

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ-ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ
Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική
Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτριος Χ. Λουτράδης

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

ΚΑΤΣΑΡΑ ΟΛΓΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΑΘΗΝΑ 2013

Στην οικογένεια μου, παλιά και νέα.

Στους γονείς μου,

δίχως αυτούς ο κόσμος θα 'τανε λειψός και η γη πλανήτης ακατοίκητος,

που με έκαναν πουλί ελεύθερο στο πνεύμα, στην ψυχή.

Στον άντρα μου και την κόρη μου,

που μου έδωσαν την πιο στοργική φωλιά, γέμισαν την ζωή μου χρώμα, ευτυχία,

δίχως αυτούς κάθε μου μέρα θα ήτανε μισή.

Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,
να εύχεσαι νάναι μακρύς ο δρόμος,
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.
Τους Λαιστρυγόνες και τους Κύκλωπας,
τον θυμωμένο Ποσειδώνα μη φοβάσαι,
τέτοια στον δρόμο σου ποτέ σου δεν θα βρεις,
αν μέν' η σκέψις σου υψηλή, αν εκλεκτή
συγκίνησις το πνεύμα και το σώμα σου αγγίζει.
Τους Λαιστρυγόνες και τους Κύκλωπας,
τον άγριο Ποσειδώνα δεν θα συναντήσεις,
αν δεν τους κουβανείς μες στην ψυχή σου,
αν η ψυχή σου δεν τους στήνει εμπρός σου.

Να εύχεσαι νάναι μακρύς ο δρόμος.
Πολλά τα καλοκαιρινά πρωιά να είναι
που με τι ευχαρίστησι, με τι χαρά
θα μπαίνεις σε λιμένας πρωτοειδωμένους·
να σταματήσεις σ' εμπορεία Φοινικικά,
και τες καλέςπραγμάτειες ν' αποκτήσεις,
σεντέφια και κοράλλια, κεχριμπάρια κ' έβενους,
και ηδονικά μυρωδικά κάθε λογής,
όσο μπορείς πιο άφθονα ηδονικά μυρωδικά·
σε πόλεις Αιγυπτιακές πολλές να πας,
να μάθεις και να μάθεις απ' τους σπουδασμένους.

Πάντα στον νου σου νάχεις την Ιθάκη.
Το φθάσιμον εκεί είν' ο προορισμός σου.
Αλλά μη βιάζεις το ταξείδι διόλου.
Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει·
και γέρος πια ν' αράξεις στο νησί,
πλούσιος με όσα κέρδισες στον δρόμο,
μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη.

Η Ιθάκη σ' έδωσε τ' ωραίο ταξείδι.
Χωρίς αυτήν δεν θάβγαινες στον δρόμο.
Άλλα δεν έχει να σε δώσει πια.

Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δεν σε γέλασε.
Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα,
ήδη θα το κατάλαβες η Ιθάκες τι σημαίνουν.

(Κ. Καβάφης, Ίκαρος 1984)

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ-ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ

Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ
ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ
ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΤΣΑΡΑ ΟΛΓΑ

Μοριακή Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2013

Ημερομηνία Αίτησης για Ορισμό 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 25-04-07

Ημερομηνία Ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 19-07-07

Ημερομηνία Ορισμού Θέματος: 20-02-08

Ημερομηνία Κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 17-01-14

Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος

Βαθμός: Άριστα

Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αριστείδης Αντσακλής,

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Τέως Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής

Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα».

Επιβλέπων

Δημήτριος Χ. Λουτράδης,

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής

Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα».

Κωνσταντίνος Σ. Στεφανίδης

Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική

Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα».

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αριστείδης Αντσακλής, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Δημήτριος Χ. Λουτράδης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Σπυρίδων Μεσογίτης, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Κωνσταντίνος Σ. Στεφανίδης, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Πετρος Δρακάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΪΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
 Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



ΚΑΤΣΑΡΑ ΟΛΓΑ

Παρούσα Θέση:

Υποψήφια Διδάκτορας

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: «Απομόνωση, καλλιέργεια και χαρακτηρισμός Μεσεγχυματικών Βλαστικών Κυττάρων (MSC) από διάφορους υποπληθυσμούς από το ποντίκι και τον άνθρωπο», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ Α. Αντσακλής.

Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Αντικαρκινικό Νος «Ο Αγ. Σάββας», Λ. Αλεξάνδρας 171, 11522, Αθήνα. Τηλ: 210-6409462.

Στοιχεία Επικοινωνίας: Μιχαλακοπούλου 27, 11528, Αθήνα, Κινητό τηλ.: 6942464530, e-mail: olgakatsara@yahoo.com

Εκπαίδευση:

M.Sc. Μοριακή Ιατρική

Τίτλος Πτυχιακής Εργασίας: «*Functional analysis of TBX22, the transcription factor mutated in X-linked cleft palate*», Imperial College, Λονδίνο, Αγγλία, 2002-3.

B.Sc. Hons Βιοτεχνολογία (2.1)

Τίτλος Πτυχιακής Εργασίας: «*Mutagenesis of galactose oxidase, a copper metaloprotein*», University of Leeds, Αγγλία, 1999-2002.

Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα:

2008- 2010: Πρόγραμμα επιδοτούμενο από την Περιφέρεια Αττικής με θέμα «Παρασκευή εμβολίων κατά του καρκίνου», με επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρ Μ. Παπαμιχαήλ.

Επιμόρφωση:

- Radioactivity course: Principles of Radiation, Protection and Handling, Imperial College, London, 2003
- International Course on Laboratory Animal Science, BSRC A. Fleming, Athens, 2008

Δημοσιεύσεις:

1. **Katsara O**, Mahaira LG, Iliopoulou EG, Moustaki A, Antsaklis A, Loutradis D, Stefanidis K, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. *Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev. 2011 Sep; 20(9):1549-61. Epub 2011 Feb 15.
2. Mahaira LG, **Katsara O**, Pappou E, Iliopoulou EG, Fortis S, Fotinopoulos P, Antsaklis A, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. *The mRNA stabilizing protein, CRD-BP/IMP1 and TET family members cooperate to regulate human MSC proliferative capacity*. Submitted

Posters/Abstracts:

1. **Katsara O**, Mahaira LG, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. The mRNA Stabilizing Protein CRD-BP/IMP1 and TET Family Members Cooperate to Regulate Human Mesenchymal Stem Cell Proliferative Capacity. *Poster για το ISCCR Annual Meeting, Boston, 2013*
2. Mahaira LG, **Katsara O**, Papamichail M, Perez SA. Transcriptional, post-transcriptional and epigenetic control of gene expression in MSC of different origin. *Poster για το Keystone Meeting: Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease, 2011*
3. Analysis of murine BM-MSC properties in relation to gender and donor age; effect of their systemic administration on the ageing phenotype. *Παρουσίαση RESCUE Conference, Oxford, 2010*
4. Katsara O, Iliopoulou EG, Mahaira LG, Stefanidis K, Antsaklis A, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. Detection of an oncofetal gene expression in stem cells of different origin. *Poster για το 34th FEBS Conference, Athens 2008*
5. Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα και πιθανή χρήση στην νεφροπάθεια. *Παρουσίαση Αλκωνίδες Ημέρες Νεφρολογίας, Καλαμπάκα, 2007*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της διατριβής αυτής έγινε με τη συνεργασία των παρακάτω τμημάτων:

- Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική (Αλεξάνδρα), Τομέας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «ο Άγιος Σάββας».

Ολοκληρώνοντας αυτή την εργασία θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους εκείνους που συνετέλεσαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Δρ. Αριστείδη Αντσακλή, Καθηγητή Γυναικολογίας και Πρόεδρο της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την καθοριστική του συμβολή στην διεξαγωγή και περάτωση της παρούσας διατριβής. Την ανάθεση του θέματος, τις εποικοδομητικές συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια της διατριβής και την κατανόηση του σε όλα τα προβλήματα μίας μακρόχρονης μελέτης.

Τον Δρ Μ. Παπαμιχαήλ, τέως διευθυντή του «Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου» του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτή τη διατριβή στο Κέντρο. Πέραν όμως της υλικοτεχνικής υποστήριξης, η συμβολή του Δρ Παπαμιχαήλ ήταν ανεκτίμητης σημασίας γιατί βοήθησε στην πρόοδο της εργασίας μου με ιδέες και σχόλια πρωτοποριακά.

Τον Δρ. Κ. Στεφανίδη, που μοιράστηκε μαζί μας την ιδέα για τη μελέτη του Dazl γονιδίου και μου παρείχε δείγματα ομφάλιου λώρου και ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την απομόνωση MSC. Με την εμπειρία και τις γνώσεις του στην Μαιευτική Γυναικολογία με βοήθησε στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Τον Δρ. Δ. Λουτράδη, για τα εύστοχα σχόλια του και όλη την υποστήριξή του κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Την Δρ Σ. Περέζ, Συντονίστρια του Ερευνητικού Έργου στο «Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου». Η σημαντική συνεισφορά της στην άρτια ολοκλήρωση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν συνετέλεσε στη πληρότητα της εργασίας μου. Η επιστημονική της κατάρτιση και πολύπλευρη γνώση σε

συνδυασμό με το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον της για την εργασία μου, συνετέλεσαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Δίχως την δική της καλοσύνη και συνάμα αυστηρότητα, στον εργασιακό τομέα, δεν θα μπορούσα πότε να κάνω την υπέρβαση από παιδί να γίνω σκεπτόμενη επιστήμονας και να έρθω πιο κοντά στην πραγμάτωση του ονείρου μου, να γίνω ένας ανεξάρτητος άνθρωπος και ερευνητής.

Τον Δρ Κ. Μπαξεβάνη, Διευθυντή του «Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου» του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», για τις εποικοδομητικές του συμβουλές, την υποστήριξη του και την πάντα ευχάριστη διάθεση του. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του στην αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων καθώς και τη θεωρητική τεκμηρίωση αυτών.

Θα ήθελα ξεχωριστά, να ευχαριστήσω την Δρ Λ. Μαχαίρα, ερευνήτρια στο «Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου» για την αμέριστη ηθική υποστήριξή της και την εμπιστοσύνη της. Για την ουσιαστική της συμβολή και τις ατέλειωτες ώρες που ήταν δίπλα μου, ακούραστη, να δίνει πρωτότυπες ιδέες και να καθοδηγεί τόσο στο θεωρητικό όσο και στο τεχνικό μέρος της δουλειάς μου. Χωρίς την υποστήριξη της από την πρώτη ημέρα της γνωριμίας μας, δεν θα είχα ποτέ αποκτήσει την αυτοπεποίθηση που χρειάζεται ένας επιστήμονας αλλά και ένας άνθρωπος για να μπορέσει να παλέψει και να στηρίξει όσα ξέρει αλλά και να διεκδικήσει τα όνειρα του.

Όλους τους συναδέλφους, για τη συνεργασία τους όλα αυτά τα χρόνια. Ειδικότερα τους Έφη Πάπου, Ελένη Ηλιοπούλου και Παναγιώτη Φωτεινόπουλο για την βοήθεια τους στην μελέτη των ανθρώπινων MSC. Τον Κίμων Αργυρόπουλο και την Μαρία Σαλαγιάννη για την βοήθεια στα πειράματα του *in vivo* πρωτοκόλλου και την Αρντιάνα Μουστάκη για την βοήθεια στα πειράματα με τα ποντικίσια MSC. Τον Άγγελο Γκριτζάπη, τον Γιάννη Βουτσά, την Ελευθερία Αναστασοπούλου, Ιωάννα Καλογεροπούλου και την Νίκη Κακούλου για την ευχάριστη συνύπαρξη και την συναδελφική συμπεριφορά τους όλα αυτά τα χρόνια. Την Ευτυχία Λέκκα και τον Παναγιώτη Τζώνη για τις καλύτερες στιγμές που μου χάρισαν στο εργαστήριο αυτό και την έμπρακτη και ψυχολογική συμπαράσταση.

Τους φίλους μου και συγγενείς που έδειξαν κατανόηση και μου συμπαραστάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<i>Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή</i>	<i>vii</i>
<i>Όρκος Ιπποκράτους</i>	<i>ix</i>
<i>Βιογραφικό Σημείωμα</i>	<i>xi</i>
<i>Ευχαριστίες</i>	<i>xv</i>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.Βλαστοκύτταρα, Πολυδυναμικότητα	1
1.1 ΕΙΔΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	2
1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ	4
1.2.1 Μονοπάτια	5
1.2.2 Μεταγραφικοί Παράγοντες	12
1.2.3 Κυτταρικός κύκλος	18
1.2.4 Χρωματίνη και επιγενετική τροποποίηση	20
1.3 CRD-BP/IMP-1: ΕΜΒΡΥΙΚΗ RNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ	24
1.3.1 RNA στόχοι της CRD-BP/IMP1	26
2. Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα	31
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	33
2.1.1 Μόρια Επιφανείας	33
2.1.2 Διαφοροποίηση	41
2.1.3 Ανοσορυθμιστικές ικανότητες	47
2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	55
2.2.1 Κατάγματα και δυσπλασίες οστών/ χόνδρου	57
2.2.2 Καρδιακές Παθήσεις	58
2.2.3 Επίθεση μοσχεύματος κατά ξενιστή (GVHD)	59
2.2.4 Ηπατικές Ασθένειες	60
2.3 ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ	61
ΣΚΟΠΟΣ	65

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	67
1. Μέθοδοι <i>in vitro</i> Κυτταρικής Μελέτης	67
1.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ MSC ΠΟΝΤΙΚΟΥ	67
1.1.1 Μυελός των Οστών	67
1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ MSC ΑΝΘΡΩΠΟΥ	69
1.2.1 Μυελός των Οστών	69
1.2.2 Λιπώδης Ιστός	70
1.2.3 Ομφάλιος Λώρος	71
1.2.4 Αίμα Ομφάλιου Λώρου	71
1.3 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	73
1.3.1 CFU-f	73
1.3.2 Υπολογισμός Ρυθμού Πολλαπλασιασμού Καλλιιεργειών	74
1.4 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	77
1.4.1 Μέτρηση του ρυθμού απόπτωσης	78
1.5 <i>IN VITRO</i> ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ MSC	79
1.5.1 Χρώση Alizarin Red S	80
1.5.2 Χρώση Oil Red O	81
2. <i>In vivo</i> Μοντέλο Κυτταρικής Θεραπείας	82
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	82
2.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	83
2.3 ΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ	84
2.4 ELISA	84
3. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	85
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	85
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	86
3.2.1 Μέθοδος Ισοθειοκυανικής Γουανιδίνης	86
3.2.2 Διάλυμα Tri-ZOL	87
3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	88
3.3.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων	88

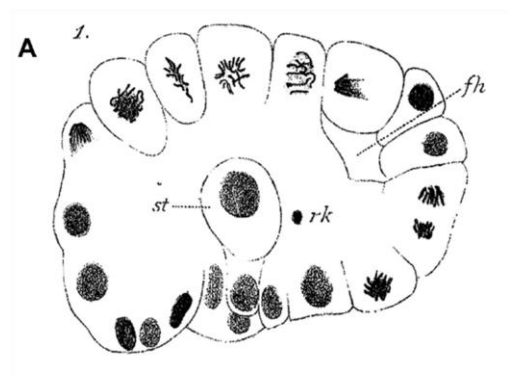
3.3.2 Ποιοτικός έλεγχος DNA	88
3.3.3 Ποιοτικός έλεγχος RNA	89
3.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA.....	89
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	90
3.5.1 cDNA μήτρα.....	91
3.5.2 DNA μήτρα	92
3.6 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΈΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ siRNA	93
3.7 DNA ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ	95
3.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT	96
3.8.1 Απομόνωση και Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης του Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος	96
3.8.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών/ Μεταφορά σε μεμβράνη.....	96
3.8.3 Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών με τη χρήση χημειοφωταύγειας.....	97
4. Στατιστική Ανάλυση	98
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	99
1. Ιδιότητες των MSC από το Ποντίκι	99
1.1 ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	100
1.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	103
1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	105
1.3.1 Διαφοροποίηση.....	105
1.3.2 Ανοσοκαταστολή.....	107
1.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	109
2. Ιδιότητες Ανθρώπινων MSC	113
2.1 ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	113
2.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	116
2.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ MSC	118
3. Ρόλος Εμβρυϊκών Γονιδίων στα MSC.....	120
3.1 ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1	120

3.2 ΠΙΘΑΝΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΕΤ1 ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΤ2 ΣΤΑ MSC.....	122
3.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1 ΑΠΟ ΤΕΤ1 ΚΑΙ ΤΕΤ2	125
4. In vivo Πείραμα Γήρανσης	129
4.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ MSC	129
4.2 ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	132
4.3 ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	133
4.4 ΦΛΕΓΜΟΝΗ/ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ	135
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	139
1. Ιδιότητες MSC	139
1.1 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	139
1.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ.....	142
1.3 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ	143
1.4 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	144
2. Εμβρυικά Γονίδια	145
3. Κυτταρική Θεραπεία.....	152
4. Συμπεράσματα -Μελλοντικοί Στόχοι	155
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	157
ABSTRACT.....	161
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	163
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ.....	191
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	197

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

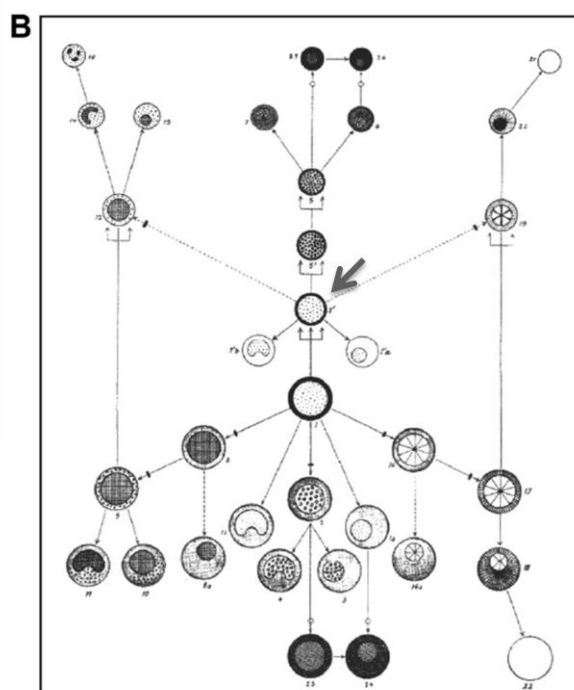
1. ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ, ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑ

Ιστορικά, ο όρος βλαστικό κύτταρο εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1868 σε επιστημονικό σύγγραμμα του γερμανού βιολόγου Ernst Haeckel. Ο Ernst Haeckel όρισε ως βλαστοκύτταρο το μονοκύτταρο οργανισμό πρόγονο όλων των πολυκύτταρων οργανισμών, ενώ 10 χρόνια μετά, επαναπροσδιόρισε τον όρο αυτό και τότε όρισε ως βλαστοκύτταρο το γονιμοποιημένο ωάριο από το οποίο προέρχονται όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού. Το 1892 οι Theodor Boveri και Valentin Hacker ορίζουν ως βλαστικό κύτταρο το γονιμοποιημένο ωάριο την χρονική στιγμή πριν την ασύμμετρη διαίρεση του προς την γαμετική σειρά (germ line) και το μεσόδερμα (Εικόνα 1Α).



Εικόνα 1. Πρώτες χρήσεις του όρου βλαστικό κύτταρο. Α.

Διάγραμμα του Haecker από το 1892, βλαστοκύτταρο (st) **Β.** Η αιμοποίηση από τον Parrenheim το 1905 με το βλαστοκύτταρο στο κέντρο όλων των κυττάρων¹.



Την ίδια περίπου εποχή αναπτύσσεται, εκτός από την εμβρυολογία, η έρευνα πάνω στο αιμοποιητικό σύστημα. Το 1896 λοιπόν, ο Artur Parrenheim ορίζει την

ύπαρξη ενός και μόνου κυττάρου στο κέντρο της αιμοποίησης που είναι ο πρόγονος όλων των αιμοποιητικών κυττάρων. Το κύτταρο αυτό το ονομάζει βλαστικό κύτταρο. Η θεωρία του Parrenheim δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί για αρκετές δεκαετίες, ώσπου το 1960 οι Till και McCulloch αποδεικνύουν για πρώτη φορά την ύπαρξη των Αιμοποιητικών Βλαστικών Κυττάρων (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Θεσπίζουν τον όρο βλαστοκύτταρο και καθιερώνουν τα κύτταρα αυτά ως τα πρότυπα βλαστικά κύτταρα δηλαδή ως κύτταρα ικανά: για πολλαπλασιασμό σχεδόν επ'άπειρον και για τη δημιουργία κυττάρων ικανών για διαφοροποίηση (Εικόνα 1B).

Ο ορισμός του βλαστοκυττάρου που δόθηκε το 1960 είναι αυτός που χρησιμοποιείται έως τις ημέρες μας ¹⁻⁴. Σήμερα, όπως και δύο αιώνες πριν, τα βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα κομμάτια έρευνας για τη βιολογία καθώς και για την ιατρική.

1.1 ΕΙΔΗ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

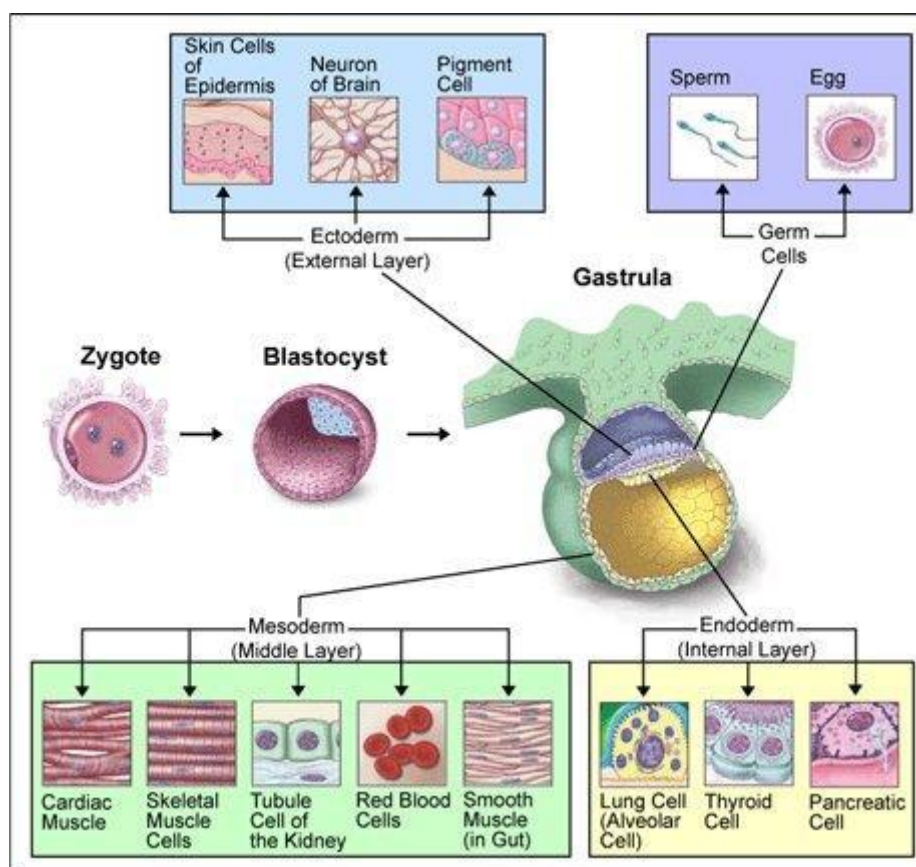
Τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες⁵:

α. Στα πλειοδύναμα (totipotent) βλαστικά κύτταρα (Εικόνα 2) που η πιο γνωστή ομάδα αυτής της κατηγορίας είναι τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells, ESC), που απαντώνται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου.

β. Στα πολυδύναμα (pluripotent) βλαστικά κύτταρα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchymal stem cells, MSC) με τα οποία ασχολείται η εργασία αυτή (βλέπε Παράγραφο 2), τα HSC, τα νευρικά (neural stem cells, NSC), και άλλα βλαστοκύτταρα τα οποία ή απομονώνονται από ενήλικους ιστούς, ενήλικα βλαστοκύτταρα (adult stem cells, ASC), ή από ιστούς εμβρυικής προέλευσης μετά τον τοκετό (Εικόνα 3).

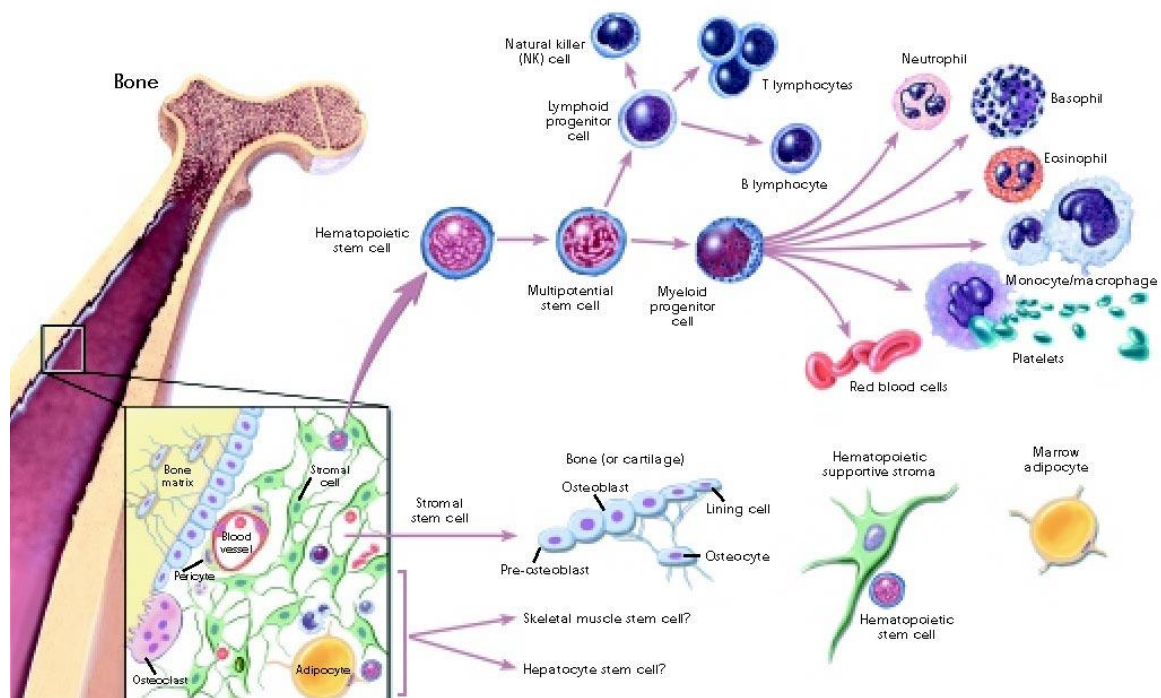
Τα τελευταία χρόνια υπάρχει και μια καινούρια ομάδα βλαστοκυττάρων αυτή των induced Pluripotent Stem Cells (iPS). Τα κύτταρα αυτά είναι τεχνητά^{6, 7}.

Ερευνητές παρήγαγαν εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα από ενήλικα σωματικά κύτταρα με την εισαγωγή αρχικά 4 και στη συνέχεια 2 γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό κατάφεραν να γυρίσουν πίσω στο εμβρυϊκό στάδιο το αναπτυξιακό ρολόι των ενήλικων κυττάρων.



Εικόνα 2. Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (<http://www.biophylaxis.gr/>).

Τα ESC διαφέρουν από τα ASC στον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους - τα πρώτα διαιρούνται γρηγορότερα και μπορούν να ανανεώνονται αποτελεσματικότερα- και στην δυνατότητα για διαφοροποίηση- τα ESC μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλα τα εμβρυϊκά δέρματα, ενώ τα ASC κυρίως περιορίζονται στους ιστούς του δέρματος από το οποίο προήρθαν. Οι δύο αυτές ιδιότητες (αυτοανανέωση και διαφοροποίηση) των βλαστοκυττάρων ορίζονται ως πολυδυναμικότητα. Γνωρίζοντας τους μηχανισμούς υπευθύνους για την πολυδυναμικότητα των βλαστοκυττάρων μπορούμε να χρησιμοποιούμε και να τροποποιούμε τα κύτταρα καταλλήλως για χρήση στην αναγεννησιακή ιατρική και στην κυτταρική θεραπεία.



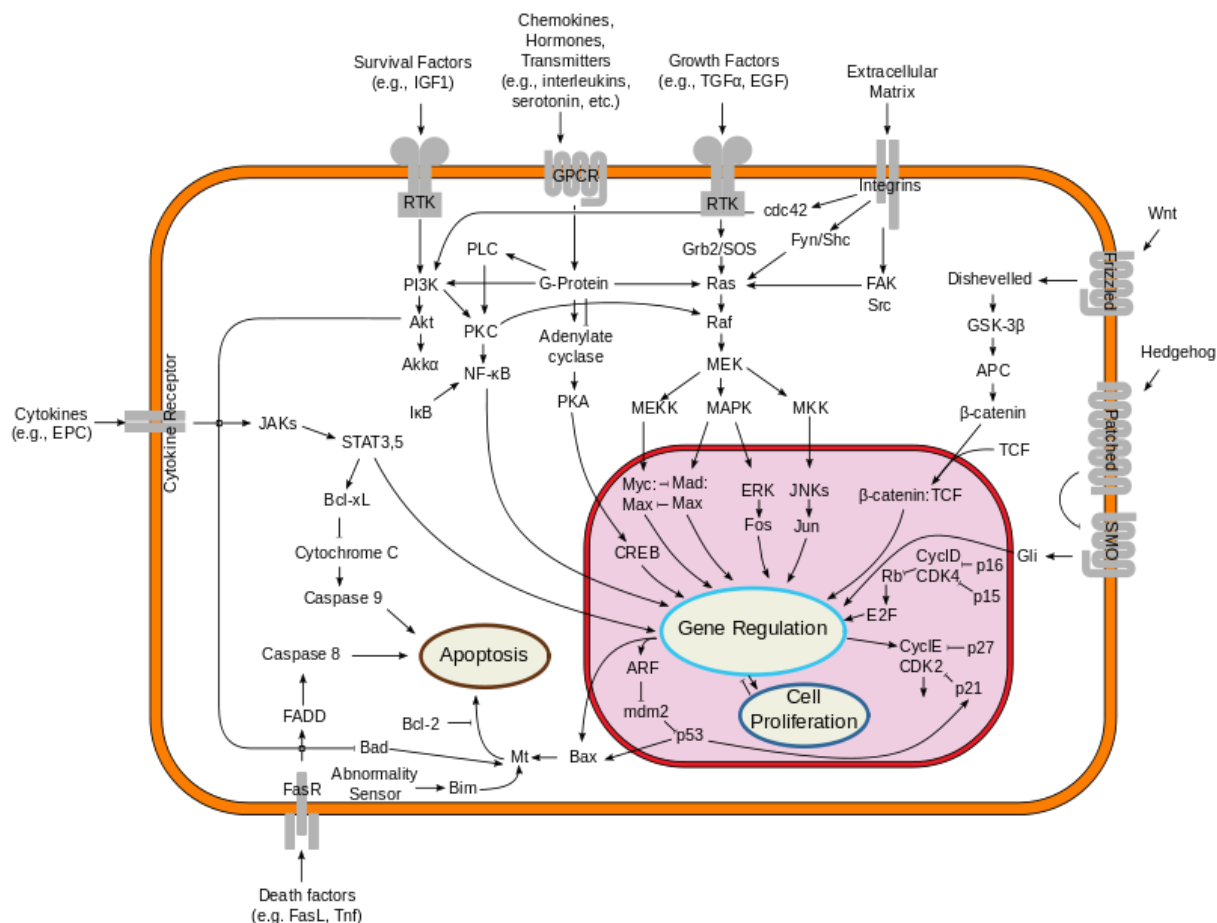
Εικόνα 3. Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. HSC και MSC από το μυελό των οστών (Terese Winslow, 2001).

1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι μηχανισμοί πολυδυναμικότητας έχουν μελετηθεί, λόγω βιοηθικών περιορισμών, κυρίως στα ESC ποντικού (mESC), τα οποία έχουν προέλθει από έμβρυα πριν ή κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Οι πρώτες σειρές ESC δημιουργήθηκαν από την έσω τροφοβλάστη (inner cell mass, ICM) του ποντικού το 1981 από τους Martin Evans και Matthew Kaufman⁸. Ο πληθυσμός των πλειοδύναμων βλαστοκυττάρων εμφανίζεται μόνο παροδικά στην αρχή της εμβρυογένεσης. Για το ποντίκι η χρονική αυτή περίοδος είναι 3.5 ημέρες μετά την σύλληψη (days post coitum, dpc) οπότε εμφανίζεται η ICM μετά τον διαχωρισμό της από το τροφοεξώδερμα κατά τη δημιουργία της βλαστοκύστης.

