wallace DC (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*51: 440–450.

Wang W, Lin C, Lu D, Ning Z, Cox T, Melvin D. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:9290–5.

Warren, Luigi, Philip D. Manos, Tim Ahfeldt, Yuin-Han Loh, Hu Li, Frank Lau, Wataru Ebina, et al. “Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA..” *Cell Stem Cell* 7, no. 5 (November 5, 2010): 618–30.

Wattanapanitch, Methichit, Nattaya Damkham, Ponthip Potirat, Kongtana Trakarnsanga, Montira Janan, Yaowalak U-Pratya, Pakpoom Kheolamai, Nuttha Klincumhom, and Surapo Ilssaragrisil. “One-Step Genetic Correction of Hemoglobin E/Beta-Thalassemia Patient-Derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 System.” *Stem Cell Research & Therapy* 9, no. 1 (26 2018): 46

Welle S, Bhatt K, Shah B, Needler N, Delehanty JM, Thornton CA. Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle. *J Appl Physiol.* 2003 Apr;94(4):1479-84.

White SL, Collins VR, Wolfe R, Cleary MA, Shanske S, DiMauro S, Dahl HH, Thorburn DR. Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *Am J Hum Genet.* 1999 Aug;65(2):474-82.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813, 1997

Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, Sun N, Butte AJ, Wu JC. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18:749–58.

Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009; 458:766–70.

Wutz, A. (2012). Epigenetic alterations in human pluripotent stem cells: a tale of two cultures. *Cell Stem Cell* 11, 9–15

Yagi, Takuya, Arifumi Kosakai, Daisuke Ito, Yohei Okada, Wado Akamatsu, Yoshihiro Nihei, Akira Nabetani, et al. “Establishment of Induced Pluripotent Stem Cells from Centenarians for Neurodegenerative Disease Research.” *PLoS ONE* 7, no. 7 (July 25, 2012).

Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10:678–684

Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007; 1:39–49.

Yamanaka S., Blau H. (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches, *Nature* volume 465, pages 704–712

Young, M.A., Larson, D.E., Sun, C.W., George, D.R., Ding, L., Miller, C.A., Lin, L., Pawlik, K.M., Chen, K., Fan, X., et al. (2012). Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 570–582

Yu Y, Chang L, Zhao H et al. Chromosome microduplication in somatic cells decreases the genetic stability of human reprogrammed somatic cells and results in pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2015;5:10114.

Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods.* 2009; 6:363–9.

Zhao, T. et al. Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 17,353–359 (2015).

Zhou, Hongyan, Shili Wu, Jin Young Joo, Saiyong Zhu, Dong Wook Han, Tongxiang Lin, Sunia Trauger, et al. “Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins.” *Cell Stem Cell* 4, no. 5 (May 8, 2009): 381–84.

Zhou, G., Li, S., Dowey, S.N., et al.; NISC Comparative Sequencing Program. (2012). Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* 10, 337–344

Zhu, Wei, Oliver W. Gramlich, Lauren Laboissonniere, Ankur Jain, Val C. Sheffield, Jeffrey M. Trimarchi, Budd A. Tucker, and Markus H. Kuehn. Transplantation of iPSC-Derived TM Cells Rescues Glaucoma Phenotypes in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, no. 25 (June 21, 2016): E3492–3500.

Αγγελοπούλου Ρ, Κυριαζόγλου Μ. Δραστικές μορφές οξυγόνου και ανδρική υπογονιμότητα. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 2005; 22(5):433–446.

Λεκανίδου Ρ, Τσιτήλου Σ, Ροδάκης Γ. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία. 1998.

Μαργαρίτης ΛΧ. Κυτταρική Βιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσαζ. Γ' Έκδοση, Αθήνα, 1996.