Παρακάτω θα αναφερθούν: τα πιο σημαντικά μονοπάτια (Εικόνα 4) και οι μεταγραφικοί παράγοντες στους οποίους καταλήγουν για να γίνει η σωστή ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την διαφοροποίηση αλλά

και την δομή της χρωματίνης, κομμάτια όλα της πολυδυναμικότητας των βλαστοκυττάρων ⁹.



Εικόνα 4. Μονοπάτια πολυδυναμικότητας. Συνοπτική απεικόνιση των διαφόρων μηχανισμών που συμβάλλουν στην αυτόανανεωση των ESC.

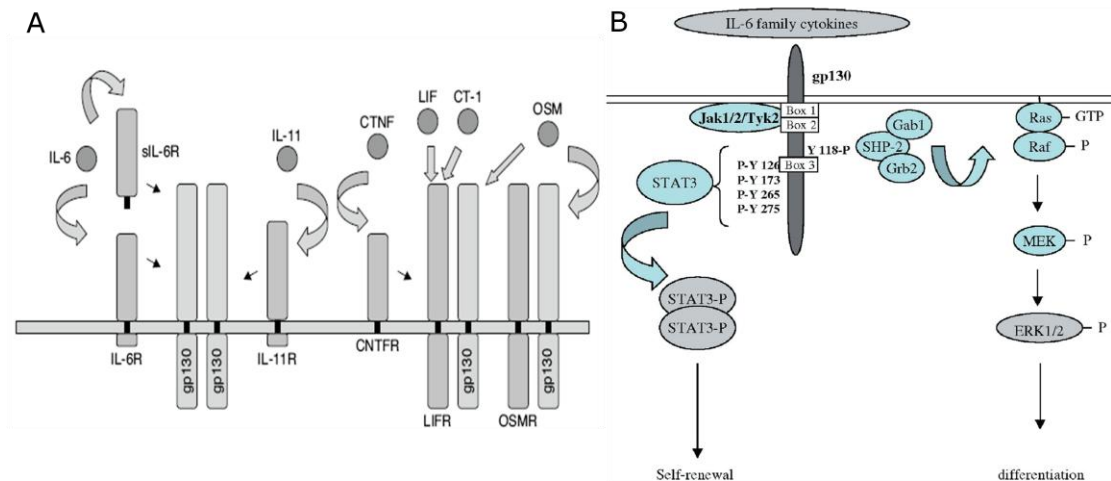
1.2.1 Μονοπάτια

1.2.1.1 LIF STAT3

Τα mESC μπορούν να πολλαπλασιάζονται για μεγάλο διάστημα όταν καλλιεργούνται επάνω σε στιβάδα μιτοτικά απενεργοποιημένων εμβρυικών ινοβλαστών (mouse embryonic fibroblasts, MEF). Ο παράγοντας υπεύθυνος για να προωθεί την αυτοανανέωση και να μπλοκάρει την διαφοροποίηση των ESC βρέθηκε να είναι ο leukemia inhibitory factor (LIF) ^{10, 11}. Ο LIF είναι μέλος της IL-6 οικογενείας πρωτεϊνών και ενεργοποιεί τα mESC μέσω του gp130 υποδοχέα, ο οποίος

δημιουργεί ετεροδιμερή με τον LIF υποδοχέα (LIFR, Εικόνα 5A). Η ενεργοποίηση του gp130 υποδοχέα με την σειρά της ενεργοποιεί το JAK –STAT μονοπάτι και ειδικότερα το STAT3¹². Γεγονός που -σε συνδυασμό με την παρουσία ορού στην καλλιέργεια- αρκεί για να εμποδίσει τη διαφοροποίηση των mESC¹³. Εκτός από την ενεργοποίηση του STAT3, το LIF διεγείρει επίσης την ενεργοποίηση του MAPK, το οποίο προάγει την διαφοροποίηση. Συνεπώς τα mESC μπορούν να διατηρούν την πολυδυναμικότητα τους παρουσία του LIF λόγω της ισορροπίας που προκαλείται από την ενεργοποίηση του STAT3 και του MAPK (Εικόνα 5B). Τα γονίδια που ενεργοποιούν το STAT3 είναι ανεπαρκώς αναγνωρισμένα. Σε μελέτες με πειράματα RNA μικροσυστοιχιών, μεταξύ αδιαφοροποίητων και διαφοροποιημένων mESC, το STAT3 βρέθηκε να σχετίζεται με το Lefty1 (αυξητικός παράγοντας) τους ID1 και ID2 (μεταγραφικοί παράγοντες) και την Groucho πρωτεΐνη Aes1 η οποία είναι ο πιθανός άμεσος στόχος του STAT3¹⁴. Γεγονός που υποδηλώνει την μεταξύ σχέση του LIF-STAT3 και άλλων σημαντικών μονοπατιών όπως το BMP και το Wnt.

Ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc είναι ένας άλλος βασικός στόχος του LIF-STAT3 όπως έδειξε ο Cartwright¹⁵. Παίζει σημαντικό ρόλο στην αυτοανανέωση μιας και η έκφραση του μειώνεται δραματικά τις πρώτες 36 ώρες μετά την απομάκρυνση του LIF, ενώ η διατήρηση της έκφρασης του c-Myc, καθιστά την αυτοανανέωση των ESC ανεξάρτητη του LIF. Επιπλέον μία κυρίαρχα αρνητική (dominant negative) μορφή του c-Myc δρα ανταγωνιστικά κατά της αυτοανανέωσης και προωθεί την διαφοροποίηση. Η επαγωγή της έκφρασης του c-Myc από το STAT3, μέσω της έκφρασης της λειτουργικής υπομονάδας της τελομεράσης, οδηγεί στον συνεχή πολλαπλασιασμό των ESC¹⁶.



Εικόνα 5. IL-6 οικογένεια υποδοχέων. Σχηματική απεικόνιση **(Α)** των διαφόρων υποδοχέων που δημιουργούν σύμπλοκα με τον gp130 υποδοχέα και **(Β)** των μονοπατιών που επάγει η ενεργοποίηση του gp130 υποδοχέα⁵.

Τέλος, ο υποδοχέας του LIF και του gp130 βρέθηκαν όχι μόνο να εκφράζονται αλλά και να ενεργοποιούνται από το LIF και στα ανθρώπινα ESC. Παρόλα αυτά, αυτό δεν ήταν αρκετό για να διατηρήσει την πολυδυναμικότητα των ESC *in vitro*, όπως στα mESC¹⁷. Η διαφορά αυτή στην επίδραση του LIF-STAT3 στα ανθρώπινα και τα ESC ποντικού μπορεί να οφείλεται στο ότι τα κύτταρα βρίσκονταν σε διαφορετική φάση της ανάπτυξης τους όταν απομονώθηκαν.

1.2.1.2 Wnt

Το μονοπάτι Wnt θα μπορούσε να συμβάλει στην διατήρηση της πολυδυναμικότητας των ανθρωπίνων και των ποντικίσκων ESC. Το μονοπάτι Wnt ενεργοποιείται ενδογενώς στα ESC και απενεργοποιείται κατά την διαφοροποίηση¹⁸. Σε αντίθεση με άλλα μονοπάτια, η δράση του Wnt/b-catenin μηχανισμού είναι ίδια στα ανθρώπινα και στα ποντικίσκων ESC. Η ενεργοποίηση του Wnt προκαλεί αύξηση της έκφρασης του STAT3, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει συνεργασία (synergistic effect) με το LIF-STAT3 μονοπάτι¹⁹. Επιπλέον, το μονοπάτι Wnt όπως και το LIF-STAT3 αυξάνει τα επίπεδα του c-Myc, παρατήρηση που προτείνει την σύγκλιση των δύο αυτών μονοπατιών στο c-Myc¹⁵.

1.2.1.3 TGF-β

Ο TGF-β (αυξητικός παράγοντας εξαλλαγής- βήτα, transforming growth factor- beta) είναι ένας παράγοντας πρότυπο μιας μεγάλης οικογενείας αυξητικών παραγόντων και παραγόντων διαφοροποίησης. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από τουλάχιστον 40 μέλη συμπεριλαμβανομένων των: TGF-β (αυξητικό παράγοντα εξαλλαγής βήτα, transforming growth factor beta), Activin, Nodal, και bone morphogenetic proteins (BMPs). Όλοι αυτοί οι προσδέτες (ligands) σχετίζονται με τα ESC. Το TGF-β μεταδίδει το σήμα από την μεμβράνη στον πυρήνα με την δημιουργία ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου υποδοχέων κινασών σερίνης/θρεονίνης, γνωστών ως TGF-β υποδοχέων τύπου I και II. Ειδικότερα, το TGF-β και η Activin προσδένονται στους υποδοχείς τύπου II ενώ οι BMPs στους υποδοχείς τύπου I ²⁰.

BMP4

Όπως προαναφέρθηκε το LIF-STAT3 μονοπάτι μπορεί να διατηρήσει τα mESC αδιαφοροποίητα μόνο παρουσία ορού. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες στον ορό που απαιτούνται για να συλλειτουργήσουν με το LIF-STAT3. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι ο BMP4 που δρα μέσω του Smad1/5/8. Η προσθήκη του BMP4 στο καλλιεργητικό μέσο επιτρέπει σε συνδυασμό με το LIF την διατήρηση των mESC σε μέσο χωρίς ορό ²¹.

Το BMP4 φωσφορυλιώνει το Smad1/5 στα ανθρώπινα και στα ποντικίσια ESC. Η ενεργοποίηση του Smad1/5 προκαλεί την ενεργοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Id (inhibitor of differentiation) που λειτουργικά ανταγωνίζεται τον bHLH μεταγραφικό παράγοντα και μπλοκάρει την νευρική διαφοροποίηση ^{21, 22}. Η εξωγενής έκφραση της Id μιμείται την δράση του BMP4 στα mESC. Επιπλέον το BMP4 μπορεί να διατηρήσει τα mESC παρουσία LIF, πιθανά επειδή μπλοκάρει την MAPK σηματοδότηση ²³. Δηλαδή το BMP4 συμβάλει στην αυτοανάνεωση των mESC, αλλά μόνο παρουσία του LIF.

Σε αντίθεση με τα mESC, το BMP4 δεν μπορεί να διατηρήσει την ικανότητα των ανθρώπινων ESC για αυτοανανέωση και στην πραγματικότητα επάγει τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν προς τροφοβλάστη ή πρωτογενές ενδόδεσμα²⁴. Η Noggin, όμως ένας αναστολέας του BMP4 μονοπατιού, διατηρεί τα ESC αδιαφοροποίητα²⁵.

TGF-β/Activin/Nodal

Διερεύνηση του προφίλ έκφρασης των ESC έδειξε πως το TGF-β και οι σχετιζόμενοι με αυτόν παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των Nodal, Cripto, Lefty1 και Lefty2, εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα αδιαφοροποίητα ανθρώπινα ESC²⁶. Καλλιεργητικό μέσο εμπλουτισμένο με activin A διατηρεί τα ESC αδιαφοροποίητα χωρίς την ενεργοποίηση του STAT3. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνονται και από τους James *et al* που βρήκαν πως το TGF-β/Activin/Nodal μονοπάτι ενεργοποιείται μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smad2/3 στα αδιαφοροποίητα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του Smad2/3 καταστέλλει την έκφραση του Smad1/5 και συνεπώς τα TGF-β/Activin/Nodal ρυθμίζουν αρνητικά το BMP4 στα ανθρώπινα ESC^{27, 28}.

1.2.1.4 bFGF

Τα ανθρώπινα ESC διατηρούν την πολυδυναμικότητα τους παρουσία στιβάδας τροφοδοτικών κύτταρων, ενώ τα mESC μπορούν να διατηρηθούν αδιαφοροποίητα μόνο παρουσία LIF. Παρόλα αυτά το LIF δεν μπορεί να διατηρήσει τα ανθρώπινα ESC. Τα ανθρώπινα ESC καλλιεργούνται συνήθως στη παρουσία bFGF είτε σε κύτταρα τροφοδότες ή σε καλλιεργητικό υλικό εμπλουτισμένο με τους αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνουν οι ινοβλάστες (fibroblast-conditioned medium). Συνεπώς, το μονοπάτι bFGF φαίνεται πως είναι κεντρικής σημασίας στην αυτοανανέωση των ESC²⁹. Έρευνες έχουν δείξει την παρουσία στοιχείων του FGF μονοπατιού στα ESC, συμπεριλαμβανομένων των τεσσάρων υποδοχέων του FGF καθώς και στοιχεία downstream, τα οποία είναι εμπλουτισμένα στα αδιαφοροποίητα

ESC συγκριτικά με τα διαφοροποιημένα³⁰⁻³³. Από τους 4 υποδοχείς FGF, η έκφραση του FGFR1 βρίσκεται σε αφθονία στα μη διαφοροποιημένα ESC. Επιπλέον το SU5402 (αναστολέας του FGFR) προκαλεί ταχεία διαφοροποίηση των ESC³⁴.

Μεγάλη συγκέντρωση του bFGF (100 ng/mL) αρκεί για την διατήρηση των ανθρώπινων ESC σε καλλιέργεια παρότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης του εξωγενούς bFGF δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Κάποιοι έχουν βρει πως το bFGF ενεργοποιεί το MAPK μονοπάτι και στη συνέχεια το c-fos στα ESC^{35, 36}. Επίσης το bFGF μπορεί να αναστείλει την δράση του BMP εμποδίζοντας την πυρηνική μετάβαση του φωσφορυλιωμένου Smad1²⁵.

Σε μέσο καλλιέργειας χωρίς ορό και bFGF, τα κύτταρα διαφοροποιούνται. Η προσθήκη bFGF αλλάζει την μορφολογία των κυττάρων, τα κάνει πιο πυκνά και βοηθά την καλλιέργεια τους για μεγάλο χρονικό διάστημα διατηρώντας τα αδιαφοροποίητα, καθώς αυξάνει την ικανότητα τους για αυτοανανέωση³⁷.

1.2.1.5 MAPK-ERK

Τα mESC εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα του ERK όταν διεγείρονται για να υποστούν διαφοροποίηση. Η καταστολή του ERK μονοπατιού προάγει την mESC αυτοανανέωση. Και η ενεργοποίηση των BMP μπλοκάρει την διαφοροποίηση των mESC σε συνεργασία με το LIF εξαιτίας της έκφρασης του Id και της απενεργοποίησης του ERK^{23, 38}. Παρόλα αυτά τα ESC παρουσιάζουν υψηλή βασική δραστηριότητα (basal activity) της ERK όταν είναι σε αδιαφοροποίητη φάση. Η ενεργοποίηση του ERK σχετίζεται με το bFGF μονοπάτι που διατηρεί την αυτοανανέωση των ESC για μεγάλο χρονικό διάστημα^{35, 36}. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του ERK μπορεί να είναι κάτω (downstream) από το PI3K, μονοπάτι που επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αυτοανανέωση των ανθρώπινων ESC³⁹.

1.2.1.6 PI3K/Akt

Το μονοπάτι PI3K παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των ESC. Το ERas, μέλος της οικογένειας των μικρών πρωτεϊνών Ras GTPase το οποίο εκφράζεται ειδικά στα ESC, διεγείρει το PI3K μονοπάτι, το οποίο με την σειρά του προάγει τον πολλαπλασιασμό των ESC⁴⁰. Η δραστηριότητα του PI3K θα μπορούσε να είναι επίσης καθοριστικής σημασίας και για την αυτοανανέωση των ESC⁴¹. Έχει αναφερθεί ότι η αναστολή της PI3K και του Akt επάγει την διαφοροποίηση των mESC παρουσία LIF και των ανθρώπινων ESC παρουσία στιβάδας κύτταρων τροφοδοσίας (MEF), υποδηλώνοντας ότι το PI3K/Akt μονοπάτι είναι αναγκαίο για τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας τους^{42, 43}. Επιπλέον, οι Watanabe *et al.*, 2006 έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Akt μπορεί να διατηρήσει την πολυδυναμικότητα των mESC ανεξάρτητα από το Wnt/b-catenin μονοπάτι⁴⁴.

Το μονοπάτι PI3K/Akt ενεργοποιείται από πολλούς διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην πολυδυναμικότητα των ESC όπως το LIF και το bFGF^{45, 46} και το Akt με τη σειρά του ελέγχει πολλές διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες. Η σύντομη φάση G1 που έχουν τα ESC συμβάλλει στη διατήρηση του αδιαφοροποίητου προφίλ τους, και το Akt μπορεί να προάγει την μετάβαση από την G1 στην S φάση διευκολύνοντας τον σχηματισμό συμπλόκων κυκλίνης/CDK⁴⁷. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι ο βασικός ρόλος του Akt στην αυτοανανέωση των ESC. Ωστόσο, η υπερέκφραση της κυκλίνης D, που ρυθμίζεται από το Akt, δεν διατηρεί τα ESC αδιαφοροποίητα συνεπώς οι βασικοί στόχοι μένουν ακόμα άγνωστοι⁴⁴.

Στα ESC, το p53 προωθεί την διαφοροποίησή τους μέσω της καταστολής της έκφρασης του Nanog⁴⁸. Η δράση αυτή εξαρτάται από την φωσφορυλίωση της Ser315 του p53, που είναι υπόστρωμα του GSK3b (:glycogen synthase kinase-3beta)⁴⁹, το οποίο ρυθμίζεται αρνητικά από το PI3K και Akt⁵⁰. Όλα αυτά μαζί υποδεικνύουν πως

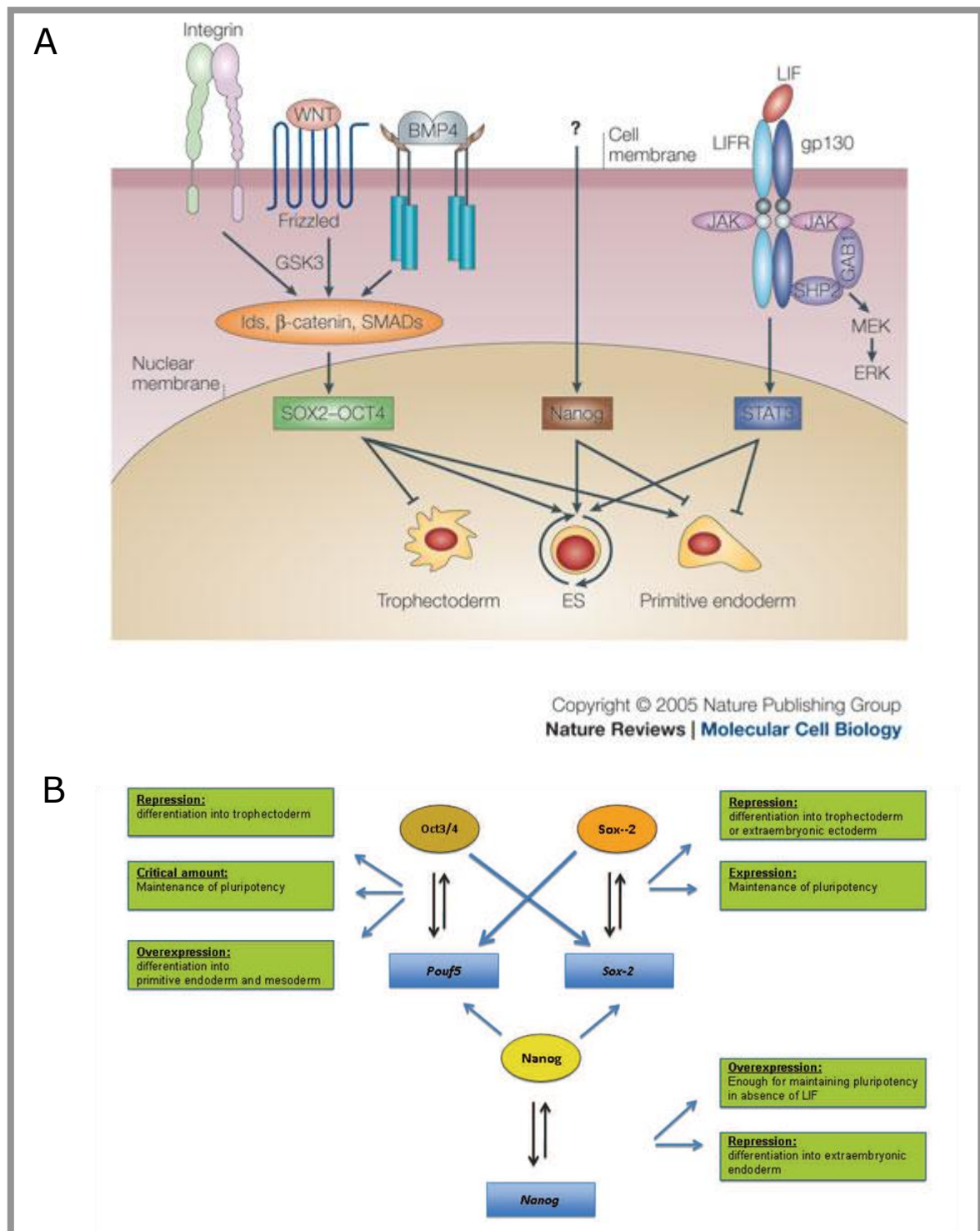
το PI3K μπορεί να συμβάλει στην αυτοανανέωση των ESC μέσω του GSK3b, του p53 και του Nanog⁴⁰.

1.2.2 Μεταγραφικοί παράγοντες

Δημοσιεύσεις των τελευταίων χρόνων έχουν διαλευκάνει το κύκλωμα των μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνο για την αυτοανανέωση και την διαφοροποίηση των ESC. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι οι Oct3/4, Sox2 και Nanog. Οι παράγοντες αυτοί είτε ενεργοποιούνται από τα μονοπάτια που μόλις αναφέραμε ή είναι αυτο-ρυθμιζόμενοι (Εικόνα 6). Όταν τα Oct3/4, Sox2 και Nanog εκφράζονται, ενεργοποιούν γονίδια υπεύθυνα για την αυτοανανέωση και καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την διαφοροποίηση των ESC, συνεπώς τα ESC παραμένουν πολυδύναμα.

1.2.2.1 Oct4/Sox2

Το Oct3/4 (κωδικοποιημένο από το Pou5f1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας της POU οικογένειας που αναγνωρίζει την οκταμερή-αλληλουχία ATGCAAAT. Κατά την ανάπτυξη του ποντικού, η έκφραση του Oct3/4 ενεργοποιείται στο στάδιο των 4 κυττάρων και στην συνέχεια η έκφραση του περιορίζεται στην ICM, στην γαμετική σειρά και στα ESC. Το Oct3/4 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα ESC ποντικού και η έκφραση του μειώνεται όταν αυτά διαφοροποιούνται και χάνουν την πολυδυναμικότητά τους.



Εικόνα 6. ESC Μεταγραφικοί παράγοντες. Ενεργοποίηση (A) ή/και αυτορρύθμιση (B) του Sox2, Oct3/4 και Nanog^{51, 52}.

Συγκεκριμένα επίπεδα έκφρασης είναι απαραίτητα για να διατηρηθούν τα ESC αδιαφοροποίητα. Η απώλεια της έκφρασης του Oct3/4 προκαλεί ακατάλληλη διαφοροποίηση των ESC σε τροφοεκτόδερμα, ενώ η υπερέκφραση του διαφοροποιεί

τα ESC προς ενδόδερμα και μεσόδερμα^{53, 54}. Κάποια από τα γονίδια-στόχοι του Oct3/4 που έχουν βρεθεί έως σήμερα στα ESC είναι τα: Fgf4, Utf1, Opn, Rex1/Zfp42, Fbx15 και Sox2⁵⁵⁻⁵⁷.

Το Sox2 είναι μια πρωτεΐνη της SRY-οικογένειας HMG (High-mobility group) μεταγραφικών παραγόντων που δεσμεύεται μαζί με το Oct3/4 σε πολλά από τα διάφορα γονίδια-στόχους και είναι απαραίτητη για την διατήρηση της πολυδυναμικότητας των ESC. Έχει ίδιο μοτίβο έκφρασης με το Oct3/4 μέχρι το στάδιο της προεμφύτευσης του εμβρύου. Όπως συμβαίνει και με το OCT3/4, η καταστολή της έκφρασης του SOX2 συσχετίζεται με την διαφοροποίηση των κυττάρων, συνεπώς το SOX2 δεν ανιχνεύεται σε τύπους κυττάρων με περιορισμένες αναπτυξιακές δυνατότητες. Επιπλέον, η απουσία της έκφρασης του SOX2 στο έμβρυο προκαλεί θάνατο μόνο μετά την εμφύτευση⁵⁸ (Avilion et al., 2003). Αυτό οφείλεται στη συσσώρευση των μητρικών μεταγράφων του SOX2 στο κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων, τα οποία εξακολουθούν να υπάρχουν σε όλα τα κύτταρα, τουλάχιστον έως το στάδιο της βλαστοκύστης, σε αντίθεση με τα OCT3/4 μητρικά μετάγραφα, που διαρκούν μόνο μέχρι το στάδιο των 2-κυττάρων⁵⁹. Η παρουσία και των δύο μεταγραφικών παραγόντων είναι απαραίτητη για την δημιουργία και την διατήρηση της επιβλάστης μιας και η υπερέκφραση του OCT3/4 με την συνοδευτική καταστολή της έκφρασης του SOX2 οδηγεί σε διαφοροποίηση προς εκτόδερμα

Το LIF δεν φαίνεται να ρυθμίζει το Oct3/4 και το Oct3/4 δεν φαίνεται να ρυθμίζει το Jak-STAT μονοπάτι, κάτι που υποδηλώνει πως το μονοπάτι Oct3/4 είναι ένα άλλο παράλληλο μονοπάτι που ελέγχει την αυτοανανέωση των ESC. Πολλά από τα γονίδια-στόχοι εμπεριέχουν στους υποκινητές τους και θέσεις πρόσδεσης STAT, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να συνεργάζονται στα ESC. Το ESG1 (embryo-specific gene 1 ή αλλιώς Dppa5) εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα ανθρώπινα και στα ποντικίσια ESC και η έκφραση αυτή μειώνεται όταν διαφοροποιούνται. Συνεπώς το ESG1 είναι κατάντι

(downstream) στόχος και των δυο μονοπατιών, STAT3 και Oct4, το πώς όμως τα σήματα ενσωματώνονται στο ESG1 παραμένει ακόμα άγνωστο^{33, 60}.

Σε αντίθεση με τα γονίδια-στόχους είναι πολύ λίγα αυτά που γνωρίζουμε για τους ανάντοι (upstream) ρυθμιστές του Oct3/4. Ο υποκινητής του Oct3/4 περιλαμβάνει διατηρημένους απομακρυσμένους (distal) και εγγύς (proximal) ενισχυτές (enhancers) που μπορούν είτε να καταστείλουν ή να ενεργοποιήσουν την έκφραση του ανάλογα με τους παράγοντες δέσμευσης που καταλαμβάνουν τις θέσεις αυτές⁶¹.

Το ποσοτικό επίπεδο του Oct3/4 είναι σημαντικό για τον προσδιορισμό της τύχης των κυττάρων: για να διατηρηθεί η πολυδυναμικότητα είναι απαραίτητο τα κύτταρα να διατηρήσουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης του Oct3/4 σε αφθονία. Η έκφραση του Oct3/4 ρυθμίζεται από τον εαυτό της^{62, 63}. Η ρύθμιση αυτή συνεισφέρει στην διατήρηση των σταθερών επιπέδων έκφρασης του Oct3/4 στα ESC. Επιπλέον το Nanog και το FoxD3 μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν την έκφραση του Oct3/4⁶⁴.

1.2.2.2 Nanog

Το Nanog, όπως το Sox2, είναι επίσης ένας homeobox-περιέχων μεταγραφικός παράγοντας, που παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των πολυδύναμων κυττάρων της ICM και των ESC. Εκφράζεται στα πολυδύναμα κύτταρα ενώ στα διαφοροποιημένα δεν εκφράζεται. Η παρεμπόδιση της έκφρασης του Nanog στα ανθρώπινα ESC προκαλεί την διαφοροποίησή τους προς ενδόδερμα και μειώνει την ικανότητα τους για αυτοανανέωση ενώ η υπερέκφραση του στα mESC τα χρήζει ικανά για αυτοανανέωση ανεξάρτητα από το LIF, παρατηρήσεις που προσδίδουν στον Nanog σημαντικές ικανότητες ρύθμισης της πολυδυναμικότητας των ESC^{65, 66}. Η υπερέκφραση του Nanog στα mESC είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση του STAT3 καθώς και από την παρουσία του BMP4, αλλά μπορεί να

διατηρήσει την έκφραση της Id πρωτεΐνης- ενός μεταγραφικού παράγοντα στόχου του STAT3 μονοπατιού²¹.

Το πώς ρυθμίζει ακριβώς το Nanog την πολυδυναμικότητα των ESC, παραμένει άγνωστο. Με βάση τις διαφορές ανάμεσα σε κύτταρα που εκφράζουν το Nanog σε κανονικά επίπεδα (wildtype) και των τελείως αρνητικών (null) για Nanog κυττάρων, έχει προταθεί ότι το Nanog ρυθμίζει την πολυδυναμικότητα κυρίως ως μεταγραφικός καταστολέας της έκφρασης κατάντοι (downstream) γονιδίων με σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση όπως οι Gata4 και Gata6^{65, 66}. Ωστόσο, το Nanog μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει τα γονίδια που είναι απαραίτητα για αυτοανανέωση, όπως το Rex1, μέσω του καρβοξυτελικού άκρου του^{67, 68}. Όπως προαναφέρθηκε το Rex1 είναι γονίδιο-στόχος του Oct4/Sox2 συμπλόκου. Επιπλέον, το Rex1 ρυθμίζεται άμεσα από το Nanog, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Rex1 μπορεί να είναι μια διασταύρωση του Nanog και του Oct3/4-Sox2 σήματος⁶⁸. Το Nanog μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει τον υποκινητή του Oct3/4⁶⁴.

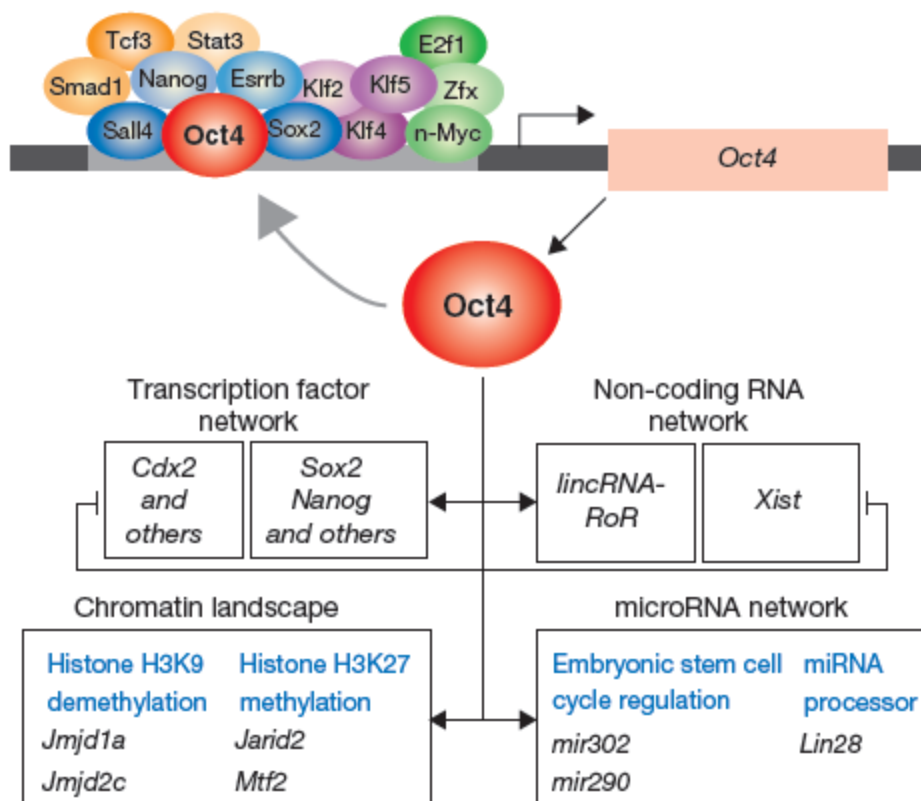
Οι Suzuki *et al.*, 2006 έδειξαν πως το Nanog μπορεί να ρυθμίζεται από το STAT3 και το Brachyury (το οποίο με τη σειρά του μπορεί να είναι ένας στόχος του μονοπατιού Wnt/β-catenin), και τότε δεσμεύεται απευθείας στο Smad1 και μπλοκάρει την μεταγραφική του ενεργοποίηση με το να εμποδίζει την προσέλκυση συνδिएεργτών (coactivators), έτσι το Nanog αλληλεπιδρά με τα μονοπάτια Wnt και BMP4⁶⁹. Τέλος ο υποκινητής του Nanog είναι άμεσος στόχος του Oct3/4-Sox2 συμπλόκου⁷⁰⁻⁷².

1.2.2.3 Δίκτυο Oct4/Sox2/Nanog

Οι παράγοντες Oct4, Sox2, και Nanog φαίνεται πως δημιουργούν ένα αυστηρά ελεγχόμενο μεταγραφικό δίκτυο που διατηρεί την πολυδυναμικότητα των ESC (Boyer *et al.*, 2005, 2006a; Ivanova *et al.*, 2006; Loh *et al.*, 2006; Rao and Orkin, 2006). Η δράση του Oct4 ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις με άλλους

μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των Sox2, FoxD3, και ESG1 που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα ESC (Εικόνα 7).

Το Sox2 (SRY-relatedHMGbox2), σχηματίζει σύμπλοκο με το Oct4 στην περιοχή του ενισχυτή (enhancer) των γονιδίων-στόχων και ρυθμίζει την έκφραση αυτού σαν ένα δυαδικό σύμπλοκο. Το μοτίβο έκφρασης όπως προείπαμε είναι παρόμοιο με του Oct4 και όλα τα γονίδια-στόχοι έχουν οκταμερή και sox-επταμερή στοιχεία που διαχωρίζονται από 0 ή 3 βάσεις. Το Oct4 αλληλεπιδρά με το Sox2 για να ρυθμίσει την έκφραση downstream γονιδίων καθώς και την ίδια την έκφραση του Oct4/Sox2.



Εικόνα 7. Ο ρόλος του Oct3/4 στα ESC. Ο Oct3/4 είναι ο πιο καλά χαρακτηρισμένος μεταγραφικός παράγοντας και στην εικόνα αυτή φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις του με άλλους μεταγραφικούς ρυθμιστές, με τα επιγενετικά δίκτυα και με δίκτυα microRNA⁷³.

Εκτός από αυτά τα γονίδια-στόχους έχει βρεθεί ότι το Nanog είναι επίσης στόχος του Oct4/Sox2 συμπλόκου, μιας και υπάρχει Oct4/Sox2 δεσμευτική περιοχή στον υποκινητή του Nanog. Δηλαδή, το Oct4/Sox2 συμπλόκο ρυθμίζει την έκφραση βασικών μεταγραφικών παραγόντων των ESC δια μέσου αυτορυθμιζόμενων και πολυπαραγοντικών μηχανισμών.

Διατηρημένες Oct3/4 και Sox2 περιοχές έχουν βρεθεί σχεδόν σε όλα τα γονίδια που εκφράζονται στα ESC, υπογραμμίζοντας την σημαντικότητα του μονοπατιού αυτού. Επιπλέον, το Oct3/4 μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση του Nanog, με το να ενεργοποιεί απευθείας τον υποδοχέα του όταν μειώνεται η έκφραση του κάτω από τα σταθερά επίπεδα που υπάρχουν πάντα στα ESC, ενώ καταστέλλει την έκφραση του Nanog στην αρχική του συγκέντρωση με ίδια ή παραπάνω επίπεδα έκφρασης από τα κανονικά.

Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η υπερέκφραση του Oct4 επιφέρει την διαφοροποίηση των ESC. Από την άλλη, το FoxD3, ένας ενεργοποιητής (activator) του Nanog, αντισταθμίζει την κατασταλτική δράση του Oct3/4, όταν εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα, στον υποκινητή του Nanog.

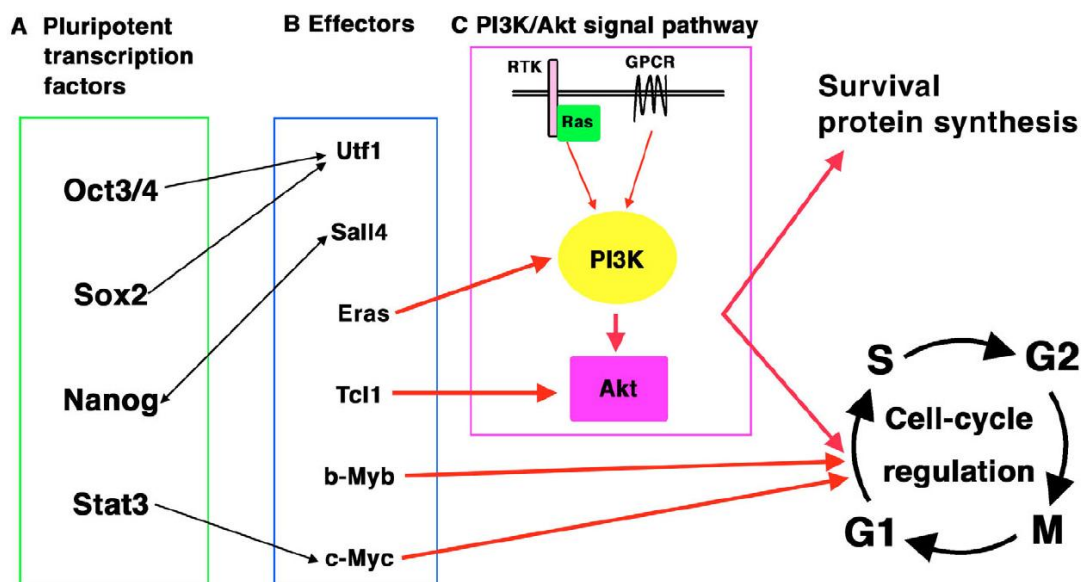
Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες δημιουργούν ένα ρυθμιστικό κύκλωμα που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αυτοανανέωση και την πολυδυναμικότητα των ESC διατηρώντας αυστηρά ελεγχόμενη την ακριβή έκφραση των ιδίων αλλά και άλλων μορίων (Εικόνα 6B).

1.2.3 Κυτταρικός κύκλος

1.2.3.1 Σύντομος Κυτταρικός Κύκλος

Σε αντίθεση με τον κυτταρικό κύκλο των σωματικών κυττάρων, ο κυτταρικός κύκλος των ESC έχει μερικά ειδικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 8). Ένα από τα πιο εντυπωσιακά είναι ο σύντομος κυτταρικός κύκλος- ανθρώπινα ESC: 15-16 h, mESC: 10 h^{74, 75}. Ο σύντομος κυτταρικός κύκλος των ESC φαίνεται να οφείλεται στη σύντομη

φάση G1 που μπορεί να συμβάλει στην αυτοανανέωση τους, μιας και όταν τα ESC βρίσκονται στη G1 φάση είναι πιο επιρρεπή στην διαφοροποίηση με ρετινοϊκό οξύ, RA⁷⁶. Επιπλέον τα ESC εκκρίνουν της έκφρασης της (cyclin-dependent kinase, CDK) 4, κινάση που εκφράζεται σε όλα τα σωματικά κύτταρα και εκφράζουν τις κυκλίνες D σε πολύ χαμηλά επίπεδα, τα οποία αυξάνονται δραματικά κατά την *in vitro* και *in vivo* διαφοροποίηση. Ειδικότερα, η έκφραση της κυκλίνης D1 ρυθμίζεται από το μονοπάτι PI3K, που ενεργοποιείται από τον LIFR και την έκφραση του Eras, και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην G1/S μετάβαση των ESC^{40, 77}.



Εικόνα 8. Ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των mESC. Πολυδύναμοι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν την έκφραση άλλων δραστικών μορίων (effectors) που με την σειρά τους ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων⁷⁸.

Ο έλεγχος στα ESC και στα σωματικά κύτταρα διαφέρει στο ότι ο κυτταρικός κύκλος των ESC δεν εξαρτάται από την λειτουργικότητα του p16ink4a/cyclinD:Cdk4/pRB:E2F μονοπατιού^{77, 79, 80}. Εξαρτάται όμως από τα σύμπλοκα cyclinE:Cdk2 και cyclinA:Cdk2 που είναι ενεργά καθόλη την διάρκεια του κύκλου, γεγονός που δείχνει πως ο μιτοτικός κύκλος είναι πάντα έτοιμος για τον πολλαπλασιασμό του DNA⁷⁴.

1.2.3.2 Τελομεράση

Τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα καλύπτονται από ειδικές δομές αποκαλούμενες τελομερή, οι οποίες ενεργούν για την επίτευξη της χρωμοσωμικής ακεραιότητας. Η σύνθεση και διατήρηση των τελομερών επιτυγχάνεται με την τελομεράση. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου της τελομεράσης έχει δείξει ότι εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ESC. Το μονοπάτι της τελομεράσης είναι ενεργό και απαραίτητο για την παρατεταμένη αυτοανανέωση των ανθρώπινων και mESC^{43, 81}. Κατά την διάρκεια της ESC διαφοροποίησης η δραστηριότητα της τελομεράσης μειώνεται⁸².

Ο υποκινητής της TERT (Telomerase reverse transcriptase) αποτελείται από δύο E- box περιοχές και αρκετές Sp1-θέσεις, περιοχές που αναγνωρίζονται από την Myc/ Mad/ Max οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων. Η παρατήρηση αυτή έδωσε τις πρώτες ενδείξεις για το ρόλο του c-Myc στην αυτοανανέωση των ESC⁸². Πειράματα υπερέκφρασης του c-Myc, έδειξαν πως το γονίδιο αυτό ήταν αρκετό για να διατηρήσει τα ESC αδιαφοροποίητα ενώ η παρεμπόδιση της έκφρασης του προκάλεσε την διαφοροποίησή τους¹⁵. Δύο άλλα μόρια που εμπλέκονται στην ρύθμιση της τελομεράσης είναι οι αυξητικοί παράγοντες bFGF και TGF-β.

1.2.4 Χρωματίνη και επιγενετική τροποποίηση

Η διαφοροποίηση των ESC από βλαστοκύτταρα σε κύτταρα πιο περιορισμένων δυνατοτήτων συνοδεύεται από αλλαγές στο μοτίβο έκφρασης του γονιδιώματος. Τα γονίδια που δραστηριοποιούνται στα βλαστοκύτταρα σταδιακά αποσιωπούνται στα πιο διαφοροποιημένα κύτταρα, και υποσύνολα ειδικών γονιδίων κάθε κυτταρικού τύπου ενεργοποιούνται. Αυτή η εξέλιξη είναι το αποτέλεσμα της επιλεκτικής έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων σε συνδυασμό με την αναδιαμόρφωση και τροποποίηση της χρωματίνης, η οποία περιλαμβάνει την ομοιοπολική τροποποίηση ιστονών, την μεθυλίωση του DNA καθώς και τον

εντοπισμό (localization) της χρωματίνης σε εξειδικευμένες πυρηνικές περιοχές (specialized nuclear domains).

1.2.4.1 Τροποποίηση της χρωματίνης

Η γονιδιακή δραστηριότητα προσδιορίζεται κατά κύριο λόγο από την δομή της χρωματίνης και από τις αλληλεπιδράσεις των ειδικών δεσμευτικών πρωτεϊνών-χρωματίνης. Μερικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένων της πυρηνικής αρχιτεκτονικής, της δομής και της δυναμικής της χρωματίνης, καθώς και των τροποποιήσεων των ιστονών, διαφέρουν στα βλαστικά κύτταρα σε σχέση με τα σωματικά κύτταρα.

Για παράδειγμα, η χρωματίνη των ESC εμφανίζει τα χαρακτηριστικά της ευχρωματίνης: αφθονία ακετυλιωμένων ιστονών και αυξημένη προσβασιμότητα σε νουκλεάσες^{83, 84}. Κατά τη διάρκεια της *in vitro* διαφοροποίησης τα ESC υπόκεινται ολική αλλά και ειδική (σε κάποια σημαντικά γονίδια) λειτουργική αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης: αύξηση του δείκτη H3-triMeK9 (μεθυλίωση στο K9 της ιστόνης H3) και ολική μείωση των επιπέδων των ακετυλιωμένων ιστονών H3 και H4 (δείκτες ευχρωματίνης) κατά την επαγόμενη διαφοροποίηση από ρετινοϊκό οξύ^{85, 86}. Επίσης, παρατηρήθηκαν μεγάλες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της histone deacetylase (HDACs) και της methyl-CpG-binding protein (MECPs) στα ESC. Τέλος, η μεθυλίωση της H3K27 διατηρεί τα ESC πολυδύναμα μιας και εμποδίζει την έκφραση γονιδίων ειδικών για την διαφοροποίηση τους προς κάποια εμβρυϊκή στιβάδα^{84, 87}.

Μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών που παίζει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της χρωματίνης είναι οι πρωτεΐνες Polycomb (PcG)⁸⁸. Οι PcG είναι απαραίτητες για την έκφραση γονιδίων στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και σχετίζονται με την αυτοανανέωση και την πολυδυναμικότητα των ESC. Διευκολύνουν τον ολιγομερισμό και τη συμπύκνωση της χρωματίνης, και αναστέλλουν την διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Οι PcG πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο

διαφορετικά σύμπλοκα καταστολής το PRC1 και το PRC2-PRC3. Μελέτες στα ESC έδειξαν πως το PRC1 και το PRC2 προσδένονται σε διάφορα γονίδια (μεταγραφικούς ρυθμιστές, μόρια σηματοδότησης (signaling), που προωθούν την διαφοροποίηση των ESC. Απουσία των PcG πολλά από τα γονίδια-στόχοι τους θα εκφράζονταν, γεγονός που προσάγει στις πρωτεΐνες αυτές ένα σημαντικό ρόλο στην καταστολή της πρώιμης έκφρασης γονιδίων διαφοροποίησης. Όταν όμως τα ESC λάβουν σήματα διαφοροποίησης, τα γονίδια-στόχοι ενεργοποιούνται κατά προτίμηση. Δηλαδή οι PcG καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων διαφοροποίησης με ένα ευέλικτο τρόπο, ο οποίος μπορεί να αναστραφεί αργότερα από ειδικά -γονίδια και σήματα του κάθε βλαστικού δέρματος^{84, 87, 89, 90}.

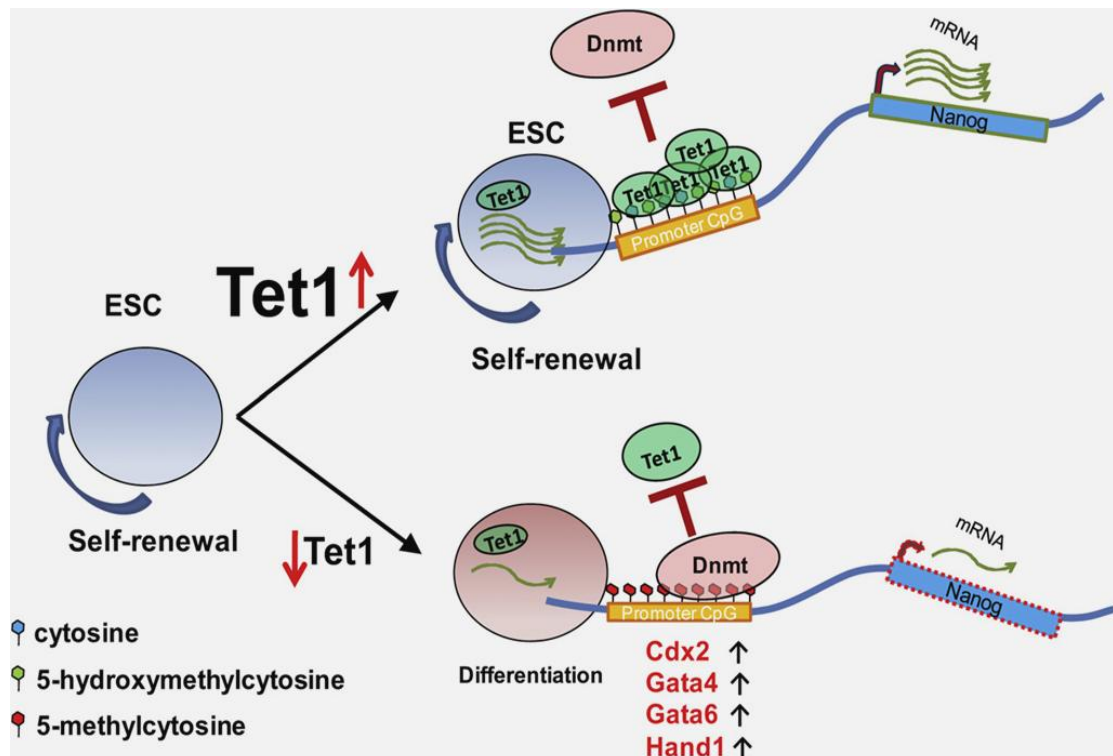
1.2.4.2 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης και στα θηλαστικά κυρίως συμβαίνει στις CpG (κυτοσίνη-φωσφορικό άλας -γουανίνη) περιοχές του DNA. Αυτό το είδος μεθυλίωσης είναι ο πιο μελετημένος μηχανισμός αποσιώπησης (silencing) έκφρασης γονιδίων. Η αποσιώπηση γονιδίων μέσω μεθυλίωσης του DNA είναι απαραίτητη για την επαγωγή της διαφοροποίησης των ESC.

Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε με πειράματα σε ESC, στα οποία δεν εκφράζονταν οι μεθυλτρανσφεράσες Dnmt1, Dnmt3a και Dnmt3b, ή η πρωτεΐνη CpG island-binding protein, CGBP, και τα κύτταρα παρουσίασαν σοβαρή υπομεθυλίωση του DNA και ένα πλήρως διαφοροποιημένο προφίλ^{91, 92}. Αντιθέτως, υπερμεθυλίωση της περιοχής του Oct3/4 υποκινητή συσχετίζεται με γονιδιακή σίγαση στα διαφοροποιημένα κύτταρα, ενώ η υπομεθυλίωση της περιοχής αυτής στα ESC επιτρέπει υψηλά επίπεδα έκφρασης του Oct3/4, κρατώντας τα έτσι σε πολυδύναμη κατάσταση.

1.2.4.3 Απομεθυλίωση του DNA

Για να εξασφαλιστεί κατάλληλη εμβρυογένεση και να αποφευχθεί η ανάπτυξη νόσου, είναι απαραίτητη η στενή ρύθμιση των μοτίβων μεθυλίωσης του DNA. Έως τώρα λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν/ προσαρμόζουν τα επίπεδα μεθυλίωσης, δηλαδή απομεθυλιώνουν το DNA.



Εικόνα 9. Ο ρόλος της Tet1 στα ESC

Πρόσφατα, η TET οικογένεια πρωτεϊνών- TET1, TET2 and TET3- έχει ταυτοποιηθεί ως μία νέα οικογένεια ενζύμων που μεταβάλλουν την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA^{93, 94} και επομένως μπορεί να ελέγχουν την έκφραση γονιδίων σημαντικών για την αυτοανανέωση και την διαφοροποίηση των ESC^{93, 94}. Οι Ito *et al* βρήκαν πως τα mESC εκφράζουν μόνο την Tet1 και Tet2⁹⁵. Επιπλέον η καταστολή της έκφρασης της Tet1 οδηγεί σε σημαντική μείωση της έκφρασης του Nanog, μειωμένο πολλαπλασιασμό και εμφανή διαφοροποίηση των ESC (Εικόνα 9). Από την άλλη οι Koh *et al* αναφέρουν ότι η εξάλειψη της έκφρασης του Tet1 στα mESC συσχετίζεται με μειωμένη έκφραση των ανταγωνιστών του Nodal, Lefty1 και Lefty 2,

που προάγουν την διαφοροποίηση των ESC⁹⁶. Επιπλέον παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, Brachyury και Foxa2, υπεύθυνων για την διαφοροποίηση των mESC προς μεσόδερμα και ενδόδερμα και υπερέκφραση των CDX2, Eomes και Elf5, μεταγραφικών παραγόντων του τροφοεκτοδέρματος, υπογραμμίζοντας έτσι το σημαντικό ρόλο των πρωτεϊνών TET ως βασικών ρυθμιστών της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς και της διαφοροποίησης.

1.3 CRD-BP/IMP-1: ΕΜΒΡΥΙΚΗ RNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά από τους Ross *et al.* ως μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε ειδική αλληλουχία του μηνύματος του *c-Myc* στο Coding Region Determinant (CRD-Binding Protein)– η οποία επηρεάζει τη σταθερότητά του αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής του έως και 8 φορές (Εικόνα 10). Επιπλέον οι Nielsen *et al.* κλωνοποίησαν ανεξάρτητα το ίδιο γονίδιο και το ονόμασαν IMP1, σαν μέλος της IMP πρωτεϊνικής οικογένειας, που έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο 5'UTR του μηνύματος του leader 3' *IGFII*⁹⁷. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η πρωτεΐνη CRD-BP/IMP1 δεσμεύεται και στο RNA μόριο.

Είναι μέλος μιας υψηλά συντηρημένης οικογένειας RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών, η οποία στον άνθρωπο αντιπροσωπεύεται από τρία ομόλογα μόρια, τη CRD-BP/IMP1, την IMP2 και την IMP3/KOC, στο *Xenopus*, από την Vg1-RBP/Vera η οποία προσδένεται στο μήνυμα του Vg1 και στο κοτόπουλο από την cZBP-1 πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύεται στο 3'UTR του μηνύματος της β-ακτίνης. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια και ομολογία που κυμαίνεται στο 70–95% της αμινοξικής τους αλληλουχίας.

Κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 577 α.α. που περιέχει τρεις χαρακτηριστικές δομές: (1) τέσσερις KH δομές (hrRNP K homology) στο καρβόξυ–τελικό άκρο της, (2) ένα RGG στοιχείο και (3) δύο RRM (: RNA recognition motif) στο αμινο–τελικό άκρο της.

Ανάλυση του ολικού RNA από έμβρυο ποντικού έδειξε ότι η έκφραση της CRD-BP/IMP1 φθάνει στα υψηλότερα επίπεδα στην ημέρα E12.5, μετά από την οποία αρχίζει η συνεχής μείωσή της έως την εξαφάνισή της στα νεογέννητα ποντίκια. Περίπου την ίδια χρονική στιγμή αρχίζει να ανιχνεύεται το μήνυμα του IGFII, του H19 και το c-myc γίνεται απαραίτητο για την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

Σε διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν το γονίδιο της CRD-BP/IMP1 με εισαγωγή της β-γαλακτοσιδάσης, η έκφραση της ανιχνεύτηκε τόσο σε κύτταρα του μεσεγχύματος όσο και του παρεγχύματος⁹⁸. Άξιο αναφοράς είναι ο εντοπισμός της την E14.5 μόνο στη θέση των μελλοντικά σχηματιζόμενων τενόντων των πλευρών. Επιπλέον, ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου της CRD-BP/IMP1 έδειξαν ότι η απουσία της πρωτεΐνης αυτής προκαλεί νανισμό και υψηλά ποσοστά περιγενετικού θανάτου. Μόνο το 40% των ομόζυγων ζώων επέζησαν, έχοντας σώμα κατά 40% μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με τα φυσιολογικά άγριου τύπου ή τα ετερόζυγα. Το μικρό μέγεθος των ομόζυγων ζώων οφείλεται σε υποπλασία στα αναπτυσσόμενα όργανα καθώς και στο μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού ινοβλαστών που απομονώθηκαν από αυτά τα ζώα. Επιπλέον, διαπιστώθηκαν έντονες ιστολογικές ανωμαλίες κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα και τα νεφρά. Διαπιστώθηκε επίσης ότι τα μηνύματα τόσο του leader 3' όσο και του leader 4' IGFII παρουσίαζαν μειωμένη μεταφρασιμότητα καθώς και μειωμένη έκφραση πολλών γονιδίων του εντέρου, που κωδικοποιούν κυρίως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η CRD-BP/IMP1 είναι κυρίως κυτταροπλασματική και είτε συγκεντρώνεται γύρω από τον πυρήνα και τα λαμελιπόδια, είτε βρίσκεται διάχυτη⁹⁹. Σε NIH3T3 κύτταρα τοποθετημένα σε περιβάλλον που τους δίνει το ερέθισμα να μεταναστεύσουν, παρατηρήθηκε ανακατανομή των μορίων της CRD-BP/IMP1 με χαρακτηριστική κίνηση τους προς την προεξέχουσα άκρη των λαμελιποδίων που σχηματίστηκαν και συσχετισμός τους με τους μικροσωληνίσκους.

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί, η έκφραση της CRD–BP/IMP1 έχει βρεθεί να περιορίζεται κυρίως σε εμβρυϊκούς ιστούς, ενώ έχει ανιχνευθεί και σε σπερματικά κύτταρα στον ενήλικα άνθρωπο. Οι Hansen *et al.*, ανέφεραν την ανίχνευση εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων CRD–BP/IMP1 σε φυσιολογικά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα ενηλίκων ποντικών.

Τέλος, από την ερευνητική μας ομάδα διαπιστώθηκε η έκφραση της CRD–BP/IMP1 στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα από αίμα ομφαλίου λώρου (UCB–CD34 HSC). Το UCB θεωρείται ότι περιέχει σε μεγάλη αναλογία κύτταρα εμβρυικής προέλευσης και τα HSC θεωρούνται πιο πολυδύναμα από αντίστοιχους πληθυσμούς του ενήλικα οργανισμού.

1.3.1 RNA στόχοι της CRD–BP/IMP1

Η CRD–BP/IMP1 όπως προαναφέρθηκε, δεσμεύεται σε διάφορα mRNA μόρια και κατά συνέπεια επηρεάζει την έκφραση τους. Αυτά με τα οποία ασχοληθήκαμε στην εργασία αυτή, θα αναλυθούν περαιτέρω παρακάτω.

1.3.1.1 c-MYC

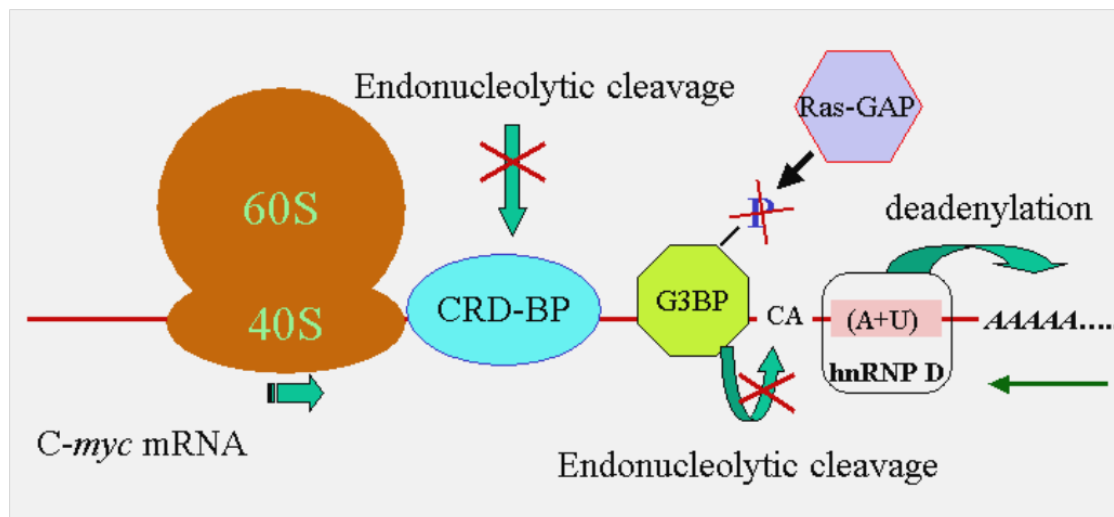
Τα τρία βασικά μέλη της οικογένειας Myc, c-myc, N-myc and L-myc, ενέχονται σε σημαντικές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες που βρίσκονται σε λεπτή ισορροπία μέσα σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, όπως η αύξηση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση του, στην δομή του κυτταροσκελετού, στην κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα¹⁰⁰⁻¹⁰³. Επιπλέον είναι ευρέως γνωστά για τον μετασχηματισμό πρωτογενών (primary) κυττάρων *in vitro* και για την λειτουργία τους ως ογκογονίδια.

Το c–Myc ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά ως το κυτταρικό ομόλογο γονίδιο του ιϊκού ογκογονιδίου ν–myc του ρετροϊού AML (avian myelocytomatosis retrovirus). Μέσα στο γονίδιο του c–myc – που αποτελείται συνολικά από 3 εξώνια – υπάρχουν

πολλαπλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, επιτρέποντας έτσι το σχηματισμό τεσσάρων μεταγράφων, με την αντίστοιχη δραστικότητα των 4 διαφορετικών υποκινητών (P0, P1, P2, και P3 με μεγέθη 3.1, 2.4, 2.25 και 2.0 kb αντίστοιχα). Το μετάγραφο που κυριαρχεί είναι το P2 και φέρει ένα 5'-UTR μεγέθους περίπου 400 νουκλεοτιδίων. Η περιοχή στο 5' άκρο συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου, μέσω αλληλεπίδρασης με cis ενισχυτικά στοιχεία.

Η πρωτεΐνη C-MYC είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από τη χαρακτηριστική δομή φερμουάρ-λευκίνης (leucine-zipper) και τη δομή φουρκέτας: έλικα-θηλειά-έλικα. Με τη δομή αυτή αλληλεπιδρά με ανάλογη δομή του μορίου MAX σχηματίζοντας ετεροδιμερή. Τα ετεροδιμερή αυτά έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στην E-box αλληλουχία του DNA (CACGTG/CANNTG). Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών επηρεάζεται άμεσα από τις πρωτεΐνες της οικογένειας MAD/MXII, πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τη MAX, δρώντας έτσι ανταγωνιστικά για το c-MYC. Ανταγωνιστικά για το c-MYC δρα και άλλη μια πρωτεΐνη, η Mnt, η οποία σχηματίζει με τη MAX ετεροδιμερή που επιδρούν στα ίδια γονίδια-στόχους με τα σύμπλοκα c-MYC/MAX, έχοντας όμως το αντίθετο αποτέλεσμα, καταστέλλοντας δηλαδή τη μεταγραφή τους. Τα τελευταία χρόνια, κυρίως με πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών (microarrays) έχει διαφανεί ότι το c-Myc επηρεάζει άμεσα την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εμπλεκόμενες πρακτικά σε «κάθε μείζον βιοχημικό και ρυθμιστικό μονοπάτι»^{104, 105}.

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, το c-Myc εκφράζεται ευρέως κατά την εμβρυογένεση ενώ στον ενήλικα μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς με υψηλή αυξητική ικανότητα, όπως είναι η επιδερμίδα και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Η έκφρασή του σχετίζεται άμεσα με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων^{107, 108}. Ταυτόχρονα με την προαγωγή της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού, το c-Myc αναστέλλει την τελική διαφοροποίηση των περισσότερων κυτταρικών τύπων και ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην απόπτωση.



Εικόνα 10. Μηχανισμοί καταστροφής του μηνύματος του c-Myc. Η πρόσδεση της CRD-BP/IMP1 προστατεύει το c-Myc mRNA από τη δράση ριβονουκλεασών και αυξάνει το χρόνο ημιζωής του ¹⁰⁶.

1.3.1.2 IGFII leader 3'

Ο IGFII είναι ένας εμβρυϊκός αυξητικός παράγοντας με αυτοκρινή και παρακρινή δράση¹⁰⁹. Μπορεί να δρα ως παράγοντας επιβίωσης, ως μιτογόνος παράγοντας ή να τροποποιεί το μεταβολισμό. Πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα έδειξαν ότι η έλλειψη του παράγοντα αυτού δεν έχει ορατές συνέπειες στους απογόνους, ενώ η υπερέκφρασή του συχνά προκαλεί δυσανάλογη αύξηση, διόγκωση της καρδιάς, οίδημα και θάνατο του εμβρύου ¹¹⁰.

Στον άνθρωπο, αυξημένα επίπεδα του παράγοντα IGFII σχετίζονται με το Σύνδρομο Beckwith–Wiedemann, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσανάλογη αύξηση του εμβρύου και δυσμορφίες^{111, 112}. Επιπλέον, υπερέκφραση του IGFII παρατηρείται συχνά σε όγκους, όπου έχει αυτοκρινή δράση ¹¹³.

Η έκφραση του παράγοντα IGFII ελέγχεται αυστηρά και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Το ανθρώπινο γονίδιο του παράγοντα αυτού έχει ιδιαίτερα περίπλοκη δομή και περιλαμβάνει τέσσερις υποκινητές οι οποίοι είναι ενεργοί με τρόπο που εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού και από τον ιστό. Έτσι παράγονται διάφορα μετάγραφα με μεγέθη που ποικίλουν από 2.2 kb έως 6.0kb. Τα ποικίλα αυτά

μετάγραφα διαφέρουν στις αλληλουχίες του 5' άκρου τους και στη μεταφρασιμότητά τους. Το leader 4' μετάγραφο μεταφράζεται μονίμως, ενώ το μετάγραφο εκείνο που υπάρχει σε μεγαλύτερη αφθονία μέσα στο κύτταρο είναι αυτό του leader 3', το οποίο περιέχει ένα 5'UTR εξαιρετικά πλούσιο σε κυτοσίνες που μεταφράζεται μόνο σε κύτταρα που περνούν αυξητική φάση ⁹⁷.

Το ομόλογο μετάγραφο στο ποντίκι παύει να μεταφράζεται μεταξύ της 11.5 και 12.5 ημέρας ζωής του εμβρύου. Η CRD-BP/IMP1 δεσμεύεται ειδικά στο 5'UTR του ανθρώπινου μηνύματος του leader 3' IGFII μεγέθους 6.0kb και η υπερέκφρασή της έχει βρεθεί ότι προκαλεί καταστολή της μετάφρασης του γονιδίου αναφοράς σε χιμαϊρικό όχημα *in vivo* ⁹⁹.

1.3.1.3 H19

Το προϊόν του γονιδίου H19 είναι ένα μόριο RNA μεγέθους 12.3Kb , το οποίο υφίσταται διαδικασία ματίσματος και αδενυλίωσης. Το γονίδιο που μεταγράφεται τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι αποτελείται από πέντε εξώνια που διαχωρίζονται από πολύ μικρά εσώνια. Μέχρι σήμερα δεν έχει ανιχνευθεί πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου αυτού, παρόλο που τουλάχιστον στο ανθρώπινο μόριο υπάρχει μια περιοχή που θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame) και αυτό θα έδινε μια πρωτεΐνη μεγέθους 26KD.

Το H19 RNA είναι ένα ογκο-εμβρυϊκό RNA που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα και σε κάποιους εμβρυϊκούς ιστούς. Μετά τη γέννηση τα επίπεδα έκφρασης του μειώνονται και τελικά γίνονται μη ανιχνεύσιμα στους περισσότερους ιστούς με εξαίρεση το σκελετικό μυ, την καρδιά και τα κύτταρα του μαστικού αδένα ¹¹⁴. Επανέκφρασή του έχει ανιχνευθεί σε όγκους που προέρχονται από εμβρυϊκό ιστό. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία στο προϊόν του γονιδίου H19, το οποίο φαίνεται ότι παίζει το ρόλο του με τη μορφή του RNA. Η απώλεια ή η απενεργοποίηση του αλληλίου μητρικής προέλευσης –το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες είναι το λειτουργικό– έχει βρεθεί να συσχετίζεται με

διάφορους όγκους, όπως αυτός του Wilms. Η *de novo* ενεργοποίησή του σε κάποιους όγκους καθώς επίσης και η απενεργοποίησή του σε άλλους όγκους, υποδηλώνουν ότι το γονίδιο αυτό μπορεί να έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

1.3.1.4 Gli1

Οι πρωτεΐνες Gli- Gli1, Gli2 και Gli3- είναι οι εκτελεστές (effectors) του Hedgehog (Hh) μονοπατιού και παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της διαφοροποίησης, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην σχηματομόρφωση διαφόρων τύπων κυττάρων και ιστών κατά την ανάπτυξη του εμβρύου ¹¹⁸. Ειδικότερα οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ενεργοποιούν ή μπλοκάρουν την μεταγραφή γονιδίων με το να δεσμεύονται στον υποκινητή γονιδίων-στόχων του Gli και να αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο μεταγραφής.

Το ανθρώπινο Gli1 είναι σημαντικό ογκογονίδιο και κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή (activator) της μεταγραφής ^{119, 120}. Όμως έχει βρεθεί πως το N-άκρο του Gli1 μέσω συμπλόκων histone deacetylase, μπορεί να δράσει και σαν καταστολέας της μεταγραφής. Πολλές πρωτεΐνες όπως οι Sp1, USF1, USF2, και Twist εμπλέκονται στην ρύθμιση του Gli1 εκκινητή ¹²¹⁻¹²³. Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου ποντικού η έκφραση του Gli1 ανιχνεύεται στο εντερικό μεσόδερμα, στον κοιλιακό νευρικό σωλήνα, στην επενδυματική στιβάδα του νωτιαίου μυελού, τον πρόσθιο εγκέφαλο, τον μεσεγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα, και σε θέσεις σχηματισμού ενδοχονδρικού οστού ¹²⁴⁻¹²⁶. Κάποια από τα downstream γονίδια-στόχους του ανθρώπινου Gli1 είναι κυτταρικοί ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, όπως η κυκλίνη D2 και η πλακοσφαιρίνη αντίστοιχα ¹²⁷.

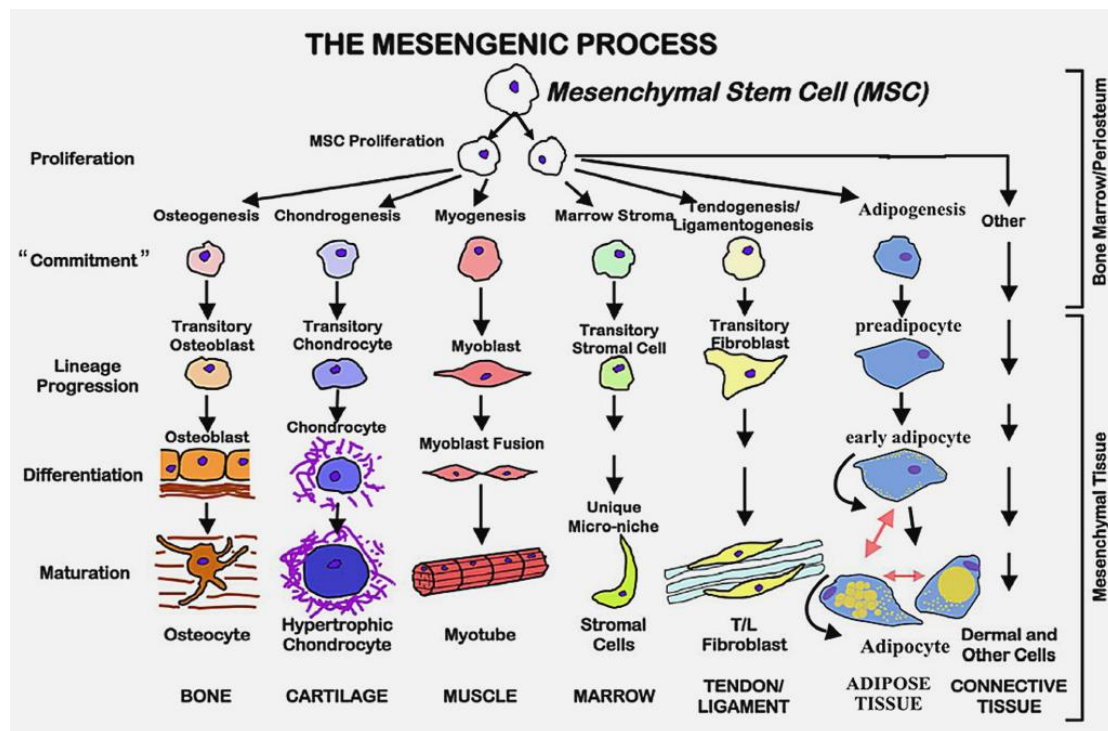
Πρόσφατα βρέθηκε πως η CRD-BP/IMP1 σταθεροποιεί το Gli1 mRNA που είναι απευθείας στόχος του Wnt μονοπατιού και έτσι ρυθμίζει το μεταγραφικό αποτέλεσμα του Hh μονοπατιού ¹²⁸.

2. ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα MSC είναι από τις πιο γνωστές ομάδες ενήλικων βλαστοκυττάρων μαζί με τα HSC. Ο Friedenstein και οι συνεργάτες του, γύρω στο 1970, ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την απομόνωση ινοβλαστικών κυττάρων από τον BM ¹²⁹. Η ιδιότητα τους να προσκολλούνται σε πλαστικές επιφάνειες χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση τους και παρατηρήθηκε η ικανότητα τους για οστεογένεση. Μετέπειτα έρευνες και άλλων εργαστηρίων απέδειξαν πως αυτά τα οστεογονικά κύτταρα ήταν ικανά για διαφοροποίηση προς ποικίλους τύπους κυττάρων του συνδετικού ιστού σε επίπεδο κλώνων^{130, 131}. Τα αποτελέσματα αυτά επικύρωσαν την ύπαρξη των MSC- ιδέα που είχε προταθεί για πρώτη φορά από τον Caplan¹³². Συνεπώς, τα MSC τυπικά ορίζονται ως ινοβλαστικού τύπου κύτταρα που προσκολλούνται σε πλαστική επιφάνεια και διαφοροποιούνται *in vitro* προς οστεοβλάστες, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, τουλάχιστον¹³³.

Η κύρια πηγή των MSC είναι ο μυελός των οστών (Bone Marrow, BM) όπου αλληλεπιδρούν με τα HSC και υποστηρίζουν την ωρίμανση και διαφοροποίηση τους. Πληθώρα εργασιών όμως, έχουν αναφέρει την απομόνωση MSC ή κυττάρων τύπου MSC από ιστούς εμβρυικής ή ενήλικης προέλευσης, όπως από τον σκελετικό μυ¹³⁴, από τον λιπώδη ιστό¹³⁵, τον οδοντικό ιστό¹³⁶, το ενδομήτριο¹³⁷, το ομφαλοπλακουντικό αίμα¹³⁸, τον ομφάλιο λώρο, τον πλακούντα, τον αρθρικό υμένα¹³⁹, το καρδιαγγειακό σύστημα, το αμνιακό υγρό¹⁴⁰ καθώς και από εμβρυικό αίμα, ήπαρ, μυελό των οστών και πνεύμονα¹⁴¹. Συνεπώς, φαίνεται πως τα MSC βρίσκονται μέσα στον συνδετικό ιστό των περισσότερων οργάνων, όπως προέβλεπαν αρχικές μελέτες σε έμβρυα κότας¹⁴². Επιπλέον, οι Lindolfo da Silva Meirelles *et al* απομόνωσαν MSC από όλα τα όργανα και τους ιστούς (εγκέφαλος, σπλήνας, συκώτι, νεφρά, οστό, μυς, θύμος αδένας, πάγκρεας) ενός οργανισμού, στην προκειμένη περίπτωση του ποντικού ¹⁴³. Αξίζει να σημειωθεί πως δίδονται οι απόψεις όσον αφορά την παρουσία MSC στο περιφερικό αίμα. Αναμφίβολα,

χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση των MSC για να καταλήξουμε σε ποιο βαθμό η πηγή προέλευσης τους επηρεάζει τις ιδιότητες τους. Αρχικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πληθυσμοί αυτοί δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμοι, κυρίως όσον αφορά την ικανότητα τους για διαφοροποίηση *in vivo*^{144, 145}.



Εικόνα 11. MSC και διαφοροποίηση¹³².

Όπως προαναφέρθηκε τα MSC μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ποικίλα προγονικά κύτταρα του μεσεγχύματος ή άλλου είδους ιστού (Εικόνα 11) παρέχοντας έτσι ένα χρήσιμο εργαλείο στην αναγέννηση των ιστών με κυτταρική θεραπεία¹⁴⁶. Μια άλλη πολύ σημαντική ιδιότητα των MSC κυττάρων είναι η ανοσορυθμιστική τους ικανότητα. Λόγω της περιορισμένης ανοσογονικότητάς τους, τα MSC θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από HLA μη συμβατούς δότες, για να θεραπεύσουν ανοσολογικά επαγόμενες ασθένειες.

Πως ορίζεται λοιπόν ένα MSC;

Το 2006, η Διεθνής Κοινότητα Κυτταρικής Θεραπείας έκρινε απαραίτητο τον ορισμό των MSC για να υπάρχει ένα κοινό υπόβαθρο για τις μελέτες που διεξάγονται διεθνώς πάνω σε αυτά τα κύτταρα¹³³. Ως εκ τούτου MSC θεωρούνται τα κύτταρα με τα εξής χαρακτηριστικά:

- α. την ικανότητα για προσκόλληση στο πλαστικό,
- β. την έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων και
- γ. την ικανότητα για πολυδύναμη διαφοροποίηση.

Ο ορισμός των MSC βασίζεται στις αναλύσεις *in vitro* αναπτυγμένων κυτταρικών πληθυσμών. Παρόλα τα τόσα χρόνια που ερευνάται ο πληθυσμός αυτός, λίγα γνωρίζουμε για τα *in vivo* χαρακτηριστικά του¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί έως τώρα δεν υπάρχει ένας μοναδικός δείκτης που να τα χαρακτηρίζει.

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

2.1.1 Μόρια Επιφανείας

Όπως προαναφέρθηκε, τα MSC είναι μία ομάδα κυττάρων για την οποία δεν έχει βρεθεί ακόμα ένας μοναδικός επιφανειακός δείκτης για να την χαρακτηρίσει. Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από τη συνδυασμένη έκφραση καθώς και την απουσία έκφρασης ποικίλων μορίων επιφανείας κυρίως του συμπλέγματος διαφοροποίησης (cluster of differentiation, CD). Τα ανθρώπινα MSC πρέπει να είναι θετικά για CD105, CD73 και CD90 και αρνητικά για CD45, CD11b ή CD14, CD19 και για το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας II (Major Histocompatibility Complex, MHCII). Τα ποντικίσια MSC χαρακτηρίζονται από την έκφραση των επιφανειακών μορίων CD44, CD29 και Sca-1. Όσον αφορά τη σημασία της έκφρασης του CD73 και

CD105, μορίων απαραίτητων για τον χαρακτηρισμό των ανθρώπινων MSC, είναι διφορούμενη για τον χαρακτηρισμό των ποντικής MSC. Επιπλέον οι αρνητικοί δείκτες είναι κοινοί εκτός από τον CD19, του οποίου η έκφραση δεν έχει εξετασθεί στο ποντίκι¹³³.

2.1.1.1 CD105

Το CD105 ή αλλιώς ενδογλίνη (endoglin) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας τύπου I. Ανήκει στην πρωτεϊνική οικογένεια zona pellucida (ZP). Αποτελείται από ένα μεγάλο ενδοκυττάριο τμήμα (561 αμινοξέων), ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό (transmembrane) κομμάτι και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα (47 αμινοξέων) πλούσιο σε σερίνες και θρεονίνες, το οποίο είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένο. Συνήθως συναντάται ως ένα δισουλφιδικά ενωμένο ομοδιμερές των 180-kDa¹⁵⁰. Αποτελεί μέρος του συμπλέγματος των υποδοχέων του TGF-β. Πιο συγκεκριμένα είναι βοηθητικός υποδοχέας του TGF-β υποδοχέα τύπου I και II. Συνεπώς είναι πιθανό να εμπλέκεται στην δέσμευση μορίων όπως ο TGF-β1, TGF-β3, Ακτιβίνη- A, η Οστεο-μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (bone morphogenetic protein-2 ,BMP-2) και BMP-7¹⁵¹⁻¹⁵³.

Εκτός από το ρόλο της στο TGF-β μονοπάτι, η CD105 έχει και άλλους ρόλους. Ένας από αυτούς είναι στη κυτταροσκελετική οργάνωση η οποία επηρεάζει άμεσα την μορφολογία καθώς και την μετανάστευση του κυττάρου. Πιθανότατα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την Arg-Gly-Asp (RGD) πεπτιδική αλληλουχία που φέρει, η οποία είναι περιοχή αναγνώρισης πολλαπλών πρωτεϊνών προσκολλησεως στο εξωκυττάριο υλικό¹⁵⁴.

Το ανθρώπινο γονίδιο της CD105 (*ENG*) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 9q34ter, είναι επικρατές αυτοσωμικό και είναι μεταλλαγμένο στην κληρονομούμενη αιμορραγική τελαγγειεκτασία. Επιπλέον, ποντίκια που δεν εκφράζουν την CD105 πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης λόγω

βλαβών στην αγγειογένεση, μιας και η CD105 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και στα πολλαπλασιαζόμενα επιθηλιακά κύτταρα των αγγείων¹⁵¹.

2.1.1.2 CD73

Η 5'-έξωνουκλεοτιδάση/ CD73 είναι ένα εξωκυττάριο ένζυμο, ευρείας έκφρασης, με πολλές λειτουργίες¹⁵⁵. Οι λειτουργίες του χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: σε αυτές που έχουν να κάνουν με την ενζυμική του δράση και σε αυτές που είναι ανεξάρτητες από αυτήν.

Η CD73 ως ένζυμο συμμετέχει στην κατάλυση της αποφωσφοριλίωσης της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine monophosphate, AMP) καθώς και άλλων μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων. Με αυτή τη λειτουργία η CD73 συμμετέχει στην ανάκτηση πουρινών, που μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με διευκολυνόμενη διάχυση, για την παροχή του κυττάρου με πρόδρομες ουσίες για τον μεταβολισμό καθώς και για την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Η ιδιότητα αυτή συναντάται κυρίως σε ιστούς με υψηλά επίπεδα απόπτωσης, όπως στον θύμο αδένα, στον σπλήνα, και στον μυελό των οστών. Επιπλέον η CD73 είναι βασικός ρυθμιστής της προ-φλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους δράσης των πουρινών στον εξωκυττάριο χώρο. Η ρύθμιση αυτή γίνεται μέσω των πουρινικών υποδοχέων, μιας και το ATP προσδένεται σε υποδοχείς με προ-φλεγμονώδη δράση, ενώ η αδενοσίνη συνδέεται με τους υποδοχείς τύπου P1 που είναι αντιφλεγμονώδους δράσης και ελέγχουν μόρια και μηχανισμούς που συμμετέχουν στην έξοδο των λευκοκυττάρων από τα αγγεία¹⁵⁶.

Ένας άλλος πολύ σημαντικός ρόλος της CD73, όπως και πολλών άλλων GPI προσδεμένων μορίων είναι η ενεργοποίηση των T κυττάρων. Στην προκειμένη περίπτωση, το εξωκυττάριο τμήμα της CD73 λειτουργεί ως συνυποδοχέας του CD3/TCR συμπλέγματος ενισχύοντας έτσι τα σήματα ενεργοποίησης των T κυττάρων.

Τέλος, ο λιγότερο μελετημένος ρόλος της CD73 είναι σαν μόριο προσκόλλησης. Κάποια αρχικά πειράματα στα κοτόπουλα έδειξαν πως η CD73 αναγνωρίζει και προσδένεται στην λαμινίνη και την φιμπρονεκτίνη, όμως πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα για την επαλήθευση αυτής της λειτουργίας.

4.1.1.3 CD90

Η Thy-1 ή CD90 είναι μια N-γλυκοζιλιωμένη GPI πρωτεΐνη επιφανείας με ένα V-ομοιάζων τμήμα ανοσοσφαιρίνης και μέγεθος 25–37 kDa. Το κυρίως μέρος της Thy-1 των τρωκτικών αποτελείται από 111 α.α. και είναι γλυκοζιλιωμένο σε 3 περιοχές, σε αντίθεση με την ανθρώπινη πρωτεΐνη που είναι γλυκοζιλιωμένη σε 2 μόνο περιοχές. Είναι μια από τις πιο γλυκοζιλιωμένες πρωτεΐνες επιφανείας με τους υδατάνθρακες (carbohydrates, CHO) να αποτελούν το 30% της μοριακής της μάζας. Η σύσταση των CHO ποικίλει σημαντικά ανάμεσα σε διάφορους ιστούς του ίδιου ζώου, καθώς και μεταξύ κυττάρων της ίδιας σειράς κατά την οντογένεση/εξέλιξη τους¹⁵⁷.

Αρχικά ανακαλύφθηκε ως θυμοκυτταρικό αντιγόνο, με περίπου 1 εκατομμύριο αντίγραφα ανά κύτταρο, που καλύπτει το 20% της επιφάνειάς τους. Η Thy-1 εκφράζεται στα εγκεφαλικά κύτταρα και στους ινοβλάστες όλων των ειδών που έχουν μελετηθεί έως σήμερα. Στο ποντίκι, η Thy-1 έχει βρεθεί σε διάφορα κύτταρα, όπως στα περιφερικά Τ κύτταρα, στους μυοβλάστες, στα επιδερμικά κύτταρα και στα κερατινοκύτταρα¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Στον άνθρωπο εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και από τα κύτταρα του λείου μυός. Επιπλέον εκφράζεται σε ένα υποσύνολο CD34+ BM κυττάρων, καθώς και από τα αιμοποιητικά κύτταρα που προέρχονται από το αίμα ομφάλιου λώρου και από το εμβρυικό ήπαρ¹⁶¹. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως η έκφραση της Thy-1 στον εγκέφαλο ρυθμίζεται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης, δηλαδή η έκφραση της στον νεογνικό εγκέφαλο είναι πολύ χαμηλή σε σχέση με την έκφραση της στον ενήλικο εγκέφαλο^{162, 163}. Πιο συγκεκριμένα κατά τις πρώτες

εβδομάδες της μεταγεννητικής ανάπτυξης, τα επίπεδα της Thy-1 αυξάνονται δραματικά, παράλληλα με την ιστολογική και φυσιολογική ωρίμανση του εγκεφάλου.

Η CD90 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των T κυττάρων, αλλά έχει και εκτενή μη ανοσολογική δράση. Εμπλέκεται στην αναστολή των νευρικών απολήξεων (neurite outgrowth) και στην ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και της απόπτωσης. Επιπλέον μπορεί να λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας στον καρκίνο των ωοθηκών, αλλά από την άλλη να προωθεί την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων και του μελανώματος. Τέλος, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την μετανάστευση των ινοβλαστών. Όλες μαζί αυτές οι λειτουργίες υποδηλώνουν πως η CD90 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων αλλά και ανάμεσα στα κύτταρα και στην εξωκυττάρια ουσία. Τέλος, παίζει σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα του κυττάρου. Συνεπώς η σηματοδότηση μέσω της Thy-1 έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στην απόκριση του ιστού στην βλάβη καθώς και στην ογκογένεση. Το πώς ακριβώς γίνεται η σηματοδότηση όμως δεν είναι τελείως γνωστό, αλλά έως τώρα δημοσιεύσεις έχουν δείξει πως η Thy-1 αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες $\beta 1$ και $\beta 3$ ¹⁶¹.

2.1.1.4 CD29

Η ιντεγκρίνη $\beta 1$ ή αλλιώς CD29, ανήκει στην οικογένεια των ιντεγκρινών. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει ετεροδιμερικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς που αποτελούνται από μια α και μια β υπομονάδα^{164, 165}. Στα θηλαστικά υπάρχουν 18 διαφορετικές α και 8 β υπομονάδες που μπορούν να δημιουργήσουν 24 διαφορετικούς υποδοχείς ιντεγκρίνης. Οι υποδοχείς αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο κυρίως στην κυτταρική προσκόλληση, τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, όσο και σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η ομοιόσταση, η αναγέννηση (επιδιόρθωση) ιστών, η ανοσολογική απάντηση και η μετάσταση καρκινικών κυττάρων.

Τα μόρια CD29 προσδένονται με μόρια του εξωκυττάριου χώρου. Κάποιες από αυτές αναγνωρίζουν το κολλαγόνο και την λαμινίνη, άλλες την φιμπρονεκτίνη, την βιμπρονεκτίνη και την tenascin C. Επιπλέον, κάποιες υπομονάδες από τους υποδοχείς ιντεγκρίνης β1 αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς υποδοχείς όπως ο VCAM-1 και ο MadCAM-1.

Περίληπτικά ο τρόπος δράσης της CD29 πρωτεΐνης έχει ως εξής: όταν ένας συνδέτης (ligand) προσδεθεί στην εξωκυττάρια πλευρά της τότε η κυτταροπλασματική ουρά της ιντεγκρίνης συνδέεται με τον κυτταροσκελετό, μέσω άλλων συνδεδεμένων μορίων, και ενεργοποιεί διάφορες ενδοκυττάρια οδούς σηματοδότησης. Έλλειψη της ιντεγκρίνης β1 συσχετίζεται με μειωμένη ενεργοποίηση του Erk και FAK, και με μειωμένη έκφραση της λαμινίνης-1, Fgfr-3 και κυκλίνης D1, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι β1ιντεγκρίνες εμπλέκονται σε πολλά σημαντικά μονοπάτια.

2.1.1.5 CD44

Η CD44 είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες, καθώς λειτουργούν ως φορείς της απόκρισης του κυττάρου στο μικροπεριβάλλον του¹⁶⁶. Έτσι εμπλέκονται στην ρύθμιση της ανάπτυξης, της επιβίωσης, της διαφοροποίησης και της κινητικότητας του κυττάρου. Η σημαντικότητα της οικογενείας αυτής φαίνεται από το γεγονός ότι η αλλοιωμένη ή τροποποιημένη έκφραση τους συνδέεται με την εμφάνιση πολλών παθολογικών καταστάσεων.

Οι CD44 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται όλες από ένα υψηλά συντηρημένο γονίδιο και αποτελούνται από 4 περιοχές: την αμινοτελική δομή και τον 'βλάστη'(stem) που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο, μια διαμεμβρανική περιοχή και την κυτταροπλασματική ουρά. Η ετερογένεια των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας είναι εν μέρει αποτέλεσμα μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων που διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες ανάπτυξης. Επιπλέον τα

CD44 μετάγραφα υφίστανται διαφορικό μάτισμα που κυρίως επηρεάζει τη δομή της CD44 πρωτεΐνης στην εξωκυττάρια περιοχή, που βρίσκεται πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης. Τα πρώτα πέντε μη μεταβλητά εξώνια του CD44 γονιδίου κωδικοποιούν την αμινο-τελική, σφαιρική (globular) πρωτεϊνική δομή. Η δομή αυτή περιλαμβάνει μοτίβα προσδέσεως για διάφορα στοιχεία του εξωκυττάριου χώρου, όπως το υαλουρονικό οξύ, το κολλαγόνο, την λαμινίνη και την φιμπρονεκτίνη, που προάγουν τις αλληλεπιδράσεις που εξαρτώνται από το υλικό του εξωκυττάριου χώρου. Ο 'βλάστης'- που βρίσκεται ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και στην σφαιρική πρωτεϊνική δομή- ποικίλει σε μέγεθος από 46 έως 381 αμινοξέα και περιλαμβάνει περιοχές με πρωτεολυτική δράση. Η διαμεμβρανική περιοχή παίζει ρόλο στην δημιουργία των CD44 ολιγομερών και στην σύνδεση των CD44 πρωτεϊνών με τα λιπιδικά στρώματα. Τέλος, μέρη της κυτταροπλασματικής ουράς και οι ενδοκυττάριοι πρωτεϊνικοί συνεργάτες του CD44 παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για τον υποκυττάριο εντοπισμό.

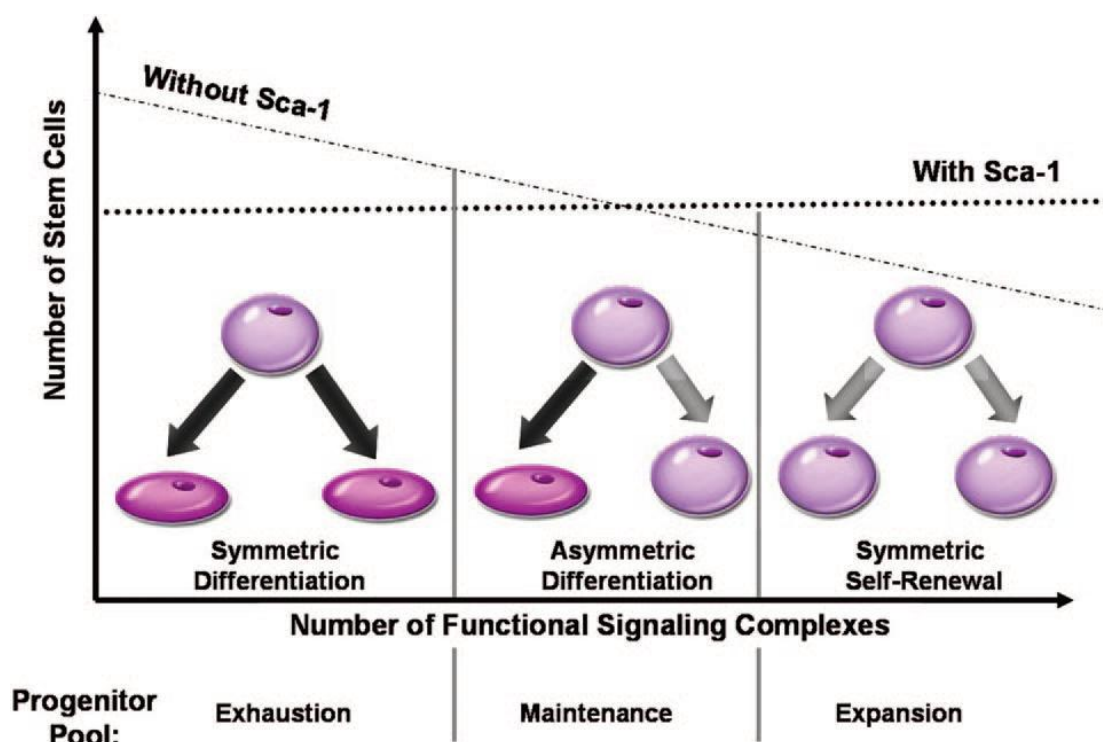
Τρεις είναι οι βασικές τους λειτουργίες και χωρίζονται: α) ως υποδοχείς του εξωκυττάριου χώρου, των μεταλλοπρωτεϊνών (matrix metalloproteinase, MMP) και κάποιων αυξητικών παραγόντων, β) ως συνυποδοχείς για τον έλεγχο της ενεργοποίησης των υποδοχέων άλλων αυξητικών παραγόντων και γ) ως διοργανωτές του άξονα του σκελετού της ακτίνης.

2.1.1.6 Sca-1

Το Sca-1 είναι μια 18 kDa ποντικίσια πρωτεΐνη προσδεμένη σε μόρια γλυκοζυλ-φωσφατιδυλινοσιτόλης της Ly-6 γονιδιακής οικογένειας¹⁶⁷. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από τουλάχιστον 18 ομόλογα γονίδια στενά συνδεδεμένα, που εδράζονται στο χρωμόσωμα 15 και παρουσιάζουν μεγαλύτερη από 80% ομοιότητα στην αλληλουχία τους με το Sca-1. Οι πρωτεΐνες έχουν 2 ή 3 προεξέχοντα δάκτυλα πλούσια σε κυστεΐνη και εντοπίζονται στα λιπιδικά στρώματα της μεμβράνης. Οι περιοχές αυτές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση με το

να αποκλείουν ή να συγκεντρώνουν μόρια-κλειδιά για τον έλεγχο κυτταρικών σημάτων, είτε δια μέσω υποδοχέων ή άλλων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Το Sca-1 αρχικά ανακαλύφθηκε σαν ένα αντιγόνο αυξημένο στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Είναι ευρέως γνωστό ως χαρακτηριστικός δείκτης των HSC. Η έκφραση του εντοπίζεται και σε άλλα βλαστικά και προγονικά κύτταρα διαφόρων ιστών (Εικόνα 12) .



Εικόνα 12 . Ο ρόλος του Sca-1 στα βλαστοκύτταρα. Τα βλαστοκύτταρα που δεν εκφράζουν Sca-1 σε κανονικά επίπεδα τείνουν να διαφοροποιούνται αντί να αυτοανανεώνονται με αποτέλεσμα την εξάντληση της αποθήκης των βλαστοκυττάρων¹⁶⁷.

Οι περισσότερες πληροφορίες που έχουμε για το Sca-1 είναι από πειράματα σε Sca-1^{-/-} ποντίκια¹⁶⁸. Τα T κύτταρα αυτών των ποντικών είχαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και τα σπληνοκύτταρα τους δημιούργησαν πιο κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Επίσης, οι ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των T κυττάρων ήταν διαφοροποιημένες. Πιο εντυπωσιακή όμως ήταν η παρατήρηση ότι τα ποντίκια σε μεγάλη ηλικία είχαν οστεοπόρωση λόγω αλλοίωσης του οστικού υλικού. Οι

αλλοιώσεις αυτές οφείλονται στην μειωμένη δημιουργία οστού λόγω ενδοκυτταρικών ανωμαλιών, αλλά και στη μειωμένη ικανότητα των μεταλλαγμένων στρωματικών κυττάρων του BM να υποστηρίξουν την οστική διαφοροποίηση, καθώς και στην ελαττωματική παραγωγή εξωκυττάρου υλικού από τους οστεοβλάστες.

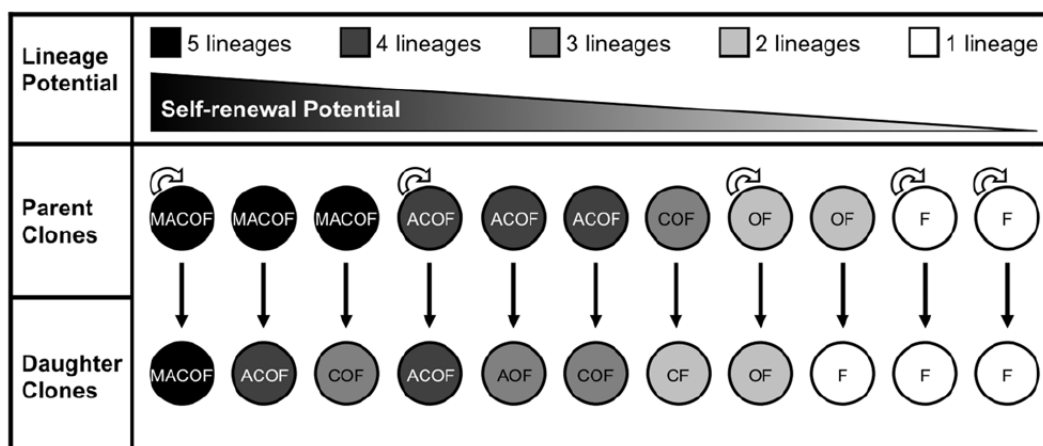
Το Sca-1 είναι μια GPI-συνδεδεμένη πρωτεΐνη χωρίς έναν μοναδικό συνδέτη. Πιθανά λοιπόν το Sca-1 να δρα ως συν-ρυθμιστής των λιπιδικών στρωμάτων της κυτταρικής μεμβράνης, προσδιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την μοίρα του βλαστοκυττάρου. Σε πειραματικά μοντέλα διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το Sca-1, είναι πιο δεκτικά σε σήματα διαφοροποίησης παρά σε αυτοδιπλασιασμού (self renewal), γεγονός που σταδιακά πιθανώς να εξαντλεί την αποθήκη βλαστοκυττάρων. Επιπλέον, η υπερέκφραση του Sca-1 παίζει ρόλο στον προσδιορισμό της διαφοροποίησης των HSC. Δηλαδή τα HSC που υπερεκφράζουν Sca-1 έχουν την τάση να διαφοροποιούνται προς την μυελοειδή (myeloid) κατεύθυνση με γρηγορότερο ρυθμό και όχι προς ερυθροειδή (erythroid) κύτταρα.

Από τα παραπάνω συνεπώς προκύπτει πως ο πιθανός ρόλος του Sca-1 ως μόριο αγγελιοφόρος είναι να αλλάζει την ισορροπία του κυττάρου μεταξύ αυτοδιπλασιασμού και διαφοροποίησης, ειδικά σε περιόδους στρες, όπως είναι αυτή της ανανέωσης των ιστών, τροποποιώντας την διάδοση του σήματος. Αυτό πιθανά να συμβαίνει με αδύναμες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, με το να απομονώνει ή να εμποδίζει μόρια-κλειδιά να καταλήξουν στους υποδοχείς τους ή να προωθεί την δημιουργία συμπλέγματος λιπιδιακών στρωμάτων. Τέλος, πρόσφατες δημοσιεύσεις προτείνουν ότι το Sca-1 λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της Src οικογένειας κινασών.

2.1.2 Διαφοροποίηση

Τα MSC διαφοροποιούνται κυρίως προς τρεις τύπους κυττάρων του μεσοδέρματος: λιποκύτταρα, οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα. Έχουν όμως την

ικανότητα να δώσουν και άλλα είδη κυττάρων, όπως μυϊκά προγονικά κύτταρα που ανήκουν και αυτά στο μεσόδερμα. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τα MSC τείνουν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα που μοιάζουν ιστολογικά με αυτά του εκτοδέρματος και του ενδοδέρματος, αλλά η λειτουργική διαφοροποίησή τους σε μη-μεσοδερμικά κύτταρα είναι ακόμα αμφιλεγόμενη. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα μη-μεσοδερμικής διαφοροποίησης είναι η διαφοροποίησή τους προς νευρικά καθώς και επιθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα 13. Ιεραρχικό σχήμα MSC διαφοροποίησης και πολυδυναμικότητας¹⁶⁹

Οι Sarugaser, R *et al* μελέτησαν μητρικούς κλώνους MSC σε σύγκριση με τους θυγατρικούς τους κλώνους, όσον αφορά τις ικανότητες διαφοροποίησης και πολυδυναμικότητας ¹⁶⁹. Έτσι δημιουργήθηκε ένα νέο ιεραρχικό σχήμα για τις ιδιότητες των MSC (τον αυτοδιπλασιασμό και την διαφοροποίησή τους). Κατά τη θεωρία αυτή ένα πολυδύναμο αυτοδιπλασιαζόμενο MSC με κάθε διαίρεση του παράγει πιο περιορισμένου δυναμικού αυτοδιπλασιαζόμενα προγονικά κύτταρα, τα οποία σταδιακά χάνουν την δυνατότητα τους για διαφοροποίηση έως ότου καταλήξουν σε κύτταρα τελικής διαφοροποίησης, όπως είναι οι ινοβλάστες (Εικόνα 13). Η ικανότητα των MSC για διαφοροποίηση προς πολλαπλούς τύπους κυττάρων μειώνεται σταδιακά με την εξής σειρά: μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα,

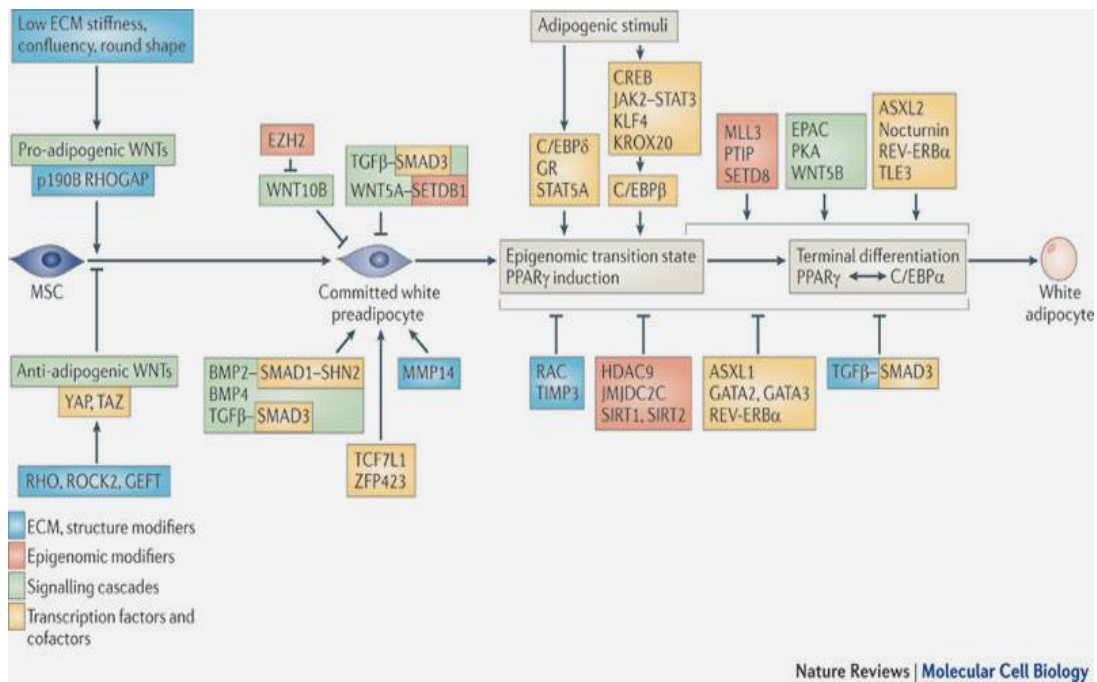
οστεοκύτταρα και τέλος ινοβλάστες, απεικονίζοντας έτσι τον ιεραρχικό μηχανισμό καθορισμού της πορείας/ τύχης των MSC. Βέβαια τα μοριακά σήματα που ελέγχουν αυτόν τον μηχανισμό επιλογής δεν είναι ακόμα γνωστά.

Επίσης δεν είναι εντελώς γνωστά τα σήματα που ελέγχουν την διαφοροποίηση των MSC. Μια προσέγγιση για να καθιερώσουμε βασίμα διαδοχικά κριτήρια, ώστε να προσδιορίζουμε την διαφοροποίηση τους, είναι να συγκρίνουμε τα μοριακά γεγονότα που συνοδεύουν την επαγωγή της διαφοροποίησης των MSC με αυτά που συμβαίνουν κατά τη διαφοροποίηση τους *in vivo*. Τα χαρακτηριστικά αυτά παρατίθενται περιληπτικά παρακάτω.

2.1.2.1 Λιπογένεση

Για πολλά χρόνια ο λιπώδης ιστός θεωρούνταν μια αδρανής μάζα αποθήκευσης ενέργειας με επωφελείς ιδιότητες: α) ικανότητα για μόνωση και β) μηχανική υποστήριξη άλλων σημαντικών δομών. Με την ανακάλυψη της λεπτίνης το 1994, άρχισε να διευρύνεται ο ρόλος των λιποκυττάρων και σήμερα θεωρούνται βασικοί ρυθμιστές της ομοιόστασης ολόκληρης της σωματικής ενέργειας.

Η λιπογένεση είναι η διαδικασία διαφοροποίησης των MSC σε ώριμα λιποκύτταρα (Εικόνα 14) και ρυθμίζεται από δυο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες: την CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) και το PPAR γ ¹⁷⁰⁻¹⁷³. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δυο βασικά στάδια. Το αρχικό στάδιο είναι η συγκέντρωση και ο πολλαπλασιασμός των προ-λιποκυττάρων και το δεύτερο στάδιο είναι η διαφοροποίηση των τελευταίων σε λιποκύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της συσσώρευσης λίπους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στα MSC του ποντικού, η υπογλυκαιμία επιταχύνει την λιπογονική επαγωγή της συσσώρευσης λίπους, με την ενεργοποίηση του PI3K/Akt μονοπατιού μέσω της ERK1/2-, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του PPAR γ .



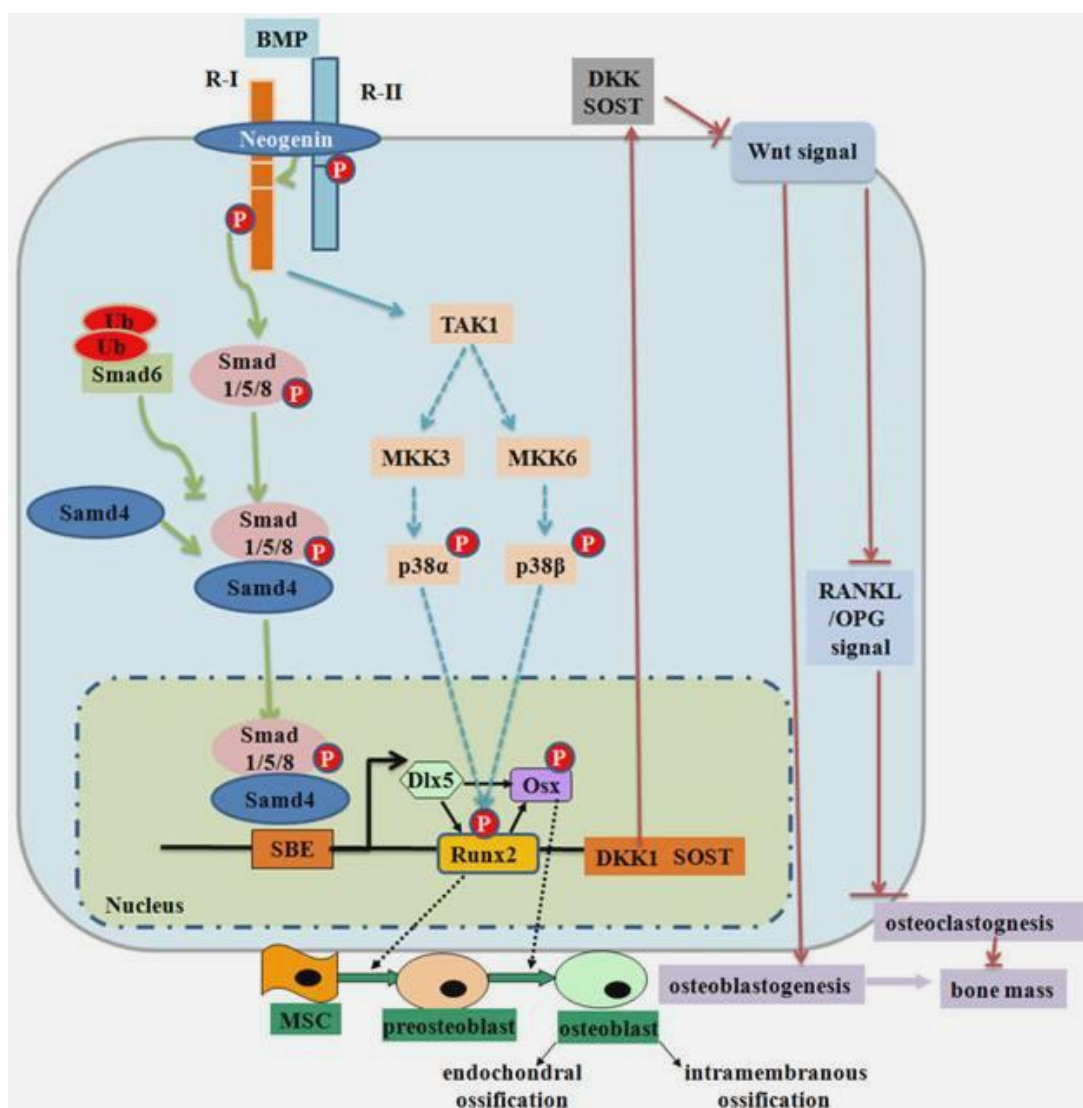
Εικόνα 14. MSC και λιπογένεση. Συνοπτική απεικόνιση των παραγόντων που εμπλέκονται στα στάδια διαφοροποίησης των MSC προς λιποκύτταρα.

Επιπλέον, ποικίλες μελέτες υποστηρίζουν έντονα ότι η οστεογονική και η λιπογονική διαφοροποίηση των MSC είναι ρυθμιζόμενη αντιστρόφως ανάλογα^{174, 175}. Για παράδειγμα, η αυξημένη διαφοροποίηση των MSC προς την λιπώδη σειρά που παρατηρείται στο BM οστεοπορωτικών ασθενών συμβαίνει εις βάρος της διαφοροποίησης προς την οστική σειρά. Σε συμφωνία με αυτή την δημοσίευση, οι Rickard *et al.* έδειξαν πως διακοπτόμενη (intermittent) έκθεση των MSC στην παραθυροειδή ορμόνη (parathyroid hormone, PTH) ή σε μόρια αγωνιστές του PTH1 υποδοχέα αναστέλλουν την έκφραση λιπιδιακών φαινοτυπικών δεικτών, καθώς και την δημιουργία λιποκυττάρων, ενώ συγχρόνως διεγείρουν την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης- σημαντικού οστεοβλαστικού δείκτη¹⁷⁶.

2.1.2.2 Οστεογένεση/ Χονδρογένεση

Το σκελετικό σύστημα αναπτύσσεται από το μεσέγχυμα, το οποίο προέρχεται από τη μεσοδερμική βλαστική στιβάδα και τη νευρική ακρολοφία. Μερικά οστά, όπως τα πλατέα οστά του κρανίου, υφίστανται υμενογενή οστέωση, δηλαδή τα MSC

μετατρέπονται κατευθείαν σε οστεοβλάστες. Στα περισσότερα οστά όμως, όπως τα μακρά οστά των άκρων, το μεσέγχυμα πυκνώνει και σχηματίζει τις χόνδρινες καταβολές των οστών. Σε αυτές τις χόνδρινες καταβολές εμφανίζονται πυρήνες οστέωσης και τα οστά οστεοποιούνται σταδιακά με χονδρογενή οστέωση^{173, 177}.



Εικόνα 15. Μονοπάτια χονδρογένεσης και οστεογένεσης των MSC

Τα πολλαπλασιαζόμενα χονδρο-προγονικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση του κολλαγόνου I (collagen type I, Col I). Κατά την πυκνωση των προ-χονδριακών κυττάρων καταστέλλουν την έκφραση του Col I και ξεκινούν να εκφράζουν κολλαγόνο II (collagen type II, Col II), που είναι η κυρίαρχη μορφή

κολλαγόνου των διαφοροποιημένων χονδροκυττάρων. Τα ώριμα χονδροκύτταρα εκφράζουν Col II, Col IX, Col XI, μια πρωτεογλυκάνη που κυρίως αποτελεί τον χόνδρο (aggrecan) και μια συνδετική πρωτεΐνη. Η σύνθεση του Col X καθώς και η παράλληλη μείωση των επιπέδων έκφρασης του Col II αποτελούν τα βασικά στάδια οστεογένεσης. Στον υπερτροφικό χόνδρο παρατηρείται περιορισμένη έκφραση του Col X και της ικανότητας του για δέσμευση ασβεστίου. Έτσι, το Col X παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταμόρφωση του χόνδρου σε οστό.

Μοριακές αναλύσεις των διαφορετικών σταδίων διαφοροποίησης των MSC κατά τη διάρκεια της χονδρογένεσης έχουν επιφέρει ποικίλα αποτελέσματα και το γονιδιακό μοτίβο έκφρασης που έχει παρατηρηθεί εξαρτάται από τις συνθήκες επαγωγής. Τα πιο σημαντικά μονοπάτια επικοινωνίας που παίζουν ρόλο στην επαγωγή της χονδρογενετικής διαφοροποίησης προέρχονται από την σηματοδότηση των TGF- β και BMP. Με την ενεργοποίηση των Smad μεταγραφικών παραγόντων, τα μονοπάτια αυτά αποτελούν ένα μέρος των πολλαπλών σημάτων που συνεισφέρουν στην ρύθμιση της δέσμευσης (commitment) των MSC σε χονδροκύτταρα.

Η οστεογένεση των MSC εξαρτάται από τις BMP πρωτεΐνες, παράγοντες παρόντες στην αφαλατωμένη μήτρα οστού (demineralized bone matrix), ικανοί να ενεργοποιήσουν την παραγωγή οστού (Εικόνα 15). Διάφορα μέλη της BMP οικογένειας πρωτεϊνών, όπως οι BMP-2, -4, -6, -7, και -9, είναι θετικοί επαγωγείς της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MSC. Από τις οστεογονικές BMP πρωτεΐνες, η BMP-6 είναι ο πιο ισχυρός επαγωγέας διαφοροποίησης των ανθρώπινων MSC, μιας και όταν οι BMP χρησιμοποιούνται σε συνδυασμούς, μόνο όταν σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται η BMP-6 προκαλείται ισχυρή οστέωση. Στο μεταγραφικό επίπεδο, οι μηχανισμοί που κυβερνούν την BMP-6 επαγόμενη διαφοροποίηση των MSC είναι παρόμοιοι με αυτούς της εμβρυικής σκελετικής ανάπτυξης. Δρώντας μέσω της Smad κυτταρικής οδού, οι BMP διεγείρουν την έκφραση των Id πρωτεϊνών:

Msx2, και Dlx5 που μαζί με το Runx2 και το Osterix αποτελούν τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην οστεογένεση.

Το Msx2 είναι ενεργό στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης και ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων. Το Dlx5 προάγει την διαφοροποίηση επάγοντας την έκφραση του Runx2, που επάγει την αρχική δέσμευση των MSC προς οστεοχονδρογονικά κύτταρα, και του Osterix που ορίζει την τελική διαφοροποίηση τους.

2.1.3 Ανοσορυθμιστικές ικανότητες

Ακόμα μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα των MSC είναι η ικανότητα τους να διαφεύγουν της ανοσοποιητικής αναγνώρισης και να αναστέλλουν την ανοσολογική απάντηση¹⁷⁸⁻¹⁸⁴.

Περίληπτικά, οι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους μη ειδικούς μηχανισμούς και στους ειδικούς μηχανισμούς. Στους μη ειδικούς μηχανισμούς έχουμε την βασική αντίδραση του οργανισμού σε κάθε είδους λοιμώξεων. Ο ειδικός μηχανισμός χαρακτηρίζεται από μνήμη και δυνατότητα διάκρισης των αβλαβών κυττάρων από τα κατεστραμμένα ή μεταλλαγμένα κύτταρα. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο βασικές ομάδες κυττάρων, τα κύτταρα της λεμφικής σειράς (λεμφοκύτταρα) και τα κύτταρα της μυελικής σειράς. Τα λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν τα B-κύτταρα, τα T-κύτταρα, καθώς επίσης και τα φυσικά φονικά κύτταρα (ή μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα, Natural Killer Cells, NK). Τα κύτταρα της μυελικής σειράς αποτελούνται από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα δένδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DC), τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα. Οι δράσεις των παραπάνω κυττάρων ποικίλουν και κάθε ομάδα είναι εξειδικευμένη να αντιμετωπίζει διαφορετικές απειλές (Εικόνα 16).

Τα MSC θα μπορούσαν να προσφέρουν θεραπεία σε πολλές ανοσολογικά-ρυθμιζόμενες ασθένειες (immune-mediated disorders), όπως η νόσος του

μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (graft versus host disease, GVHD), αλλά και σε αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και σε μεταμοσχεύσεις οργάνων. Παρόλα αυτά, ποικίλα διαθέσιμα στοιχεία υποδηλώνουν πως το αποτέλεσμα της ανοσολογικής θεραπείας/ απόκρισης (immunological outcome) που περιλαμβάνει *in vivo* χορήγηση MSC δεν είναι παντελώς προβλέψιμη, μιας και η έκβαση της εξαρτάται από απρόβλεπτους παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος (φλεγμονή) οι οποίοι διαμορφώνουν την λειτουργία των MSC.

Είναι ευρέως γνωστό πως η ανοσοκαταστολή από τα MSC προκαλείται μέσω κυτταρικής επαφής (cell to cell contact). Αρκετές όμως δημοσιεύσεις αποδεικνύουν πως προκαλείται επίσης και από διαλυτούς παράγοντες. Κάποιοι από τους παράγοντες που μέχρι τώρα έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο είναι οι εξής: IL-1b, TGF-b1, ηπατικός αυξητικός παράγοντας (hepatocyte growth factor, HGF), προσταγλανδίνη E2 (PGE2), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), leukemia inhibitory factor (LIF), Αυξητικός παράγοντας όμοιος της ινσουλίνης (insulin-like growth factor, IGF). Οι περισσότεροι από αυτούς κυρίως εκκρίνονται εφόσον τα MSC έχουν καλλιεργηθεί πρωτίστως με λεμφοκύτταρα. Για παράδειγμα, υπερκείμενο καλλιέργειας MSC δεν επέφερε καμία διαφορά στην ενεργοποίηση των T κυττάρων (σε αντίθεση με την καταστολή που προκάλεσε στα ενεργοποιημένα B κύτταρα). Με την προσθήκη όμως στο υπερκείμενο ιντερλευκίνης 1β , εκκρινόμενος παράγοντας των μονοκυττάρων, ενεργοποιήθηκε η κατασταλτική δράση των MSC προς τα T κύτταρα. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ως συνέπεια της διακοπής της κυτταρικής διαίρεσης συμβαίνει στα B λεμφοκύτταρα, στα φυσικά φονικά (natural killer cells, NK), στα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DC), καθώς και στα T κύτταρα.

2.1.3.1 T-λεμφοκύτταρα

Η ομάδα των κυττάρων που έχει διερευνηθεί περισσότερο για την αλληλεπίδραση της με τα MSC είναι αυτή των T κυττάρων. Υποθέσεις για τις

ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των BM- MSC, όπως η πρόκληση ανοχής σε αλλογενή ή ξενογενή μεταμόσχευση γίνονταν από το 1984. Όμως, για πρώτη φορά, το 2002 αποδείχθηκε ότι τα ανθρώπινα MSC μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων καθώς και να παρατείνουν, σε πρωτεύοντα (primates), τον χρόνο ζωής δερματικού μοσχεύματος μετά από *in vivo* χορήγηση MSC¹⁸⁵.

Αναφορικά, τα T λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε υποομάδες ανάλογα με τη δράση τους. Τα T λεμφοκύτταρα που οι υποδοχείς τους δεσμεύονται με αντιγόνα που τους παρουσιάζονται από την MHC τάξη I ωριμάζουν σε κυτταροτοξικά T κύτταρα (T_C : T cytotoxic cells,), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία του μορίου CD8 στην επιφάνειά τους και φονεύουν με άμεσο μηχανισμό θανάτωσης κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ενδοκυττάρια παθογόνα ή εκφράζουν ξένα ή νεοπλασματικά αντιγόνα¹⁸⁶.

Τα T λεμφοκύτταρα των οποίων οι υποδοχείς συνδέονται με αντιγόνα σε σύμπλοκο με μόρια MHC τάξης II ωριμάζουν σε βοηθητικά T κύτταρα (T_H : T helper cells) και σε T κύτταρα φλεγμονής. Κατά κανόνα φέρουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD4 και απαντούν στον αντιγονικό ερεθισμό με έκκριση κυτταροκινών, που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση τόσο των ίδιων των T λεμφοκυττάρων όσο και των B λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, για την πλήρη εξάλειψη των παθογόνων από τον οργανισμό.

Τα βοηθητικά T κύτταρα υποδιαιρούνται σε δυο βασικές υποομάδες, γνωστές ως T_H1 και T_H2 , οι οποίες διαφέρουν ως προς τις λειτουργίες των κυττάρων τους και διαχωρίζονται με βάση τις κυτταροκίνες που αυτά εκκρίνουν. Μια τρίτη υποομάδα βοηθητικών T λεμφοκυττάρων που περιγράφηκε τελευταία είναι γνωστή ως T_H17 (Romagnani, 2006). Τέλος, μια άλλη υποομάδα των T λεμφοκυττάρων είναι τα T ρυθμιστικά κύτταρα (T_{REGS}). Πρόκειται για $CD4^+CD25^{high} Foxp3^+$ T λεμφοκύτταρα, τα οποία πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, τις χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, τον καρκίνο καθώς και τις αλλεργίες.

Τα MSC επηρεάζουν αρκετές λειτουργίες των Τ κυττάρων, με πιο γνωστή αυτή του πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων $CD4^+$ T_H και των $CD8^+$ T_C . Ανεξάρτητα λοιπόν από τις πειραματικές μεθόδους που έχουν αναλυθεί σε διάφορες δημοσιεύσεις, η παρουσία MSC σε καλλιέργειες ανθρώπινων και ποντικών Τ κυττάρων, αναστέλλει την επαγωγή πολλαπλασιασμού από μιτογόνα ή αντιγονικά σήματα. Τα Τ κύτταρα σταματούν την κυτταρική τους διαίρεση στην φάση G0–G1 του κύκλου, λόγω αναστολής της έκφρασης της κυκλίνης D2, καθώς και λόγω της επαγωγικής αύξησης του από κυκλίνη-εξαρτώμενου αναστολέα κινασών p27kip1. Τα MSC δεν επάγουν απόπτωση^{184, 187-191}.

Επιπλέον, τα MSC μπορούν να παρατείνουν την επιβίωση των μη ενεργοποιημένων (unstimulated) Τ κυττάρων με τη διάσωση των λεμφοκυττάρων από την επαγόμενη ενεργοποίηση κυτταρικού θανάτου μέσω της καταστολής του Fas υποδοχέα αλλά και του Fas προσδέτη στα Τ κύτταρα, καθώς και με την αναστολή ενδογενών πρωτεασών που παίζουν ρόλο στο κυτταρικό θάνατο¹⁹². Άλλες εργασίες έδειξαν ότι τα MSC μειώνουν την παραγωγή IFN- γ από τα $CD4^+$ T_H1 κύτταρα και της έκκριση της IL-17 από τα $CD4^+$ T_H17 , ενώ αυξάνουν την έκκριση της IL-4 από τα $CD4^+$ T_H2 κύτταρα^{193, 194}. Επίσης, το κυτταρολυτικό δυναμικό των CTL μπορεί να μειωθεί σημαντικά από τα MSC¹⁹⁵.

Πρόσφατα, πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση των MSC στη λειτουργία των T_{REGS} , ενός πληθυσμού κυττάρων που παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της περιφερειακής ανοχής (tolerance) και στην αναστολή των προ-φλεγμονωδών ανοσολογικών απαντήσεων. Πολλές από αυτές έχουν δείξει πως η παρουσία MSC σε καλλιέργεια ενεργοποιημένων περιφερικών μονοκυττάρων προάγει την αύξηση λειτουργικών $CD4^+$ $CD25^{high}$ Foxp3⁺ Tregs^{196, 197}.

2.1.3.2 B-λεμφοκύτταρα

Τα B-λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα του οργανισμού που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των αντισωμάτων (ανοσοσφαιρινών). Τα B κύτταρα είτε κυκλοφορούν

στο αίμα είτε είναι εγκατεστημένα στα όργανα του λεμφικού συστήματος. Κάθε B-λεμφοκύτταρο φέρει στην επιφάνειά του έναν υποδοχέα (BCR) που είναι εξειδικευμένος για τη σύνδεσή με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Η τυχαία αναδιάταξη του γενετικού υλικού των B-λεμφοκυττάρων είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία διαφορετικής ειδικότητας υποδοχέα σε κάθε B-λεμφοκύτταρο. Όταν το B-λεμφοκύτταρο έλθει σε επαφή με το αντίστοιχο αντιγόνο, δίνεται το έναυσμα για τη διαφοροποίηση του σε πλασματοκύτταρο, που είναι ικανό να εκκρίνει ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulin, Ig). Αρχικά, παράγονται ανοσοσφαιρίνες της τάξης IgM, που συνιστούν την πρωτογενή απάντηση στο αντιγόνο. Παράλληλα από τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων προκύπτουν και τα αντίστοιχα κύτταρα μνήμης. Στη δευτερογενή ανοσολογική απόκριση παράγονται ανοσοσφαιρίνες της τάξης IgG. Στις επιφάνειες των βλεννογόνων, όπου ο οργανισμός έρχεται σε άμεση επαφή με τα μικρόβια του περιβάλλοντος, τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν μια ειδική μορφή ανοσοσφαιρίνης, την IgA.

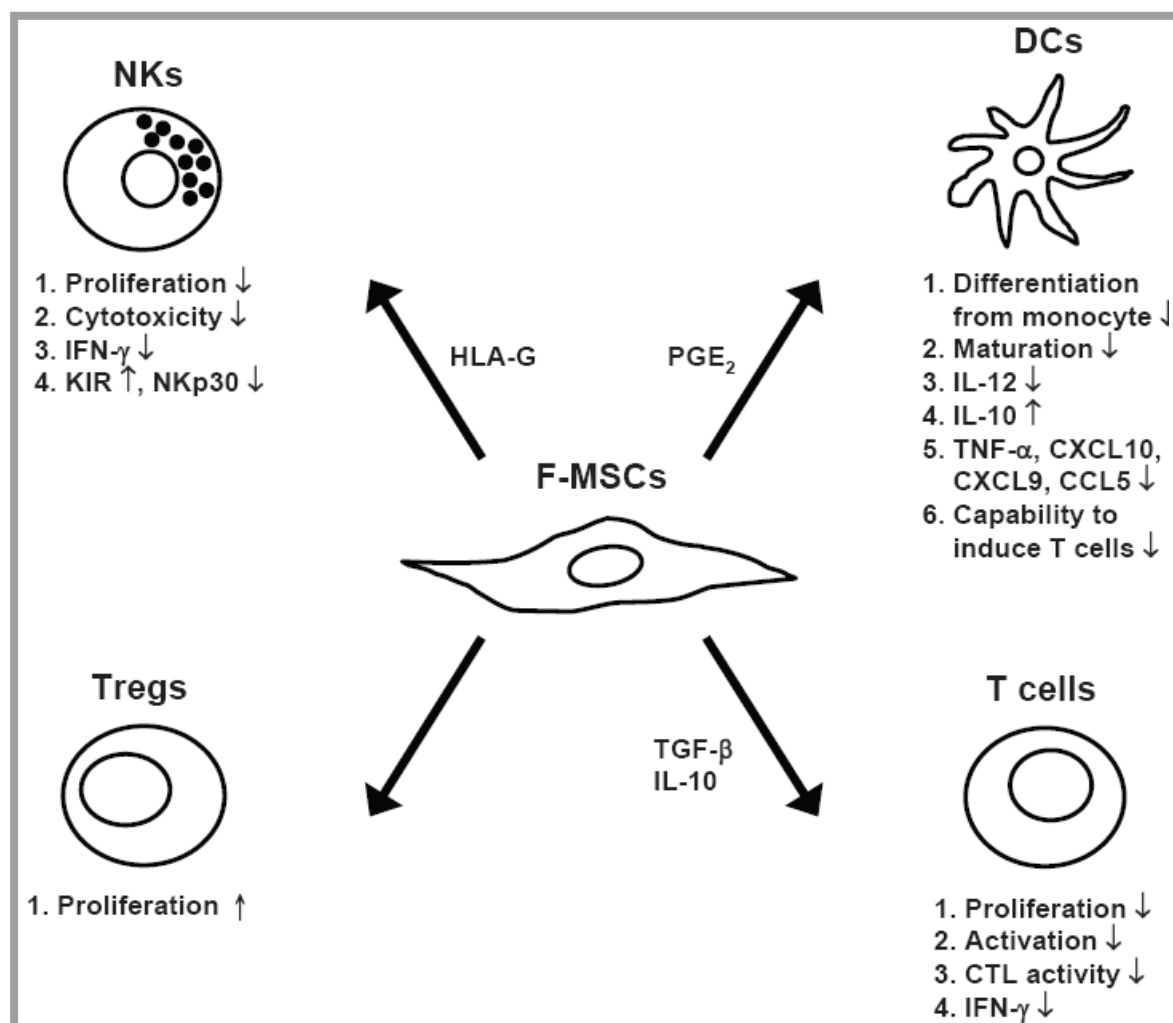
Στην προκειμένη περίπτωση¹⁹⁸, τα MSC εμποδίζουν την διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, ανακόπτοντας την παραγωγή IgM, IgG και IgA. Επιπλέον τα MSC αναστέλλουν την έκφραση σημαντικών χημειοτακτικών υποδοχέων (CXCR4, CXCR5, and CCR7), αποτρέποντας την CXCR4 και CXCR5 χημειοταξία των B κυττάρων. Καμία αλλαγή δεν έχει παρατηρηθεί έως τώρα στην έκφραση μορίων υπεύθυνων για αντιγονοπαρουσίαση (CD40, CD86, HLA-DR) στα ενεργοποιημένα B κύτταρα καθώς και στην παραγωγή κυτταροκινών (TNF, IFN- γ IL-4, IL-10) των ενεργοποιητικών B κυττάρων (B-cell effector).

2.1.3.3 Φυσικά Φονικά Κύτταρα

Τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural killer cells, NK), είναι τα πιο σημαντικά δραστικά κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Είναι γνωστά για την κυτταρολυτική τους δράση εναντίον όγκων και κυττάρων μολυσμένων από ιούς. Η λειτουργία τους ρυθμίζεται από υποδοχείς επιφανείας που μεταδίδουν σήματα ενεργοποίησης ή

αναστολής. Οι κύριοι ανασταλτικοί υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια KIR (:killer immunoglobulin-like receptors). Υπό κανονικές συνθήκες η έκφραση του αριθμού των HLA I μορίων στην επιφάνεια ενός αυτόλογου κυττάρου είναι ανάλογη αυτού των KIR, και η αλληλεπίδραση των τελευταίων με τα NK προλαμβάνει την δράση τους. Άπαξ και μειωθεί ο αριθμός των HLA-I μορίων σε ένα μολυσμένο ή καρκινικό κύτταρο τα NK ενεργοποιούνται, και τα κύτταρα-στόχοι γίνονται ευάλωτα στην καταστροφή τους από τα NK. Διάφοροι υποδοχείς και συνυποδοχείς (NKp46, NKp30, NKp44) είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση- μετά την επαφή με τα κύτταρα-στόχους των NK, την παραγωγή κυτταροκινών και την κυτταροτοξική τους δράση^{199, 200}.

Τα MSC παρεμποδίζουν τον επαγόμενο από IL-2 ή IL-15 πολλαπλασιασμό των NK, που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Επιπλέον, φαίνεται ότι επηρεάζουν αρνητικά και τον πολλαπλασιασμό των ήδη ενεργοποιημένων NK ²⁰¹. Από την άλλη μεριά, ο ρόλος των MSC στην κυτταροτοξική δράση των NK είναι αμφιλεγόμενος μιας και διαφορετικά κύτταρα-στόχοι είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητα στην λύση τους από τα NK. Συγκεκριμένα, τα MSC έχουν ανασταλτική δράση στην κυτταροτοξική δράση των NK εναντίον HLA-I θετικών κυττάρων, ενώ δεν υπάρχει διαφορά στην κυτταροτοξική δράση των IL-2 ενεργοποιημένων NK εναντίον των HLA-I αρνητικών κυττάρων στόχων. Επιπλέον, κάποιες δημοσιεύσεις αναφέρουν την επαγωγή της παραγωγής κυτταροκινών (TNF-α, IFN-γ) από τα NK κατά την επώαση τους με τα MSC ενώ άλλες αναφέρουν μείωση στην παραγωγή κυτοκινών (TNF-α, IFN-γ, IL-10) των IL-2-ενεργοποιημένων NK. Μιας και τα MSC εκφράζουν χαμηλά επίπεδα HLA-I μορίων, πολλοί ερευνητές διερεύνησαν την επίδραση των NK στα MSC, και όπως ήταν αναμενόμενο βρήκαν πως τα MSC, αυτόλογα και αλλογενή, είναι επιρρεπή στην λύση των IL-2 ενεργοποιημένων NK²⁰²⁻²⁰⁴. Ποικίλες αλληλεπιδράσεις υποδοχέων και προσδετών συμμετέχουν στο φαινόμενο αυτό. Είναι άξιο αναφοράς, ότι η επαγωγή της έκφρασης του HLA-I στα MSC, μετά την επώαση τους με IFN-γ, παρεμπόδιζε την λύση τους από τα NK.



Εικόνα 16. Ανοσορυθμιστικές ιδιότητες των MSC¹⁷⁹.

2.1.3.4 Δενδριτικά Κύτταρα

Τα Δενδριτικά Κύτταρα (Dendritic cells, DC) προέρχονται από τα μονοκύτταρα και είναι ισχυρά αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα που ενσωματώνουν, μεταφέρουν και παρουσιάζουν αντιγόνα στα παρθένα T-κύτταρα (naïve T-cells), γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Αυτοί οι σημαντικοί ρυθμιστές της ανοσίας παρουσιάζουν μια εξαιρετική δυνατότητα: να επάγουν αποκρίσεις των T κυττάρων καθώς και να εκκρίνουν πληθώρα κυτταροκινών. Το στάδιο της διαφοροποίησης των DC μπορεί να καθορίσει εάν τα λεμφοκύτταρα στόχοι τους- συνήθως τα T κύτταρα- θα αποκριθούν ως δραστικά κύτταρα ή με μια πιο ανοσορυθμιστική δράση²⁰⁵.

Μελέτες έχουν δείξει πως τα MSC αναστέλλουν την διεγερτική ικανότητα των DC, υποστηρίζοντας την δημιουργία ενός πιο ανοχικού (tolerogenic) DC πληθυσμού^{206, 207}. Τα MSC εμποδίζουν την διαφοροποίηση των PBMC σε DC, αναστέλλουν την ενδοκυττάρωση καθώς και την παραγωγή IL-12 από αυτά. Επιπλέον, κατά την παρουσία των MSC περιορίζεται η διαφοροποίηση των CD14⁺ μονοκυττάρων σε DC. Έτσι, ενώ τα μονοκύτταρα διατηρούν την υψηλή έκφραση του CD14, δεν αυξάνουν τα CD1a, HLA-DR και συνδιεγερτικά μόρια, οπότε δεν μπορούν να επάγουν την δράση των T δραστικών (effector) κυττάρων. Επίσης τα MSC καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων από τα DC, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης του πολλαπλασιασμού τους. Επίσης μειώνουν το ποσοστό των ανώριμων CD4⁺ που θα διαφοροποιηθούν σε Th1 κύτταρα ενώ προάγουν τις Th2 αποκρίσεις. Τα MSC μειώνουν την έκκριση του TNF-α που οδηγεί στην μείωση του αριθμού των Th1 που παράγουν IFN-γ.

Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen presenting cells, APC) που έχουν δημιουργηθεί παρουσία MSC εκφράζουν χαμηλά επίπεδα IL-12, TNF-α και MHC-II και υψηλά επίπεδα IL-1b και IL-10, ανεξάρτητα από την έκφραση του CD86-πρωτεΐνης χαρακτηριστικής των APC με συνδιεγερτικό ρόλο για την ενεργοποίηση και επιβίωση των T κυττάρων²⁰⁸. Συν τοις άλλοις τα MSC επάγουν τα DC να εκκρίνουν IL-10, κάτι που ευνοεί τα Th2 κύτταρα που παράγουν IL-4 και τα Tregs¹⁸⁴. Τέλος, τα MSC εμποδίζουν την έκκριση κυτταροκινών από τα ενεργοποιημένα DC.

Συνοπτικά, τα MSC αναστέλλουν την διαφοροποίηση, την παραγωγή κυτταροκινών και την διεγερτική ικανότητα των DC. Συνεπώς, η αναστολή των T-κυττάρων δεν είναι αποκλειστικό αποτέλεσμα της ανοσοκατασταλτικής δράσης των MSC προς τα T κύτταρα, αλλά μπορεί να οφείλεται και στην αναχαίτιση της ωρίμανσης των DC, καθώς και στην ενεργοποίηση και στο αντιγονοπαρουσιαστικό δυναμικό τους.

Εν κατακλείδι, τα MSC μεταβάλλουν το εκκριτικό προφίλ των DC, των T και των NK για να επιφέρουν έναν πιο αντιφλεγμονώδη και ανοχικό φαινότυπο. Άξιο αναφοράς είναι πως κάτω από κάποιες συνθήκες τα ίδια τα MSC μπορούν να δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, καθώς και το γεγονός ότι η προφλεγμονώδης κυτταροκίνη IFN- γ , ενισχύει την ανοσορυθμιστική δράση των MSC αντί να την μειώνει. Αυτός προφανώς είναι ένας από τους λόγους που τα MSC είναι αποτελεσματικά σε πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες όπως αυτή της GVHD, όπου η παραγωγή IFN- γ δυνητικά προωθεί την δράση των MSC και συνεπώς μειώνει τον πολλαπλασιασμό των ίδιων των παραγωγών IFN- γ , δηλαδή των T και των NK κυττάρων.

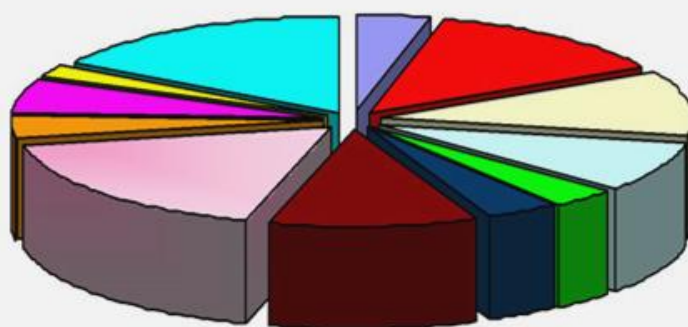
2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα MSC μελετούνται εκτενώς για τις πιθανές θεραπευτικές τους ιδιότητες σε πολλές προ-κλινικές και κλινικές μελέτες. Αρχικά οι μελέτες αυτές επικεντρώθηκαν στην χρήση βλαστικών κυττάρων για την αναγέννηση και επιδιόρθωση ιστών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες δημοσιεύσεις επιβεβαιώνουν πως οι ευεργετικές επιδράσεις τους ως επί το πλείστον προέρχονται από την έκκριση των ανοσοτροποποιητικών και κυτταροπροστατευτικών παραγόντων που συμβάλλουν στην αναγέννηση των τραυματισμένων ιστών.

Η τρέχουσα υπόθεση είναι ότι οι παρακρινείς παράγοντες που εκκρίνονται από τα MSC παρέχουν ένα προστατευτικό μικροπεριβάλλον και προάγουν την ενεργοποίηση των τοπικών προγονικών κυττάρων που εδρεύουν σε διάφορους ιστούς. Αυτό εξηγεί γιατί ευνοϊκά αποτελέσματα μπορούν να παρατηρηθούν ακόμη και σε απουσία των MSC από τις θέσεις τραύματος.

Η συστηματική έγχυση MSC έχει αποδειχθεί ευεργετική σε διάφορα προ-κλινικά μοντέλα της οξείας πνευμονικής βλάβης, έμφραγμα του μυοκαρδίου, διαβήτη, καθώς και στη νεφρική και ηπατική ανεπάρκεια^{209, 210}.

Clinical trials of MSCs are classified by disease types (by 2011/12/13 n=206)



■ Cancer 8	■ Heart Disease 27	■ Liver Disease 22
■ Diabetes and related complication 18	■ Crohn's Disease 7	
■ Multiple Sclerosis 8	■ Graft Versus Host Disease 22	
■ Bone/cartilage Disease 37	■ Spinal Cord Injury 7	
■ Brain Disease 12	■ Lung Disease 5	■ Other 33

Εικόνα 17. Κλινικές δοκιμές που διεξάγονται με MSC²⁰⁹

Έως σήμερα, σύμφωνα με την ιστοσελίδα <http://www.clinicaltrials.gov>, διεξάγονται 347 (εν εξελίξει και ολοκληρωμένες) κλινικές μελέτες παγκοσμίως (Εικόνα 17). Οι περισσότερες από αυτές είναι μελέτες Φάσης I (μελέτες ασφάλειας), Φάσης II (μελέτες αποτελεσματικότητας σε ανθρώπους ασθενείς), ή ένα μείγμα Φάσης II/ III. Μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτές τις δοκιμές βρίσκονται στη Φάση III (συγκρίνοντας μια νεότερη θεραπεία σε σχέση με την επικρατέστερη θεραπεία) ή στη Φάσης II/ III. Σε γενικές γραμμές, τα MSC φαίνεται να είναι καλά ανεκτά, με τις περισσότερες μελέτες να αναφέρουν έλλειψη αρνητικών επιπτώσεων σε μεσοπρόθεσμο επίπεδο, αν και μερικές έδειξαν ήπια και παροδική δράση στην περιοχή της έγχυσης²¹¹. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές κλινικές δοκιμές που έχουν ολοκληρωθεί και απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της έγχυσης MSC για ασθένειες συμπεριλαμβανομένης την οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, κίρρωση του ήπατος, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic

lateral sclerosis, ALS) και στην επίθεση μοσχεύματος κατά ξενιστή (graft versus host disease, GVHD). Σε μερικές από τις πιο σημαντικές ασθένειες καθώς και σε αυτές που ο αριθμός των κλινικών δοκιμών υπερισχύει θα αναφερθούμε παρακάτω.

2.2.1 Κατάγματα και δυσπλασίες οστών/ χόνδρου

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) είναι μια εκφυλιστική νόσος του συνδετικού ιστού και εξελίσσεται είτε με την ηλικία ή αναπτύσσεται σε νεαρούς αθλητές μετά από αθλητικό τραυματισμό. Ο αρθρικός χόνδρος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος σε βλάβες και έχει χαμηλό δυναμικό αναγέννησης λόγω της απουσίας αγγείωσης εντός του ιστού. Η OA είναι μια προοδευτική ασθένεια με αποτέλεσμα την αύξηση του πόνου, της δυσλειτουργίας και τελικά την αναπηρία. Αν και χειρουργικές και φαρμακευτικές παρεμβάσεις είναι σήμερα διαθέσιμες για τη θεραπεία της OA, η αποκατάσταση της κανονικής λειτουργίας του χόνδρου είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Επιπλέον, οι περισσότερες φαρμακευτικές αγωγές στοχεύουν στην βελτίωση της κινητικότητας ή την μείωση του πόνου και μερικές φορές επιβαρύνουν την πορεία της νόσου.

Τα MSC αποτελούν τα ιδανικά κύτταρα για χρήση στην κυτταρική θεραπεία της OA όχι μόνο γιατί είναι οι προγονοί των χονδροκυττάρων αλλά επίσης εξαιτίας των αντιφλεγμονώδων και ανοσοκασταλτικών ιδιοτήτων τους. Επιπλέον, με την έκκριση των διάφορων βιοενεργών τα MSC μπορεί να προστατεύσουν τον χόνδρο από περαιτέρω καταστροφή και να διευκολύνουν την αναγέννηση των υπόλοιπων προγονικών κυττάρων *in situ*. Τα κύτταρα που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα σε κλινικές δοκιμές είναι αυτόλογα ή αλλογενή από το BM. Δύο νέες κλινικές δοκιμές διεξάγονται που θα χρησιμοποιούν MSC από το AT ή το UC.

Αρκετοί κλινικοί ερευνητές, οι οποίοι αναφέρονται αναλυτικά στο άρθρο επισκόπησης των Gupta P.K., et al. από διάφορα μέρη του κόσμου έχουν ασχοληθεί με την ασφάλεια και την θεραπευτική επίδραση των BM-MSC σε ασθενείς με OA²¹². Ειδικότερα, οι Nejadnik και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν μελέτη για να συγκρίνουν την κλινική έκβαση των ασθενών που έλαβαν πρώτης γενιάς αυτόλογη

μεταμόσχευση χονδροκυττάρων ($n = 36$) με εκείνη των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με αυτόλογα BM-MSC ($n = 36$). Υπήρξε σημαντική βελτίωση στην ποιότητα της ζωής των ασθενών μετά την επισκευή του χόνδρου και από τις δύο ομάδες και δεν υπήρχε καμία διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων. Υπήρχε όμως μεγαλύτερη βελτίωση σε σχέση με το χρόνο στην ομάδα που έλαβε BM-MSC²¹³. Σε μελέτη φάσης I/ II που διεξήχθη από την Osiris Therapeutics, A.E. (Columbia, MD, USA), η ενδοαρθρική χορήγηση αλλογενών MSC σε ασθενείς με ΟΑ μείωσε σημαντικά τον πόνο σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Η επίδραση αυτή παρατηρήθηκε σε ασθενείς που λάμβαναν χαμηλή δόση (50 εκατομμύρια κύτταρα), καθώς και σε ασθενείς που λάμβαναν υψηλή δόση (150 εκατομμύρια κύτταρα) MSC. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αρκετά ενθαρρυντικά για την πιθανή κλινική χρήση των MSC στην ΟΑ.

Μια άλλη εξίσου σημαντική κατηγορία κλινικών δοκιμών είναι η αντιμετώπιση καταγμάτων των οστών με τη χρήση αυτόλογων MSC από BM. Τα κύτταρα αυτά έχουν διαφοροποιηθεί *in vitro* σε οστικά κύτταρα και στη συνέχεια έχουν μεταμοσχευθεί. Τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών δεν είναι ακόμα γνωστά. Επιπλέον, εμβρυικά MSC μεταμοσχεύθηκαν επιτυχώς κατά την κύηση σε ασθενή με μορφή II ατελούς οστεογένεσης (*osteogenesis imperfecta*)²¹⁴. Το παιδί είναι σήμερα 5 ετών, υγιές, χωρίς πόνους ή άλλα συμπτώματα. Είναι λίγο πιο μικρόσωμο από το μέσο όρο της ηλικίας του.

2.2.2 Καρδιακές Παθήσεις

Παρά την εξέλιξη των θεραπευτικών επιλογών, η ισχαιμική καρδιοπάθεια και η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια παραμένουν οι πιο σημαντικές αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Η κυτταρική θεραπεία λοιπόν θα μπορούσε να αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη αγωγή για την καρδιαγγειακή νόσο.

Αυτόλογα βλαστικά κύτταρα από το μυελό των οστών και από περιφερικό αίμα χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της βαριάς ισχαιμικής καρδιακής ανεπάρκειας. Οι ομάδες κυττάρων που έχουν μεταμοσχευθεί είναι MSC από BM, CD34⁺ κύτταρα (που συλλέχτηκαν με λευκαφαίρεση) από περιφερικό αίμα εμπλουτισμένο με προ-κινητοποίηση του δότη με κατάλληλη κυτταροκίνη (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF) και τέλος, σκελετικοί μυοβλάστες. Τα κύτταρα δίδονται με εμβολιασμό είτε στις στεφανιαίες αρτηρίες, είτε απευθείας στο μυοκάρδιο.

Οι κλινικές δοκιμές με MSC για τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, σε μια πιλοτική μελέτη, εξήντα εννέα ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή διαδερμική στεφανιαία επέμβαση μέσα σε 12 ώρες μετά την έναρξη του οξέιου εμφράγματος του μυοκαρδίου τυχαιοποιήθηκαν και έλαβαν ενδοστεφανιαία έγχυση αυτόλογων BM-MSC ή αλατούχο διάλυμα. Αρκετές τεχνικές απεικόνισης έδειξαν σημαντικά βελτιωμένη λειτουργία της αριστερής κοιλίας μετά την έγχυση με MSC²¹⁵. Στο άρθρο επισκόπησης των Wang S. et al, συνοψίζονται οι μελέτες που έχουν διεξήχθη έως σήμερα²⁰⁹. Ενώ ένας αριθμός μελετών έδειξαν τα ευεργετικά αποτελέσματα της μεταμόσχευσης των MSC, οι υποκείμενοι μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς. Η βελτίωση της νόσου οφείλεται συνήθως στην αύξηση της αγγειογένεσης του μυοκαρδίου, αλλά και στην δημιουργία νέων κυττάρων του μυοκαρδίου.

2.2.3 Επίθεση μοσχεύματος κατά ξενιστή (GVHD)

Η οξεία GVHD εμφανίζεται μετά από την αλλογενή μεταμόσχευση HSC και σχετίζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα [6-8]. Σήμερα, για την αρχική θεραπεία της οξείας GVHD χρησιμοποιούνται κορτικοστεροειδή. Ωστόσο, η θεραπεία αυτή είναι αποτελεσματική μόνο για κάποιους ασθενείς. Κατά την τελευταία δεκαετία, η ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες των MSC έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για την χρήση τους ενάντια της GVHD. Οι Le Blanc K et al, ήταν οι πρώτοι που έκαναν μεταμόσχευση μερικώς συμβατών (haplo-identical) MSC σε ένα 9 χρόνο αγόρι με

σοβαρή βαθμού ανθεκτικότητα (IV aGVHD) στη θεραπεία του εντέρου και του ήπατος. Βρήκαν ότι η κλινική ανταπόκριση ήταν εντυπωσιακή και ο ασθενής ήταν καλά μετά από 1 έτος²¹⁶. Σε μεταγενέστερη μελέτη από τους Ringdén O *et al*, το 2006 δόθηκαν MSC σε οκτώ ασθενείς με στεροειδή ανθεκτικότητα βαθμού IIIIV GVHD και σε έναν ασθενή με χρόνια GVHD. Η οξεία GVHD εξαφανίστηκε εντελώς σε έξι από τους οκτώ ασθενείς. Πλήρης αποκατάσταση παρατηρήθηκε στο έντερο, στο ήπαρ και στο δέρμα. Το ποσοστό επιβίωσης ήταν σημαντικά μεγαλύτερο συγκριτικά με τους 16 ασθενείς της ομάδας ελέγχου. Πέντε ασθενείς είναι ακόμα ζωντανοί (από 2 μήνες έως 3 χρόνια μετά την μεταμόσχευση)²¹⁷. Η ευεργετική επίδραση της έγχυσης των MSC παρατηρήθηκε σε μία σειρά μελετών όπως αυτές αναφέρονται στο άρθρο ανασκόπησης των Wang S *et al*²⁰⁹. Τα MSC που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μελέτες ήταν αλλογενή, είτε από απολύτως συμβατούς (HLA-identical), μερικώς συμβατούς (haplo-identical) ή μη συμβατούς (HLA mismatched) δότες.

Όλες αυτές οι μελέτες, με ποικίλους αριθμούς ασθενών και διαφορετικούς βαθμούς σοβαρότητας της GVHD, υποδηλώνουν ότι μπορεί να επιτευχθεί μερική ή πλήρης ανταπόκριση σε μια πλειοψηφία ασθενών μετά από έγχυση MSC και ότι τα MSC θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα θεραπεία για την GVHD.

2.2.4 Ηπατικές Ασθένειες

Τα MSC έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της κίρρωσης του ήπατος σε έναν περιορισμένο αριθμό ασθενών. Σε μια μελέτη φάσης I, τέσσερις ασθενείς με κίρρωση (decompensated) έλαβαν αυτόλογη έγχυση MSC μέσω μίας περιφερικής φλέβας. Δεν υπήρξαν παρενέργειες στους ασθενείς κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης και η ποιότητα ζωής των τεσσάρων ασθενών είχε βελτιωθεί σημαντικά μέχρι το τέλος της παρακολούθησης²¹⁸. Σε μία άλλη κλινική δοκιμή φάσης I-II, 8 ασθενείς (4 με ηπατίτιδα B, ένας με ηπατίτιδα C, ένας αλκοολικός, και 2 με κρυπτογενής κίρρωση) με ηπατική νόσο τελικού σταδίου, έλαβαν αυτόλογη έγχυση μεσεγχυματικών κυττάρων. Όλοι οι ασθενείς ανέχτηκαν καλά την θεραπεία και

βελτιώθηκε η ηπατική τους λειτουργία, γεγονός που υποδηλώνει τη σκοπιμότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χρήσης των MSC ως θεραπεία για τη ηπατική νόσο τελικού σταδίου²¹⁹.

2.3 ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η διαδικασία της γήρανσης του οργανισμού, χαρακτηρίζεται από λειτουργική έκπτωση που οφείλεται σε ιστολογικές και βιοχημικές μεταβολές σε ιστούς και συστήματα οργάνων με το πέρασμα του χρόνου. Η μείωση της λειτουργικότητας παραλληλίζεται με τη μείωση της ικανότητας του οργανισμού να ανταποκριθεί σε τραυματισμό ή στρες. Όπως είναι γνωστό, τα βλαστικά κύτταρα εμπλέκονται στην ομοιόσταση καθώς και στην αναγέννηση και την επισκευή πολλών ιστών. Συνεπώς, τίθεται το ερώτημα κατά πόσον τα χαρακτηριστικά της γήρανσης των ιστών εξηγούνται από την μείωση της λειτουργικότητας του ενδογενή πληθυσμού των ενήλικων βλαστικών κυττάρων.

Η άρτια λειτουργία των βλαστικών κυττάρων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα: 1) από την αυτόνομη ρύθμιση του ίδιου του κυττάρου, 2) την ρύθμιση από το τοπικό μικροπεριβάλλον, 3) ρύθμιση από τους τοπικούς/ περιβάλλοντες ιστούς, 4) το συστηματικό περιβάλλον του οργανισμού και, τελικά, 5) το εξωτερικό περιβάλλον. Συνεπώς η μείωση της ομοιόστασης ή της αναγέννησης των ιστών θα μπορούσε να προκύψει από αλλαγές, που σχετίζονται με όλα τα παραπάνω^{5, 220, 221}.

Ειδικότερα, αλλαγές στο τοπικό μικροπεριβάλλον περιλαμβάνουν αλλαγές στην ποσότητα και τη σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας, αλλαγές στις πρωτεΐνες και τα λιπίδια της μεμβράνης κυττάρων που έρχονται σε άμεση επαφή με τα βλαστοκύτταρα, και σε αλλαγές σε διαλυτούς παράγοντες παρακρινής και ενδοκρινής φύσης. Οι συστηματικές αλλαγές περιλαμβάνουν ανοσολογικές και νευρο-

ενδοκρινολογικές αλλαγές, και στην περίπτωση της βλάβης του ιστού ή ασθένειας, μεταβολές των παραγόντων που απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και την φλεγμονώδη απόκριση που συνοδεύει τέτοιες βλάβες. Συνεπώς, ακόμη και στην απουσία σημαντικής γήρανσης των ίδιων των βλαστοκυττάρων, η λειτουργικότητα τους θα μπορούσε να δείχνει σημαντική μείωση σχετιζόμενη με την ηλικία που οφείλεται σε μειώσεις των σημάτων που λαμβάνουν από το μικροπεριβάλλον τους ή από άλλους ιστούς, παράγοντες που διαμορφώνουν την λειτουργία των βλαστικών κυττάρων ή των προγονικών κυττάρων προερχόμενων από αυτά.

Πέρα από τις συστηματικές αλλαγές που συμβαίνουν στον οργανισμό και επηρεάζουν την λειτουργικότητα των βλαστοκυττάρων, υπάρχει και η πλευρά της ενδογενούς γήρανσης των κυττάρων αυτών και της ελλατωματικής απόκρισης στα σήματα που λαμβάνουν. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, παρά την ποικιλία των μηχανισμών επιδιόρθωσης για την πρόληψη τους, βρίσκεται στην κορυφή της ιεραρχίας, και αποτελούν τις πιο θεμελιώδεις και μη αναστρέψιμες αλλαγές τις οποίες ακολουθούν πολλές άλλες.

Τα MSC στον ενήλικα οργανισμό, χρησιμοποιούνται για να του παρέχουν προγονικά κύτταρα για την φυσιολογική ομοιόσταση και την αναδόμηση μετά από τραύμα των ιστών (συνδετικών ιστών και στρώμα). Για παράδειγμα, ο ρόλος των MSC στην φυσιολογική αιμοποίηση καθώς και στην ομοιόσταση του οστού συμβάλλουν στην δημιουργία των οστεοβλαστών και υποστηρίζουν την δημιουργία των οστεοκλαστών μέσω δυο διαφορετικών μονοπατιών. Συνεπώς, η χρήση MSC για την μαζική επιδιόρθωση ορισμένων ιστών κατά την γήρανση, υπερβαίνει κατά πολύ την συνήθη χρήση και τη διαθεσιμότητά τους.

Έως τώρα δεν υπάρχουν μελέτες που να χρησιμοποιούν τα MSC για την πρόληψη της γήρανσης. Για να επιτευχθεί ανακατασκευή των ιστών, κάτι που δεν μπορούν να κάνουν κανονικά οι ίδιοι, θα πρέπει να τους παρέχουμε τα προγονικά αυτά κύτταρα σε επαρκή αριθμό από εξωγενείς πηγές. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να

μιμηθούμε επιλεγμένες αρχές της εμβρυικής ανάπτυξης και να τις χρησιμοποιήσουμε στον ενήλικα οργανισμό.

ΣΚΟΠΟΣ

Η αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών πολυδυναμικότητας αποτελεί ένα σημαντικό αναπάντητο ερώτημα της βιολογίας των βλαστοκυττάρων. Ένας από τους λόγους που θα θέλαμε να απαντήσουμε το ερώτημα αυτό είναι για την ορθή χρήση των βλαστοκυττάρων στην κυτταρική θεραπεία / αναγεννητική ιατρική. Ο κυτταρικός πληθυσμός που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την διερεύνηση των μηχανισμών αυτών είναι τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (embryonic stem cells, ESC). Όμως πολλές μελέτες έχουν δείξει πως λόγω της εμβρυικής προέλευσής τους τα κύτταρα αυτά δεν είναι κατάλληλα για χρήση στον ενήλικο οργανισμό μιας και θα προκαλούσαν ανοσοδιέργεια και τελικά απόρριψη. Ένας άλλος πολύ σημαντικός πληθυσμός- και με τον οποίο ασχολείται αυτή η εργασία- είναι αυτός των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (mesenchymal stem cells, MSC). Λόγω της εύκολης απομόνωσης των κυττάρων αυτών, της ικανότητάς τους για αυτοανανέωση, την διαφοροποίησή τους προς πολλούς διαφορετικούς ιστούς και της χαμηλής ανοσογονικότητάς τους τα MSC αποτελούν τους ιδανικούς υποψήφιους της αναγεννητικής ιατρικής.

Η εργασία αυτή θα μπορούσε να χωριστεί σε τρία διαφορετικά μέρη:

Σκοπός του πρώτου μέρους της εργασίας ήταν η απομόνωση, η καλλιέργεια και η ενδεδειγμένη μελέτη των χαρακτηριστικών των MSC, φαινοτυπικών και λειτουργικών, σε συνάρτηση με την ηλικία, το φύλο και τον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Για την μελέτη αυτών των παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα για δυο βασικούς λόγους: α) για να έχουμε ομοιογένεια στο σύστημα μας και πρόσβαση σε μεγάλο αριθμό δοτών και β) γιατί σχεδόν πάντα πριν τις κλινικές δοκιμές χρησιμοποιούνται προκλινικά μοντέλα ζώων για να επιβεβαιωθούν οι *in vitro* παρατηρήσεις σε οργανισμικό επίπεδο. Συνεπώς θα ήταν μεγάλης σημασίας να ξέρουμε αν τα MSC του ποντικού έχουν παρόμοια συμπεριφορά με τα ανθρώπινα.

Επιπλέον μελετήθηκαν φαινοτυπικά και λειτουργικά ανθρώπινα MSC απομονωμένα απο διαφορετικούς ιστούς (μυελό των οστών, λιπώδη ιστό, ομφάλιο λώρο και ομφαλιοπλακουντικό αίμα) για να εντοπιστούν οι μεταξύ τους ομοιότητες και διαφορές, πληροφορίες ωφέλιμες για την καταλληλότερη επιλογή κυτταρικών πληθυσμών σε πιθανά πρωτόκολλα θεραπείας.

Τέλος διερευνήθηκε η έκφραση εμβρυικών γονιδίων (OCT3/4, SOX2, NANOG, CRD-BP/IMP1, DAZL, TET1/2/3) –που πιθανά συμβάλλουν στην πολυδυναμικότητα των βλαστοκυττάρων- στο ανθρώπινο και στο ποντικίσιο σύστημα, ώστε η μελέτη να είναι συγκριτική.

Μετά από τις παρατηρήσεις για την επιρροή της ηλικίας στην συχνότητα των MSC στο μυελό των ποντικών, στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας αυτής στήθηκε ένα πιλοτικό προκλινικό μοντέλο για κυτταρική θεραπεία με έγχυση MSC σε μεσήλικα ποντίκια (12 μηνών). Η έκβαση της γήρανσης μελετήθηκε σε δυο χρονικά σημεία στην αρχή της γηραιάς ηλικίας (18 μηνών) και προς το ανώτερο τελικό όριο της (24 μήνες). Ειδικότερα μελετήθηκε ο ίδιος ο φαινότυπος και οι ιδιότητες των κυττάρων καθώς και οργανισμικές διαφορές συνυφασμένες με την γήρανση, όπως η οστεοαρθρίτιδα, ο μυοσκελετικός εκφυλισμός κτλ.

Σκοπός του τρίτου μέρους ήταν η διευκρίνιση του ρόλου της CRD-BP/IMP1, μιας ογκο-εμβρυικής πρωτεΐνης που εμπλέκεται σε σημαντικά μονοπάτια εμβρυικής ανάπτυξης, με πειράματα επιλεκτικής παρεμπόδισης, στην πολυδυναμικότητα των MSC και οι πιθανοί μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου αυτού από άλλα εμβρυικά γονίδια, όπως από την TET οικογένεια των απομεθυλασών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΕΘΟΔΟΙ IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

1.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ MSC ΠΟΝΤΙΚΟΥ

1.1.1 Μυελός των Οστών

Όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τα πειραματόζωα είχαν την έγκριση της βιοηθικής επιτροπής του Αγίου Σάββα. Για την απομόνωση των MSC από τον μυελό των οστών (bone marrow, BM) των ποντικών δοκιμάστηκαν ποικίλες προτεινόμενες μέθοδοι που διέφεραν:

- στην αρχική συγκέντρωση των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών (Bone Marrow Mononuclear Cells, BM-MNC) που χρησιμοποιούνται ανά cm²
- στο αρχικό θρεπτικό υλικό απομόνωσης (α-MEM, DMEM, RPMI 1640, IMEM) αλλά και στο είδος (FBS ή/και HS) και τη συγκέντρωση του ορού (10% ή 20% v/v) που χρησιμοποιήθηκαν
- στην επεξεργασία της φιάλης καλλιέργειας με ή χωρίς FCS
- στην απαλοιφή ή όχι του CD45⁺ ή/και CD11b⁺ πληθυσμού των BMMNC
- στη διάρκεια της τρυψινοποίησης.

Το τελικό πρωτόκολλο που υιοθετήθηκε βασίζεται στους Phinney *et.al.* και έχει ως εξής: Μετά την ευθανασία του ποντικού απομονώνεται με έκπλυση RPMI 1640 (Gibco, by Life Technologies Invitrogen, cat. no. 21875-034) με 10% v/v FCS (Biosera Ltd, East Sussex, UK, S1810/500) και 1x αντιβιοτικό (100x Antibiotic-Antimycotic Gibco, by Life Technologies Invitrogen, cat. no. 15240), σε στείρες συνθήκες, ο μυελός από το μηριαίο οστό και το οστό της κνήμης. Καταμετρούνται τα BM-MNC και καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 10⁵ BM-MNC ανά cm² με RPMI 1640 με 20% v/v FCS, 2mM L-glutamine (Gibco, by Life Technologies Invitrogen, cat. no.

25030), 0.1mM 2-Μερκαπτοεθανόλη (Gibco, by Life Technologies Invitrogen, cat. no. 31350-010). Την επόμενη ημέρα το καλλιεργητικό μέσον αντικαθίσταται και μαζί απομακρύνονται οι ανεπιθύμητοι κυτταρικοί πληθυσμοί που παραμένουν σε εναιώρημα. Με την επόμενη αλλαγή που γίνεται κάθε 3-4 ημέρες, ως βασικό καλλιεργητικό μέσο χρησιμοποιείται α-MEM (Gibco, by Life Technologies Invitrogen, Paisley, UK, cat. no. 22561-021) αντί του RPMI 1640. Περίπου μία με δύο εβδομάδες μετά γίνεται η πρώτη ανακαλλιέργεια (passage) με διάλυμα 0.25% v/v τρυψίνης – EDTA (Gibco, by Life Technologies, cat. no. 25200-056).

Κάθε ανακαλλιέργεια γίνεται με την ακόλουθη διαδικασία: Αποχύνουμε το καλλιεργητικό μέσο, ξεπλένουμε δις με PBS-Dulbecco (Biochrom AG, Berlin, Germany, cat. no. L1825) και προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος τρυψίνης ώστε να καλυφτεί η επιφάνεια προσκόλλησης των κυττάρων της φιάλης καλλιέργειας. Επωάζουμε για 2 λεπτά, αυστηρά, στον κλίβανο (37°C) και προσθέτουμε καλλιεργητικό μέσο με FCS για την διακοπή της αντίδρασης. Συλλέγουμε το εναιώρημα και φυγοκεντρούμε στα 500 x g για 5 min. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε α-MEM με 20% v/v FCS και απλώνονται όλα, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του BM σε MSC, σε φιάλη T175 (επιφάνεια καλλιέργειας 175 cm², Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) για την συνέχεια της καλλιέργειας. Γύρω στις 6-8 εβδομάδες έχουμε 100% καθαρό πληθυσμό MSC. Μετά από αυτήν την χρονική περίοδο τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πυκνότητα 1000 MSC ανά cm² σε αMEM με 20% v/v FCS. Η περιεκτικότητα του μέσου σε FCS μειώνεται σε 10% v/v στο p7.

1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ MSC ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1.2.1 Μυελός των Οστών

Τα BM-MNC συλλέγονται από το μηριαίο οστό κατά τη διάρκεια εγχείρησης αποκατάστασης ορθοπεδικής βλάβης, μετά από ενημέρωση και συναίνεση του/της ασθενούς και διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας. Η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική ειδική πυκνότητα των κυτταρικών συστατικών του αίματος σε σχέση με το μέσο διαχωρισμού (Ficoll: ένα υδατικό διάλυμα πολυμερούς με πυκνότητα 1.077 g/mL). Συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα (Red Blood Cells, RBC) και τα κοκκιοκύτταρα, όταν έρχονται σε επαφή με το Ficoll (Biochrom AG, Berlin, Germany, cat. no. L6115), σχηματίζουν συσσωματώματα, γεγονός που αυξάνει το ρυθμό καθίζησης. Αντίθετα, τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια δεν είναι αρκετά πυκνά ώστε να διεισδύσουν το στρώμα του Ficoll. Έτσι, μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα καθιζάνουν στον πυθμένα του σωλήνα ενώ τα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια σχηματίζουν ένα πυκνό υπόλευκο στρώμα πάνω από το Ficoll. Τα MSC του BM παραμένουν στο στρώμα των μονοπύρηνων κυττάρων.

Η όλη διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, εκτός κι αν η μετέπειτα χρήση των κυττάρων απαιτεί τη συντήρησή τους στους 4°C, και περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

- 2-10 mL υλικού συλλέγεται σε σωληνάρια 50ml τύπου Falcon με αντιπηκτικό μέσο (ηπαρίνη ή EDTA).
- Αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα (1xPBS + 0.2 mM EDTA) σε αναλογία 1:5.
- Επιστρώνεται προσεκτικά σε ίσο όγκο δια/τος Ficoll.
- Φυγοκεντρείται στα 400 x g (χωρίς φρένο) για 25 min.
- Συλλέγονται τα κύτταρα της μεσόφασης (μεταξύ Ficoll και πλάσματος) με πιπέτα Pasteur και μεταφέρονται σε ένα νέο σωληνάριο.

- Ακολουθεί μια έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα στα 200 x g, για 10 min, για την απομάκρυνση των αιμοπεταλίων, και μια δεύτερη στα 400 x g για 5 min.

Σε T175 φιάλες καλλιέργειας (Greiner Bio-One GmbH) τοποθετούνται τα απομονωμένα BMMNC, με πυκνότητα 10^6 ανά cm^2 σε α -MEM με GlutaMAX™ (σταθεροποιημένη L-Glutamine), χωρίς νουκλεοσίδες (Gibco, by Life Technologies, Invitrogen, cat. no. 32571-028) με 20% v/v FCS και 1x αντιβιοτικό. 24 ώρες μετά το καλλιεργητικό μέσον απομακρύνεται και μαζί οι ανεπιθύμητοι κυτταρικοί πληθυσμοί. Προστίθεται νέο μέσο, το οποίο ανανεώνεται κάθε 3-4 μέρες. Περίπου μία με δύο εβδομάδες μετά γίνεται η πρώτη ανακαλλιέργεια με διάλυμα 0.25% v/v τρυψίνης – EDTA. 250 MSC ανά cm^2 απλώνονται σε α -MEM με 10% FCS για την συνέχεια της καλλιέργειας. Τα υπόλοιπα κύτταρα είτε χρησιμοποιούνται για φαινοτυπικό ή λειτουργικό χαρακτηρισμό ή καταψύχονται στους -80°C (για λιγότερο από έξι μήνες) ή σε υγρό άζωτο με FCS + 10% v/v DMSO (Applichem GmbH, Germany, A3672).

1.2.2 Λιπώδης Ιστός

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των MSC από τον λιπώδη ιστό είναι αυτό που περιγράφεται από τους Zuk *et al*, 2001¹³⁵. Περιληπτικά τα κύρια βήματα είναι τα ακόλουθα:

Συλλέγονται κάτω από στείρες συνθήκες 5-10 mL υποδόριου λιπώδους ιστού από την κοιλιακή χώρα κατά τη διάρκεια επέμβασης στην περιοχή μετά από ενημέρωση και συναίνεση του/της ασθενούς, και ξεπλένονται άμεσα, τρις με PBS-Dulbecco για την απομάκρυνση των RBC. Στη συνέχεια, γίνεται πέψη με διάλυμα 1% Κολλαγενάσης IV (0,075%w/v), (Sigma-Aldrich Co. LLC., cat.no. C5138) για 30 min στους 37°C , το ένζυμο απενεργοποιείται με την προσθήκη καλλιεργητικού μέσου που περιέχει FCS και το κυτταρικό ίζημα φιλτράρεται για τη δημιουργία εναιωρήματος μονήρων κυττάρων με νάιλον φίλτρο κυττάρων (cell strainer, 70 μm nylon, BD

Falcon, cat. no. 352350). Τα απομονωμένα κύτταρα καλλιεργούνται σε α-MEM με 20% v/v FCS με πυκνότητα 10^6 ανά cm^2 . Μετά από 24 ώρες το καλλιεργητικό μέσον και ό,τι δεν έχει κολλήσει απομακρύνεται. Περίπου μία εβδομάδα μετά, ή μόλις σχηματιστούν πυκνές αποικίες, γίνεται η πρώτη ανακαλλιέργεια, όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Από το στάδιο αυτό και εφεξής, το καλλιεργητικό μέσον περιέχει 10% v/v FCS.

1.2.3 Ομφάλιος Λώρος

Μετά την συλλογή του ομφάλιου λώρου (μετά από συναίνεση της μητέρας), σε ειδικό στείρο δοχείο, μέσα σε διαλ/μα PBS 5% v/v FCS και εντός 12 ωρών από τον τοκετό, πραγματοποιείται η απομόνωση των βλαστοκυττάρων με την ακόλουθη διαδικασία:

Κάτω από στείρες συνθήκες επιλέγεται η καταλληλότερη περιοχή του λώρου, χωρίς αιματώματα και περίπου 5cm σε μήκος. Ξεπλένεται δις με PBS-2mM EDTA και τεμαχίζεται σε πολύ μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια τα κομμάτια τοποθετούνται σε α-MEM με 20% v/v FCS, σε T175 φιάλη καλλιέργειας. 24 ώρες μετά το καλλιεργητικό μέσον απομακρύνεται (χωρίς την αφαίρεση των τεμαχίων ιστού) και προστίθεται νέο το οποίο ανανεώνεται κάθε 3-4 μέρες. Περίπου μία με δύο εβδομάδες μετά, εφόσον έχουν σχηματιστεί πυκνές αποικίες, γίνεται η πρώτη ανακαλλιέργεια με διάλυμα 0.25% v/v τρυψίνης –EDTA. Τα κύτταρα από αυτό το στάδιο και έπειτα καλλιεργούνται όπως περιγράφηκε για τα BM-MS.

1.2.4 Αίμα Ομφάλιου Λώρου

Η απομόνωση MSC από το Αίμα Ομφάλιου Λώρου (Umbilical Cord Blood,UCB) βασίστηκε σε αυτήν του BM, με κάποιες τροποποιήσεις. Συνοπτικά, το δείγμα UCB αραιώνεται 4 φορές με HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Biochrom, cat. no.L2055), επιστρώνεται σε φικόλλη και ακολουθεί η διαδικασία όπως και για το BM. Το UCB όμως σε αντίθεση με το BM, είναι πλούσια πηγή σε πρωίμα RBC,

δηλαδή εμπύρνηνα RBC, καθώς και σε μακροφάγα/ μονοπύρνηνα τα οποία εμποδίζουν την σωστή απομόνωση των MSC και για αυτό απομακρύνονται. Και οι δύο αυτοί πληθυσμοί πρώιμων κυττάρων απομονώνονται στην μεσόφαση της φικόλλης, δηλαδή στο κλάσμα των μονοπύρνηνων κυττάρων.

Τα εμπύρνηνα RBC, τα οποία πολλές φορές είναι πολλαπλάσια των άλλων μονοπύρνηνων κυττάρων, απομακρύνονται μέσω μιας διαδικασίας αρνητικής ανοσο-επιλογής. Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνολογία των μαγνητικών μικρο-σφαιριδίων επικαλυμμένων με ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα (MACS, Magnetic Cell Sorting), που επιτρέπουν τη στόχευση ενός συγκεκριμένου πληθυσμού κυττάρων μέσα σε ένα ετερογενές μείγμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση έναντι της γλυκοφορίνης A, πρωτεΐνης ειδικής των RBC. Περιληπτικά τα κύρια βήματα είναι τα ακόλουθα (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή):

- ✓ *Μαγνητική Σήμανση.* Τα κύτταρα-στόχοι επωάζονται με τα ανοσο-σφαιρίδια σε κατάλληλη αναλογία και τελικό όγκο, για 25 min στους 4°C.
- ✓ *Μαγνητικός Διαχωρισμός.* Μετά από απομάκρυνση των αδέσμευτων ανοσο-σφαιριδίων, τα σημασμένα κύτταρα διέρχονται από μια στήλη στερεωμένη σε έναν ισχυρό μαγνήτη. Τα σημασμένα κύτταρα συγκρατούνται στο πλέγμα της στήλης λόγω της μαγνητικής δύναμης που δέχονται, ενώ τα μη σημασμένα διαπερνούν τη στήλη ελεύθερα. Η στήλη εκπλένεται ώστε να απομονωθούν όλα τα μη σημασμένα κύτταρα. Αυτό είναι το κλάσμα που χρησιμοποιείται μετά από αρνητική επιλογή, όπως στην περίπτωση της απομάκρυνσης των πρώιμων ερυθροκυττάρων.
- ✓ *Έκλυση Σημασμένων Κυττάρων.* Για την ανάκτηση του θετικού κυτταρικού κλάσματος, η στήλη απομακρύνεται από το μαγνήτη και τα κύτταρα εκκλύονται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην περίπτωση της απομάκρυνσης πληθυσμού (αρνητική επιλογή) το κλάσμα αυτό απορρίπτεται.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης, η καθαρότητα των απομονωμένων κυττάρων (αρνητικού ή θετικού κλάσματος) εκτιμάται με κυτταρομετρία ροής. Στην περίπτωση της απομάκρυνσης των πρώιμων ερυθροκυττάρων αυτό δεν είναι απαραίτητο, αφού δεν επηρεάζεται η παραπέρα έκβαση της καλλιέργειας.

Με επεξεργασία της φιάλης καλλιέργειας με FCS για 30 min στους 37°C, αποτρέπεται η προσκόλληση των μακροφάγων/ μονοκυττάρων στο πλαστικό.

1.3 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

1.3.1 CFU-f

Η δοκιμασία σχηματισμού μονάδων ινοβλαστικών αποικιών (Colony Forming Unit-fibroblast, CFU-f) χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή είτε για τον καθορισμό του ενδογενή αριθμού των προγονικών κυττάρων κατά την απομόνωση των MSC από το ποντίκι, είτε κατά την διάρκεια της καλλιέργειας των MSC *in vitro* για τον καθαρισμό του ρυθμού αυτό-ανανέωσης (self-renewal). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής (πραγματοποιείται τουλάχιστον εις τριπλούν):

- Καλλιέργεια 10^5 BM-MNC ή 10 BM-MSC ποντικού ή 25 MSC ανθρώπινης προέλευσης, ανά cm^2 (κάτω από τις αντίστοιχες κατάλληλες συνθήκες) σε τριβλίο 10 cm^2 για 2 εβδομάδες
- Απόχυση καλλιεργητικού μέσου, πλύσιμο δις με PBS-Dulbecco και χρώση με διαλ/μα 0.5% w/v Crystal Violet (Merck & Co) σε μεθανόλη, για 10 min, ξέπλυμα δις με νερό βρύσης
- Αποικίες μεγαλύτερες των 2mm καταμετρούνται στο στερεοσκόπιο.

1.3.2 Υπολογισμός Ρυθμού Πολλαπλασιασμού Καλλιέργειών

Για όλες τις καλλιέργειες MSC υπολογίστηκε ο ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας, ο χρόνος διπλασιασμού που μας δείχνει το πόσο συχνά διπλασιάζονται τα κύτταρα της καλλιέργειας μας και ο αριθμός διπλασιασμών του πληθυσμού μέσω του οποίου υπολογίζουμε το πόσο συχνά πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα της καλλιέργειας ανά πέρασμα. Πληροφορίες απαραίτητες για την συνολική *in vitro* συμπεριφορά των κυττάρων.

Ρυθμός αύξησης/ ανάπτυξης της καλλιέργειας:

Ο ρυθμός ανάπτυξης (growth index, GI) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση: $GI = N_t/N_0$, όπου N_0 είναι ο αριθμός κυττάρων που μπήκαν στην καλλιέργεια και N_t ο αριθμός κυττάρων που συλλέχτηκαν. Ο αθροιστικός ρυθμός ανάπτυξης (cumulative growth index, cGI) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση: $cGI = GI_{(n)} \times GI_{(n-1)}$, όπου n είναι ο αριθμός της ανακαλλιέργειας.

Χρόνος διπλασιασμού:

Ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού (Doubling time, T_D) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση: $T_D = \ln 2 \times Dt / (\ln N_t - \ln N_0)$, όπου Dt είναι ο χρόνος για τον οποίο η καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί.

Αριθμός διπλασιασμών του πληθυσμού:

Ο διπλασιασμός του πληθυσμού (population doubling, PD) των MSC υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Cristofalo *et al* από την ακόλουθη εξίσωση: $PD = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$.

Δοκιμασία Ενσωμάτωσης Ραδιενεργής Θυμιδίνης

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων με την δοκιμασία ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης χρησιμοποιήθηκε α) για την διερεύνηση της ανοσοκατασταλτικής δράσης των MSC και β) κατά τα πειράματα επιλεκτικής

παρεμπόδισης. Η αρχή στην οποία βασίζεται η μέθοδος αυτή είναι το γεγονός ότι όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, συνθέτουν DNA – αφού πριν από κάθε διαίρεση, διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό. Κατά τη σύνθεση DNA, ενσωματώνουν θυμιδίνη από το περιβάλλον τους [190]. Έτσι, χρησιμοποιώντας ^3H –θυμιδίνη (^3H -TDR), είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ενός κυτταρικού πληθυσμού, μετρώντας το ποσό β–ακτινοβολίας που αυτά εκλύουν με τη λύση τους.

ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ

Η ομάδα των κυττάρων που έχει διερευνηθεί περισσότερο για την αλληλεπίδραση της με τα MSC είναι αυτή των T κυττάρων συνεπώς σε αυτή την δοκιμασία μελετήθηκε η αναχαίτιση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ενεργοποιημένων T κυττάρων από τα MSC. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε έχει ως εξής:

- Ακτινοβολούνται (30 Gy/3000 rad), σε ακτινοβολητή GammaCell 1000 Elite (BestTheratronics Ltd), 5×10^5 MSC σε 1mL καλλιεργητικού μέσου για να είναι μεταβολικά ενεργά χωρίς να πολλαπλασιάζονται
- Φυγοκεντρούνται στα 1600 rpm για 5 min και επαναιωρούνται σε φρέσκο καλλιεργητικό μέσο, σε συγκέντρωση 2×10^5 ανά mL
- Στρώνονται ($\times 12$) σε διαδοχικές αραιώσεις των 20000, 10000, 5000, 2500, 1250 σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα (96–well flat plate, Corning) και αφήνονται να κολλήσουν στον κλίβανο για μια ώρα
- Παράλληλα, απομονώνονται σπληνοκύτταρα από συγγενικό ποντίκι με μηχανικό διαχωρισμό, χρησιμοποιώντας νάιλον φίλτρο κυττάρων, 70- μm (cell strainer, BD Biosciences). Λύνονται τα RBC με 5λεπτη επώαση σε φρέσκο δια/μα NH_4Cl (0.15 M) στον πάγο και προστίθεται καλλιεργητικό υλικό. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για την απομάκρυνση κατάλοιπων.

- ο Προστίθενται 10^5 σπληνοκύτταρα και για την πολυκλωνική διέγερση των Τ λεμφοκυττάρων μέσω του TCR χρησιμοποιείται αντι-ποντικίσιο CD3ε αντίσωμα (BD Biosciences; 10 $\mu\text{g/mL}$) σε κάθε φρεάτιο μικροπλάκας καλλιέργειας (96 θέσεων)
- ο Τα κύτταρα επωάζονται για 48h και προστίθεται ^3H -θυμιδίνη (Amersham; Ειδικής ενεργότητας: 53.0 Ci/mmol, 1 $\mu\text{Ci/}$ φρεάτιο) για επιπλέον 16h
- ο Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων σε ειδικά φίλτρα FilterMAT (Skatron Instrument, Norway, cat. no. 11731), με χρήση ημιαυτόματου επεξεργαστή κυττάρων προσθήκη υγρού σπινθηρισμού και μέτρηση του ποσού της ενσωματωμένης ^3H -θυμιδίνης σε ειδικό μετρητή β-ραδιενέργειας (1450 Microbeta Wallac Trilux, Perkin Elmer Inc., Illinois, USA). Οι μετρήσεις εκφράζονται σε κτύπους ανά λεπτό (counts per minute: cpm).

Σε κάθε πείραμα υπήρχαν αρνητικοί μάρτυρες (μόνο με MSC ή μόνο με σπληνοκύτταρα) και θετικοί μόνο με σπληνοκύτταρα και αντίσωμα.

ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ

Στην προκειμένη περίπτωση ο αριθμός των MSC που ανακαλλιεργούνται σε 96-well flat plate, είναι 2×10^3 κύτταρα/ φρεάτιο. 18 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται επιμόλυνση των κυττάρων με τα si μόρια, όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 3.6 αυτής της ενότητας. Τα κύτταρα επωάζονται με το Cont-si, το CRD-si το TET1-si ή το TET2-si για 48 ώρες και στη συνέχεια επωάζονται για 16 ώρες με ^3H -θυμιδίνη και ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε στη προηγούμενη παράγραφο.

1.4 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η μεθοδολογία του ανοσοφθορισμού και της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry ή Fluorescent activated cell sorting, FACS) χρησιμοποιήθηκαν για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών που μελετήθηκαν κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας. Η τεχνική αυτή μας επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων κυτταρικών πληθυσμών βάσει της έκφρασης συγκεκριμένων μοριακών δεικτών είτε στην επιφάνεια των κυττάρων ή ενδοκυττάρια. Βασίζεται στην ικανότητα ανίχνευσης και ανάλυσης κάθε μεμονωμένου κυττάρου ως προς διάφορες παραμέτρους, όπως το μέγεθος κυττάρου, η πολυπλοκότητα και η έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων (μετά από σήμανση με ειδικά προς αυτά αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα με κατάλληλα φθοριοχρώματα).

Γενικό πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού επιφανειακών αντιγόνων:

- Συλλογή κυττάρων και έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα FACS (1xPBS + 2% FBS + 0.1% N_3Na).
- Επώαση κυττάρων με το/τα κατάλληλο/α αντίσωμα/τα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Κάθε αντίδραση ανοσοφθορισμού πραγματοποιείται σε 50-100μL τελικό όγκο, και περιλαμβάνει: 1) $< 10^6$ κύτταρα, και 2) το κάθε αντίσωμα στη βέλτιστη αραίωση (η οποία έχει προσδιοριστεί μετά από τιτλοδότηση του αντισώματος).
- Έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα FACS για απομάκρυνση των αδέσμευτων αντισωμάτων. Επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα 1% παραφορμαλδεΰδης σε PBS (PFA) στους 4°C σε 200 μL τελικό όγκο.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή για την ανάλυση των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών με FACS, (έχουν προμηθευτεί κυρίως από την BD Biosciences, όπου ο προμηθευτής διαφέρει αναφέρεται σε παρένθεση) αναφέρονται παρακάτω ανά κατηγορία.

MSC ποντικού: CD29-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD73-PE (phycoerythrin), Sca-1 PE, H-2Dd-PE, I-A/I-E-PE, CD45-PerCP (peridinin chlorophyll-a protein), CD11b-APC (allophycocyanin), CD44-APC και CD105-PE (R&D Systems).

Ανοσολογική Γήρανση Ποντικού: CD45-FITC, CD27-PE, CD127-PE, B220-PE, DX5-PE, CD4- PerCP, CD8-PerCP-Cy5.5, TER119-PerCP-Cy5.5, CD3-APC, CD11b-APC και CD25-APC (όλα από eBioscience, Inc., Belgium).

Ανθρώπινα MSC: CD73-PE, CD45-PerCP, CD106-FITC, CD44-PE, CD29-APC, CD14-PE, HLAI-FITC, HLADR-PE; CD34-FITC (Immunotech), CD105-FITC (AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) και CD90-FITC (eBioscience).

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν σε μηχανήμα κυτταρομετρίας ροής (FACSCalibur) εξοπλισμένο με 2 laser και 4 ανιχνευτές, μετά από κατάλληλη ρύθμιση της έντασης των φωτοπολλαπλασιαστών και διόρθωση του μη ειδικού σήματος (προερχόμενο από την αλληλεπικάλυψη των φασμάτων εκπομπής των διαφόρων φθοριοχρωμάτων). Η συλλογή και η ανάλυση των δεδομένων έγινε σε κατάλληλο λογισμικό, CellQuest (BD Biosciences) ή FCS3 Express (*De novo* Software).

1.4.1 Μέτρηση του ρυθμού απόπτωσης

Η απόπτωση μπορεί να οριστεί ως μια φυσιολογική διαδικασία κυτταρικής αυτό-καταστροφής κατευθυνόμενη από το γονιδίωμα. Τα κλασικά αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν βάσει ενός χαρακτηριστικού προτύπου μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών αλλαγών. Μια από αυτές τις αλλαγές είναι και η έκθεση των καταλοίπων φωσφατιδυλσερίνης (PS, phosphatidylserine). Η Annexin-V είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται ειδικά στα κατάλοιπα PS και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων. Επειδή η Annexin-V δεσμεύεται τόσο δεσμεύεται στα κύτταρα που αποπύπτουν ή ήδη έχουν πεθάνει από απόπτωση, τα κύτταρα προς ανάλυση πρέπει να σημανθούν

επιπροσθέτως και με μια χρωστική που επιτρέπει την διάκριση νεκρών κυττάρων, όπως το 7-AAD, PI, DAPI.

Πρωτόκολλο σήμανσης αποπτωτικών κυττάρων με Annexin-V και 7-AAD:

- Σήμανση των κυττάρων με αντισώματα έναντι αντιγόνων επιφανείας (αν αυτό είναι απαραίτητο για τη διάκριση υποπληθυσμών), όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
- Επαναίωση των κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης Annexin-V [10x Annexin-V buffer: 0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂. Το διάλυμα αραιώνεται σε συγκέντρωση 1x με ddH₂O πριν τη χρήση και η περίσσεια απορρίπτεται μετά το τέλος της διαδικασίας] σε συγκέντρωση 1x10⁶ κύτταρα/mL. 100μL του κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρονται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθήκη Annexin-V-PE (αραίωση 1/20, BD Pharmingen) και 7-AAD (αραίωση 1/20, BD Pharmingen), και επώαση της αντίδρασης για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τερματισμός της αντίδρασης με την προσθήκη 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης Annexin-V. Η συλλογή των δεδομένων στον κυτταρομετρητή πρέπει να γίνει μέσα σε 1 ώρα. Τα νεκρά από απόπτωση κύτταρα ορίζονται ως Annexin-V⁺7-AAD⁺ ενώ τα αποπτωτικά ως Annexin-V⁺7-AAD⁻.

1.5 IN VITRO ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ MSC

Η ικανότητα διαφοροποίησης των MSC σε οστεοβλάστες και λιποκύτταρα μελετήθηκε *in vitro*. Το ποσοστό των κυττάρων που διαφοροποιήθηκαν προσδιορίστηκε είτε ποιοτικά μετά από την κατάλληλη χρώση ή ποσοτικά με την μέθοδο της qRT-PCR (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.2). Η

δοκιμασία της διαφοροποίησης έγινε στα αρχικά περάσματα της καλλιέργειας των διαφόρων MSC υποπληθυσμών, εκτός από την περίπτωση κατά την οποία μελετήθηκε το πώς επηρεάζει η *in vitro* ανάπτυξη των MSC αυτή τους την ιδιότητα, που πραγματοποιούνταν κάθε 3 περάσματα μέχρι το τέλος της καλλιέργειας.

Τα ανθρώπινα MSC διαφοροποιήθηκαν προς οστεο- και λιπο-κύτταρα σύμφωνα με την Sotiropoulou *et al* ενώ τα MSC από το ποντίκι διαφοροποιήθηκαν προς οστεοκύτταρα κατά την Peister *et al* και προς λιποκύτταρα κατά τους Meirelles Lda και Nardi^{143, 222, 223}. Τα μέσα διαφοροποίησης φαίνονται στο Παράρτημα Ι (Συμπ. Πίνακας 1).

Συνοπτικά η διαδικασία είχε ως εξής:

- MSC, απλώνονται σε τριβλίο με πυκνότητα κάλυψης της επιφάνειας καλλιέργειας 80%, στο αντίστοιχο καλλιεργητικό υλικό (βλέπε παράγραφο 1).
- Την επόμενη ημέρα το μέσο αντικαθίσταται με ίσο όγκο μέσου διαφοροποίησης ή ελέγχου (DMEM high glucose, 10% FCS, 1x αντιβιοτικό).
- Το μέσο ανανεώνεται 2 με 3 φορές την εβδομάδα, για τουλάχιστον 2 εβδομάδες και με ανώτατο όριο τις 6 εβδομάδες, οπότε γίνεται χρώση των κυττάρων με την κατάλληλη χρωστική.

1.5.1 Χρώση Alizarin Red S

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της διαφοροποίησης προς οστεοβλάστες έγινε με χρώση των εναποθέσεων ασβεστίου με Alizarin Red S. Πρωτόκολλο:

- Τα κύτταρα ξεπλένονται δις με PBS και μονιμοποιούνται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με 10% NFB (900.0mL Distilled water+ 100.0mL Formaldehyde 37%+ 4g NaH₂PO₄.H₂O+ 6.5gNa₂HPO₄).

- Μετά την μονιμοποίηση ξεπλένονται δις με διπλά αποσταγμένο/απιονισμένο νερό (ddH₂O), γίνεται χρώση με 2% Alizarin Red S (pH 4.1) για 15 λεπτά
- Τα κύτταρα ξεπλένονται με ddH₂O. Η εξωκυττάρια ουσία που είναι πλούσια σε Ca⁺² βάφεται κόκκινη. Τυχαία επιλέγονται πέντε διαφορετικές περιοχές του τριβλίου καλλιέργειας για παρατήρηση και αξιολόγηση κάτω από ανεστραμμένο μικροσκόπιο.

1.5.2 Χρώση Oil Red O

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της λιπογένεσης έγινε χρώση των λιπιδιακών κενοτόπιων των κυττάρων με Oil Red O. Πρωτόκολλο:

- Αποχύνεται το καλλιεργητικό μέσο και απευθείας προστίθεται 10% NFB αρχικά για 10 λεπτά, οπότε ανανεώνεται το NFB και συνεχίζεται η μονιμοποίηση για άλλη μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12 ώρες στους 4°C.
- Τα κύτταρα ξεπλένονται, προσεκτικά, δις με 60% Ισοπροπανόλη και αφήνονται να στεγνώσουν τελείως.
- Γίνεται χρώση με φρέσκο και φιλτραρισμένο διάλυμα 0.18% Oil Red O σε Ισοπροπανόλη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα λιπιδιακά κενοτόπια βάφονται κόκκινα.
- Τα κύτταρα ξεπλένονται με νερό βρύσης προσεκτικά και διατηρούνται σε αυτό για τα επόμενα βήματα ή για φύλαξη στους 4°C. Τυχαία επιλέγονται πέντε διαφορετικές περιοχές του τριβλίου καλλιέργειας για παρατήρηση και αξιολόγηση κάτω από ανεστραμμένο μικροσκόπιο.

2. IN VIVO ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Χρησιμοποιήθηκαν 24 θηλυκά BALB/c ποντίκια, βάρους 19-22 gr και ηλικίας 12 μηνών από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur. Τα ζώα διατηρούνταν ανά 6 σε ειδικά κλουβιά κάτω από ένα φυσικό κύκλο φωτός (12h) –σκότους (12h) και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή (Analab) και νερό βρύσης. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες:

Ομάδα Α: 6 ποντικοί που λάμβαναν ενδοφλέβια 200,000 αρσενικά «νέα MSC» σε 0.2 mL φυσιολογικού ορού, μηνιαία για 6 μήνες (MSC18)

Ομάδα Β: 6 ποντικοί που λάμβαναν ενδοφλέβια 0.2 mL φυσιολογικού ορού μηνιαία για 6 μήνες (SAL18) και αποτελούσαν την οπαδού έλεγχου της ομάδας Α.

Ομάδα Γ: 7 ποντικοί που λάμβαναν ενδοφλέβια σε 0.2 mL φυσιολογικού ορού 200,000 αρσενικά «νεαρά MSC» μηνιαία για 6 μήνες και τριμηνιαία για άλλους 6 μήνες (MSC24)

Ομάδα Δ: 5 ποντικοί που λάμβαναν ενδοφλέβια 0.2 mL φυσιολογικού ορού μηνιαία για 6 μήνες και τριμηνιαία για άλλους 6 μήνες (SAL24) και αποτελούσαν την ομάδα έλεγχου της ομάδας Γ.

Όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση, 2 εβδομάδες μετά την τελική έγχυση. Επιπλέον, την ίδια αυτή χρονική περίοδο, θυσιάστηκαν θηλυκά BALB/c ποντίκια, βάρους 17-22 gr και ηλικίας 6 μηνών από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur (n = 7) που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου νεαρών μαρτύρων (6Mo).

Τα «νεαρά MSC» που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος απομονώθηκαν από αρσενικά BALB/c ποντίκια ηλικίας 4-6 εβδομάδων και καλλιεργήθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 1.1.1. Για τις εγχύσεις χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από κάποιο αρχικό πέρασμα/ανακαλλιέργεια (3-7) και

αφού είχαν υποβληθεί στις ανάλογες φαινοτυπικές και λειτουργικές δοκιμασίες όπως αναφέρονται στην Παράγραφο 1.3 έως 1.5 της ίδιας ενότητας.

2.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Μετά την ευθανασία συλλέχθηκαν, και από τις πέντε ομάδες, οι ακόλουθοι ιστοί:

- A) Ραχιαίο δέρμα από τη βάση του λαιμού έως τη βάση της ουράς,
- B) Πνεύμονας (δεξιός και αριστερός λοβός)
- Γ) Ήπαρ (κεντρικός λοβός)
- Δ) Έντερο
- Ε) Οστό του μηρού και της κνήμης του οπισθίου αριστερού άκρου.

Όλοι οι ιστοί διατηρηθήκαν σε 10% NFB στους 4°C μέχρι την έγκλειση τους σε παραφίνη. Επιπλέον, τα οστά απασβεστώθηκαν για 12h στους 4°C χρησιμοποιώντας το Decalcifier II (Surgipath Medical Industries, Inc). Την επόμενη μέρα τα δείγματα αφυδατώθηκαν και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Στη συνέχεια κόπηκαν σε τομές των 3-5μm και βάφτηκαν με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης για να μελετηθεί η αρχιτεκτονική δομή του κάθε ιστού. Τα οστά χρωματίστηκαν επιπλέον με Safranin O Acid Fast Green και το δέρμα με Masson-τριχρωμική και με την χρώση Verhoeff-van Gieson (όλα από Sigma Aldrich Hellas).

Για κάθε πειραματόζωο από κάθε ηλικιακή ομάδα έγιναν 5-7 τυχαίες μετρήσεις κατά μήκος του ραχιαίου δέρματος ώστε να προσδιοριστεί το πάχος τόσο του δερματικού όσο και του λιπώδους στρώματος. Η ποσοτικοποίηση και ανάλυση των μετρήσεων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό NIH Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.3 ΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ο βαθμός λορδοκύφωσης εξετάστηκε με ακτινολογική εξέταση. Αμέσως μετά την ευθανασία τα πειραματόζωα ακτινοσκοπήθηκαν *in situ* με δόση 40 kV και 2.11.mAs (Luminos dRF, Siemens AG, Germany). Η κυφωτική γωνία μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό NIH Image J.

2.4 ELISA

Για την μέτρηση αυξητικών παραγόντων που σχετίζονται με τον φαινότυπο γήρανσης, όπως ο IGF1 ή της ανοσοκαταστολής, όπως ο TGF-β, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA. Σε μια ELISA, δηλαδή μια ανοσοενζυμική μέθοδο «σάντουιτς», περιλαμβάνονται δύο αντισώματα. Επίσης, περιλαμβάνεται καθαρή πρωτεΐνη IGF1 και TGF-β αντίστοιχα, γνωστής συγκέντρωσης, της οποίας φτιάχνονται πρότυπα δείγματα με διαδοχικές αραιώσεις για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Αμέσως πριν την ευθανασία συλλέχθηκαν 0.2 mL περιφερικού αίματος από την άκρη της ουράς. Τα δείγματα αφέθηκαν για περίπου μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 rpm για 10min και συλλέχθηκε ο ορός αίματος στο υπερκείμενο. Ο ορός χωρίστηκε στα δυο και διατηρήθηκε στους -80°C ωσότου χρησιμοποιηθεί, με μέγιστο χρονικό διάστημα τους 2 μήνες.

Για την ποσοτικοποίηση του IGF1 χρησιμοποιήθηκε το Quantikine® ELISA kit με cat no MG-100 και του TGF-β το Quantikine® ELISA kit με cat no MB-100B ELISA kit (R&D Systems, Inc., UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, στην επιφάνεια των 96 πηγαδιών της μικροπλάκας υπάρχουν ακινητοποιημένα μόρια μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της κάθε πρωτεΐνης υπό μελέτη. Πρότυπα και δείγματα φορτώνονται με πιπέτα στα πηγαδάκια και επωάζονται για περίπου 2 ώρες. Ακολουθούν 3 διαδοχικά πλυσίματα για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων. Έπειτα προστίθεται ένα δεύτερο μονοκλωνικό για άλλον επίτοπο σημασμένο με HRP ή βιοτίνη (οπότε ακολουθεί

βήμα με στρεπταβιδίνη HRP) και το μείγμα επωάζεται εκ νέου. Ακολουθεί και πάλι απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων με πλύσιμο και τέλος προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, η άχρωμη τετραμεθυλ-βενζιδίνη (TMB). Με την οξείδωσή της από την υπεροξειδάση παράγεται μπλε χρώμα και με την προσθήκη θειικού ή υδροχλωρικού οξέος για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης το χρώμα γίνεται κίτρινο. Αυτό μετράται σε φωτόμετρο (450nm) οπότε η απορρόφηση – που είναι ανάλογη των μορίων της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και περιέχει το κάθε πηγαδάκι – μεταφράζεται σε μονάδες OD/mg πρωτεΐνης 10^{-1} με βάση τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης που περιείχε το κάθε δείγμα.

3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Γενωμικό DNA απομονώθηκε κατά το *in vivo* πείραμα γήρανσης. Ειδικότερα, 5×10^6 BM-MNC ξεπλένονται δις με PBS, φυγοκεντρούνται και το ίζημα χρησιμοποιείται για απομόνωση του DNA (αλλιώς διατηρείται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί) με το QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany, cat. no. 51104) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

- Το ίζημα αναδιαλύεται σε 200 μL PBS.
- Σε ένα μικροσωλήνα 1.5 ml τύπου *erppendorf* προσθέτουμε 20 μL QIAGEN Protease (ή πρωτεϊνάση K) και το αναδιαλυμένο δείγμα προς απομόνωση. Στη συνέχεια προσθέτουμε 200 μL το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα AL για την έκβαση της αντίδρασης, αναμιγνύουμε και επωάζουμε στους 56°C για 10 min για τη λύση των κυττάρων.
- Προσθέτουμε 200 μL καθαρής αιθανόλης και φορτώνουμε το δείγμα σε στήλη όπου συγκρατείται ειδικά το γενωμικό DNA ενώ τα υπόλοιπα μόρια εκκλύονται με φυγοκέντρωση.

- Η στήλη πλένεται με ρυθμιστικά διάλυμα και το DNA εκλούεται με 50 μL ddH₂O. Επωάζεται ο/η στους 37°C και φυλάσσεται στους -20°C ωσότου χρησιμοποιηθεί.
- Μετά την απομόνωση και πριν την περεταίρω χρήση του DNA πραγματοποιείται ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος (Παράγραφος 3.1.3).

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

3.2.1 Μέθοδος Ισοθειοκυανικής Γουανιδίνης

Για την απομόνωση ολικού RNA από τα MSC (για αριθμό κυττάρων από 5×10^5 έως 5×10^6) κυρίως χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel GmbH&Co, Germany, cat. no. 740955). Ενώ για αριθμό κυττάρων μικρότερο των 5×10^5 χρησιμοποιήθηκε το PureLink® RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies Invitrogen, cat. no.12183020).

Μετά την τρυψινοποίηση της καλλιέργειας, τα κύτταρα πλένονται δις με διάλυμα PBS με 5λεπτη φυγοκέντρηση στις 500 x g. Το RNA απομονώνεται απευθείας ή το ίζημα φυλάσσεται στους -80°C ωσότου χρησιμοποιηθεί. Το πρωτόκολλο απομόνωσης που ακολουθήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και στις δυο περιπτώσεις έχει συνοπτικά ως εξής:

- Λύση του δείγματος με ένα διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ένα ισχυρό χαοτροπικό αντιδραστήριο που διασπά τα κύτταρα ενώ συγχρόνως απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες,
- Δέσμευση του κυτταρικού ομογενοποιημάτος σε ένα φίλτρο διοξειδίου του πυριτίου (μικρής διαμέτρου στην περίπτωση του mini-RNA kit για να γίνει η έκλουση του δεσμευμένου RNA σε πολύ μικρό όγκο, χωρίς απώλειες), και

- Απομάκρυνση του γενωμικού DNA με αντίδραση πάνω στο φίλτρο ακολουθούμενη από έκλουση του RNA με ddH₂O για το Nucleospin RNA II kit ή το ανάποδο για το mini-RNA kit, δηλαδή έκλουση του RNA με ddH₂O και απομάκρυνση του γενωμικού DNA με τη χρήση ρητίνης μετά από επώαση με DNase I.

3.2.2 Διάλυμα Tri-ZOL

Για την απομόνωση ολικού RNA από πηγές όπως μικροτεμάχια ιστού και κατά τη διαφοροποίηση των MSC χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα TRIzol (Invitrogen, cat. no. 15596-018) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Σύμφωνα με αυτό, περίπου 50–100mg ιστού ομογενοποιούνται με τη χρήση ομογενοποιητή Polytron PT 2100 (SUPERCO- Handels GmbH., Germany) μέσα σε μικροσωληνάρια πολυπροπυλενίου και με την προσθήκη 1mL διαλύματος TRIzol. Εναλλακτικά, 1mL διαλύματος TRIzol προστίθεται απευθείας στη T25 φιάλη καλλιέργειας (επιφάνειας 25cm²) και τα κύτταρα λύνονται απευθείας δίχως να έχουν υποστεί τρυψινοποίηση. Το ομογενοποίημα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min ώστε να επιτευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων και έπειτα αναμιγνύεται με 0.2mL χλωροφόρμιο, αναδεύεται έντονα για 15sec και επωάζεται πάλι σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρείται στις 12000rpm, στους +4°C για 15min. Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μείγμα σε 3 φάσεις, εκ των οποίων, η κατώτερη κόκκινη περιέχει το πρωτεϊνικό κλάσμα, η θολή ενδιάμεση το DNA και η ανώτερη άχρωμη φάση είναι η υδατική που περιέχει το RNA. Αυτή η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό μικροσωλήνα και αναμιγνύεται με 0.5mL ισοπροπανόλης 100% v/v με έντονη ανάδευση. Το νέο μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 12000rpm, στους +4°C για 10min. Το RNA κατακρημνίζεται στον πυθμένα του μικροσωλήνα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται μια φορά με προσθήκη 1mL αιθανόλης 75% v/v και φυγοκέντρηση

στα 7500rpm, στους +4°C για 5min. Το ίζημα στεγνώνει για 5–15min σε θερμοκρασία δωματίου και αναδιαλύεται σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους –80°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του. Όλες οι φυγοκεντρήσεις που έγιναν σε αυτό το κομμάτι πραγματοποιήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Avanti30, Beckman Coulter, USA

3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.3.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του γενωμικού DNA και του ολικού RNA που απομονώνεται γίνεται με φωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική απορρόφηση (optical density, OD) του δείγματος στα 260nm και στα 280nm. Η πρώτη τιμή δίνει την απόλυτη ποσότητα (για το DNA: 1 OD = 50μg/mL ενώ για το RNA: 1 OD = 40μg/mL), ενώ το πηλίκο των δύο αυτών τιμών χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμείξεις, τότε ο λόγος $OD_{260}/OD_{280} = 2$. Αν υπάρχουν τέτοιες, ο λόγος αυτός μειώνεται.

3.3.2 Ποιοτικός έλεγχος DNA

Σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% w/v. σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (5x stock 1L: 54g Tris βάση, 27.5g βορικό οξύ και 20mL 0.5M EDTA-pH 8.0), που περιέχει τη χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/mL, ηλεκτροφορούμε 10μL από το κάθε δείγμα γενωμικού DNA, το οποίο έχει αναμειχθεί με 3μL διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλης. Όπως είναι γνωστό, το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται ειδικά στο δίκλωνο DNA και το κάνει ορατό στο υπεριώδες φως. Εξάλλου, το μείγμα του κυανού της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλης χρησιμοποιείται για να προσδώσει βάρος στο δείγμα του DNA και να το καταλείψει ομοιόμορφα μέσα στο «πηγαδάκι» του πηκτώματος ώστε το ηλεκτροφόρημα να αναπτυχθεί κανονικά. Το πήκτωμα βυθίζεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE και εφαρμόζεται σε αυτό

ηλεκτρικό πεδίο (η τάση του οποίου εξαρτάται από το μέγεθος του πηκτώματος και κυμαίνεται συνήθως στα 4V/cm πηκτώματος, συνήθως γύρω στα 100V).

3.3.3 Ποιοτικός έλεγχος RNA

Περίπου 3μL δείγματος ολικού RNA αναμειγνύεται με τριπλάσιο όγκο διαλύματος που περιέχει κυανό της βρωμοφαινόλης και φορμαμίδιο (RNA loading buffer, SIGMA) και το μείγμα θερμαίνεται στους 65–70°C για 10min ώστε να αναδιαταχτεί πλήρως το RNA. Στη συνέχεια, χρησιμοποιούμε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1.2% w/v σε 1x TBE με βρωμιούχο αιθίδιο και ηλεκτροφορούμε τα δείγματα μας για τουλάχιστον 30min. Το αποτέλεσμα αναλύεται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Η παρουσία 2 διακριτών ζωνών που προέρχονται από το ριβοσωμικό RNA αποτελεί ένδειξη της καλής ποιότητας του απομονωμένου υλικού.

3.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Η μέθοδος βασίζεται στη μοναδική ικανότητα του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών να συνθέτει μόρια DNA με μήτρα μόρια RNA. 1.5 ή 2.0 μg ολικού RNA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση της ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, USA).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή: το RNA αναμειγνύεται με 0.3 μg τυχαίων εξαμερών εκκινητών (random hexamer primers, Invitrogen, USA, cat. no. 48190-011) και 1μL 8/τος dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, συγκέντρωσης 10mM το καθένα, Invitrogen, cat. no. 10297-018) και συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 11μL. Το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 5min, ώστε να αναδιαταχτούν τυχόν δίκλωνες RNA δομές και στη συνέχεια τοποθετείται στον πάγο για λίγο. Έπειτα, προστίθενται 4μL ρυθμιστικού διαλύματος (250mM Tris–HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1μL αναστολέα των ριβονουκλεασών RNaseOUT (40U/μL, Invitrogen, USA, cat. no. 10777-019) και 1μL ενζύμου αντίστροφης

μεταγραφάσης ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, USA, cat. no. A3802). Το μείγμα επωάζεται στους 25°C για 5min, για να υβριδιστούν οι εκκινητές, και στους 42°C για 60min για επιμήκυνση. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75°C για 15min. Τα cDNAs φυλάσσονται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της έκφρασης εμβρυικών γονιδίων στα ανθρώπινα και τα ποντικίσια MSC, κάτω από κανονικές συνθήκες καθώς και μετά από την επιλεκτική παρεμπόδιση κάποιων από αυτών. Για τον ποσοτικό υπολογισμό της έκφρασης ειδικών γονιδίων διαφοροποίησης κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των MSC. Για την σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων υδροξυμεθυλιωμένου και μεθυλιωμένου DNA και στο *in vivo* πείραμα γήρανσης, για την ανίχνευση των κυττάρων που χορηγήθηκαν κατά την κυτταρική θεραπεία.

Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η τεχνολογία αυτή εμπεριέχει την αρχή λειτουργίας του απλού PCR με κύρια διαφορά την ποσοτικοποίηση του προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, ανιχνεύοντας ειδικό φθορισμό που εκλύεται από το συντιθέμενο προϊόν. Η συμβατική PCR στηρίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων του DNA και στην ικανότητα του ενζύμου Taq DNA Polymerase να προσθέτει νουκλεοτίδια κατά τη φορά 5'–3', με μήτρα τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Έτσι, επιλέγοντας κατάλληλους εκκινητές, και ακολουθώντας ένα απλό θερμικό πρωτόκολλο, μπορούμε να πάρουμε τελικά πολλά αντίτυπα της γονιδιακής περιοχής του ενδιαφέροντός μας, είτε αυτή είναι τμήμα γονιδίου είτε είναι τμήμα μηνύματος RNA. Αντίθετα στο Real Time PCR σε κάθε αντίδραση προστίθεται ειδικό μόριο με την ιδιότητα να εκλύει φθορισμό όταν παράγεται προϊόν. Ο φθορισμός αυτός, έχει ένταση ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος που έχει συντεθεί.

Συγκεκριμένα, σε αυτήν την εργασία, η qPCR πραγματοποιήθηκε σε ένα μηχάνημα Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) χρησιμοποιώντας το KAPA SYBR FAST qPCR Kit (Kapabiosystems, USA, cat. no. KK4600) και εκκινητές που σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλων προγραμμάτων, του Primer3 και του PerlPrimer298 (Παράρτημα Ι).

3.5.1 cDNA μήτρα

Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω:

Δείγμα cDNA.....	150 ng*
SYBR green mix.....	1x
5' Εκκινητής.....	0.2 μM
3' Εκκινητής.....	0.2 μM
ddH ₂ O.....	< 20 μL

*Η ποσότητα αναφέρεται στο αρχικό ολικό RNA

Κύκλος	Βήμα	T (°C)	t (min:s)
Αποδιάταξη (Hold)	1°	95	10:00
Πολυμερισμός (Cycling) [x40]	1°	95	00:30
	2°	58-65(*)	00:60
	3°	72	00:30
	4° (**)	xx	00:20
Τήξη (Melt)	Αύξηση από 70°C έως 99°C (0.4°C / κύκλο)		

* Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται υβριδοποίηση εξαρτάται από το κάθε ζευγάρι εκκινητών.

**Η θερμοκρασία στην οποία διαβάζεται το σήμα φθορισμού εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) του εκάστοτε παραγόμενου προϊόντος PCR.

Τα σχετικά επίπεδα mRNA των εμβρυικών γονιδίων υπολογίστηκαν βάσει της συγκριτικής μεθόδου ΔΔCt και αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του γονιδίου στόχου ομαλοποιημένη ως προς το ενδογενές γονίδιο αναφοράς, GAPDH, σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς. Όλα τα εμβρυικά γονίδια (Oct3/4, Sox2, Nanog, Crd-bp, Dazl, h19, Igf2trans3, c-Myc) που διερευνήθηκαν στα MSC ποντικού ομαλοποιήθηκαν προς την Theiler Stage 22 (E13.5), ένα πρώιμο στάδιο του εμβρύου και ταυτόχρονα εύκολα προσβάσιμο, στο οποίο έχει βρεθεί να εκφράζονται όλα τα παραπάνω γονίδια²²⁴. Τα ανθρώπινα εμβρυικά γονίδια (CRD-BP, TET1-3) ομαλοποιήθηκαν προς την σειρά λευχαιμίας K562 που υπερεκφράζει το CRDBP/IMP-1 και εκφράζει σε ικανοποιητικά επίπεδα τα γονίδια της TET οικογένειας. Για τα υπόλοιπα γονίδια (OCT3/4, SOX2, NANOG) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού MCF-7, που τα υπερεκφράζει²²⁵. Τέλος, το δείγμα αναφοράς για την ομαλοποίηση του DAZL ήταν ανθρώπινο σπέρμα.

Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για την ποσοτικοποίηση της σχετικής έκφρασης των ειδικών γονιδίων (Lpl και Bglap) κατά την διαφοροποίηση των MSC ποντικού. Το ενδογενές γονίδιο αναφοράς ήταν πάλι το Gapdh, αλλά στην προκειμένη περίπτωση τα MSC εξετάστηκαν στην αρχή (Day 0, D0) και στο τέλος της διαφοροποίησης (Day 14, D14). Τα επίπεδα έκφρασης στην D14 ομαλοποιήθηκαν προς αυτά της D0. Λιπώδης και οστίτης ιστός ποντικού χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις σαν θετικός μάρτυρας.

3.5.2 DNA μήτρα

Για την ανίχνευση του Sry γονιδίου ειδικού για την παρουσία του Y χρωμόσωματος, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (από 1/10 έως 1/10⁶) BMMNC αρσενικών ποντικών σε BM-MNC θηλυκών. Η ευαισθησία της μεθόδου μας έφτασε το 1 προς 10⁵. 500ng γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την αντίδραση της qPCR. Γενωμικό DNA από θηλυκό ποντίκι χρησιμοποιήθηκε ως

αρνητικός μάρτυρας. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο Παράρτημα I.

3.6 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΈΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ siRNA

Η μέθοδος της κατευθυνόμενης και επιλεκτικής παρεμπόδισης με τη χρήση δίκλωνων μορίων είναι μία από τα πιο διαδεδομένες τεχνικές μοριακής βιολογίας για τη μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων σε κυτταρική καλλιέργεια και *in vivo* σε πειραματόζωα. Ειδικότερα, ένα δίκλωνο RNA μόριο (siRNA) συντίθεται με αλληλουχία συμπληρωματική για το γονίδιο-στόχο και εισάγεται μέσα σε ένα κύτταρο ή οργανισμό, όπου αναγνωρίζεται ως εξωγενές γενετικό υλικό και ενεργοποιεί το μονοπάτι RNAi. Μέσω του μηχανισμού αυτού προκαλείται δραστική και επιλεκτική μείωση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου. Μελετώντας τα αποτελέσματα της μείωσης αυτής μπορεί να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος του γονιδιακού προϊόντος.

Για την επιμόλυνση των MSC χρησιμοποιήθηκε το siIMPORTER Transfection Reagent (Upstate, Millipore, USA, cat. no. 64-101,) και ειδικά μόρια si που σχεδιάσαμε (Παράρτημα I). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ των μορίων siRNA και των λιπιδίων που περιέχονται μέσα στο διάλυμα siIMPORTER, ο οποίος προάγει την αυξημένη πρόσληψη τους από την ευκαρυωτική μεμβράνη. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

A) Επιλέγονται τα καταλληλότερα siRNA μόρια και τα αντίστοιχα πειραματικά controls:

- ✓ αρνητικό siRNA control στην ίδια συγκέντρωση με το ειδικό siRNA μόριο
- ✓ ένα σημειωμένο siRNA που φθορίζει, αλλά είναι μη ειδικό, το οποίο ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής

B) Βελτιστοποιούνται οι συνθήκες για να έχουμε τα υψηλότερα επίπεδα επιλεκτικής παρεμπόδισης:

- ✓ πυκνότητα της καλλιέργειας στην οποία θα υποστούν τα κύτταρα την δοκιμασία
- ✓ αναλογία του siRNA προς siIMPORTER προς τον διαλύτη του και
- ✓ καθορισμό των σωστών χρονικών σημείων στα οποία επιτυγχάνεται η μέγιστη μείωση της έκφραση του γονιδίου-στόχου, η οποία διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα μόρια λόγω της διαφορετικής ημιζωής τους.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα εργασία έχει ως εξής:

- Μια ημέρα πριν την δοκιμασία απλώνουμε τα κύτταρα με πυκνότητα 40-60% σε καλλιεργητικό μέσο,
- Την ημέρα της δοκιμασίας ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS και αντικαθιστούμε το καλλιεργητικό υλικό με ίση ποσότητα καλλιεργητικού μέσου Optimem (Gibco), χωρίς FCS.
- Διαλύουμε σε ένα μικροσωληνάριο τύπου Eppendorf το siIMPORTER™ σε Optimem και αναμειγνύουμε
- Σε ένα άλλο eppendorf αναμειγνύουμε Optimem, διαλύτη siRNA και siRNA μόριο (Παράρτημα Ι) με τελική συγκέντρωση 100 nM και μεταφέρουμε στο μείγμα που φτιάξαμε στο προηγούμενο βήμα.
- Επωάζουμε σε RT 5-10 min για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο και μεταφέρουμε το μείγμα στα κύτταρα.
- Επωάζουμε στους 37° για πέντε ώρες οπότε προσθέτουμε καλλιεργητικό υλικό με 20% FCS
- 24 με 96 ώρες μετά την δοκιμασία εξετάζουμε την έκφραση των γονιδίων υπό διερεύνηση με qPCR.

3.7 DNA ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Αρχικά ανακτήθηκε η αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου του CRD-BP/IMP1 χρησιμοποιώντας την ιστοσελίδα: <http://www.ensembl.org/index.html>. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της περιοχής του υποκινητή του CRD-BP/IMP1 για την εύρεση περιοχών πλούσιων σε CpG αξιοποιώντας την ιστοσελίδα: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>, εντοπίστηκαν δύο περιοχές ενδιαφέροντος περίπου 1kb ανάντη της θέσης έναρξης μεταγραφής (transcription start site, TSS) και σχεδιάστηκαν εκκινητές ειδικοί για αυτές τις περιοχές (Παράρτημα I).

Το hMeDIP (cat no. AF-110-0016) και το Medip (cat no. Mc-green-001) κιτ από την Diagenode (<http://www.diagenode.com/en/index.php>) χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση, υδροξυμεθυλιωμένου και μεθυλιωμένου DNA, αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, γενωμικό DNA απομονώθηκε και τεμαχίστηκε με υπερήχους χρησιμοποιώντας τον Ultrasonic, BRANSON200 sonicator. 1 µg τεμαχισμένου DNA, αποδιατάχτηκε για 10 min στους 95°C και επωάστηκε για 16 ώρες στους 4°C με ειδικό αντίσωμα συνδεδεμένο με μικροσφαιρίδια εναντίον του υδροξυμεθυλιωμένου ή μεθυλιωμένου DNA. Ακολουθεί και απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων με πλύσιμο και επαναιωρήση των μικροσφαιριδίων στο ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα. Το ανοσοκατακρημνισμένο DNA εκλύεται με βράσιμο στους 95°C με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για το hMeDIP κιτ και με την χρήση στήλης για το Medip κιτ. Ακολουθεί ανάλυση με qPCR, κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ WESTERN BLOT

3.8.1 Απομόνωση και Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης του Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος

5×10^5 MSC και 5×10^6 PBMC ή K562 πλένονται δις με PBS και κατακρημνίζονται στις 500 x g για 5min. Στο ίζημα προστίθενται 50μl ρυθμιστικό διάλυμα RIPA αναμεμιγμένο με πρωτεϊνικούς αναστολείς (Παράρτημα Ι). Το μείγμα, λόγω της κολλώδους υφής του, περνιέται από σύριγγα με βελόνες 19G, 21G και τελικά 23G. Φυγοκεντρούμε στις 14000 rpm για 15min και διατηρούμε το υπερκείμενο στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το Dc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, cat. no. 500-0112). Προετοιμάζονται αραιώσεις του προτύπου διαλύματος αλβουμίνης ορού (BSA) που καλύπτουν το εύρος τιμών 0.2mg/ml έως 1.5mg/ml (από τρεις έως πέντε ανά μέτρηση), οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Για κάθε μέτρηση αναμειγνύονται 100μl από το δείγμα μας ή από το πρότυπο διάλυμα με 500μl αντιδραστήριου Α, το οποίο είναι αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού και με 4ml αντιδραστήριου Β, το οποίο είναι φολίνη. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min και στη συνέχεια μετράται η απορρόφησή του στα 750nm σε φωτόμετρο.

3.8.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών/ Μεταφορά σε μεμβράνη

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες αποδιάταξης σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, όπως περιγράφεται στο βιβλίο των Sambrook²²⁶. Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NuPAGE 4-12% Bis-Tris από την Invitrogen και χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ίση ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα ανάγεται σε τελικό όγκο 20μL με ανάμειξή της με ρυθμιστικό διάλυμα Laemli (Bio-Rad Laboratories, Inc., cat. no. 161-0737) και β-μερκαπτοεθανόλη, σύμφωνα με τις

οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα βράζονται για 10 min και ηλεκτροφορούνται στα 200V για περίπου μια ώρα.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη γίνεται με ηλεκτρομεταφορά, χρησιμοποιώντας το σύστημα iBlot Dry Blotting της Invitrogen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη (PVDF) φυλάσσεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί για ανοσοσύτπωση.

3.8.3 Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών με τη χρήση χημειοφωταύγειας

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ειδική αντίδραση της πρωτεΐνης που μελετάται (αντιγόνο) με ειδικό μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα που την αναγνωρίζει (1ο αντίσωμα). Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζεται από άλλο μη ειδικό αντίσωμα (2ο αντίσωμα) το οποίο φέρει προσδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase). Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας η οποία ανιχνεύεται με τη βοήθεια ειδικών ευαίσθητων film. Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά αντιδραστήρια ECL Western Blotting Detection (Amersham, GE Healthcare, USA) και τα βήματα που ακολουθήθηκαν διαγραμματικά παρατίθενται παρακάτω.

Η μεμβράνη με τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες επωάζεται για 2 ώρες σε διάλυμα 5% v/w πρωτεΐνης γάλακτος, 0.1% v/v Tween 20 (Applichem) σε TBS, σε RT. Έτσι, μπλοκάρονται όλες οι κενές θέσεις της μεμβράνης για να αποτραπεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης για 4x10 min με διάλυμα TBS–0.1% v/v Tween 20. Στη συνέχεια προστίθεται το πρώτο αντίσωμα (ειδικό για κάθε αντιγόνο που μελετάται, σε κατάλληλη αραίωση, μέσα σε διάλυμα TBS). Η μεμβράνη επωάζεται με αυτό για 16 ώρες στους 4°C με ανάδευση και έπειτα πλένεται όπως προαναφέρθηκε. Ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου, μη ειδικού αντισώματος επίσης σε διάλυμα TBS και επώαση για 2 ώρες σε RT. Η μεμβράνη

πλένεται ξανά για 4x10 min με διάλυμα TBS–0.1% v/v Tween 20 και έπειτα προστίθεται η λουμινόλη και ενισχυτικά της αντίδρασης, για 1' σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραγωγή χημειοφωταύγειας αποτυπώνεται σε ειδικό φιλμ (Biomax light Film, Kodak, USA, cat. no. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή φαίνονται στο Παράρτημα Ι. Σαν μάρτυρας της ποσότητας και της ποιότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κάθε δείγματος, μετράται η β-ακτίνη ή η β-τουμπουλίνη.

4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας έγιναν με την χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 5.0 (www.graphpad.com). Κυρίως χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Όπου οι τιμές μέτρησης προέρχονταν από το ίδιο δείγμα δηλαδή κυρίως κατά την ανακαλλιέργεια και την διαφοροποίηση των MSC πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε ζεύγη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά, λειτουργικά καθώς και για την έκφραση σημαντικών εμβρυικών γονιδίων, MSC από το ποντίκι και τον άνθρωπο. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι χρησιμοποιήθηκαν MSC από δυο διαφορετικούς οργανισμούς για να υπάρχει η δυνατότητα πληρέστερου σχεδιασμού της μελέτης μας.

Η λεπτομερής μελέτη της επίδρασης της ηλικίας και του φύλου γίνεται πιο εφικτή σε ένα σύστημα ελεγχόμενο, σαν το ποντίκι, όπου μπορούμε να έχουμε πρόσβαση σε μεγάλο αριθμό δοτών MSC χωρίς βιοηθικούς περιορισμούς.

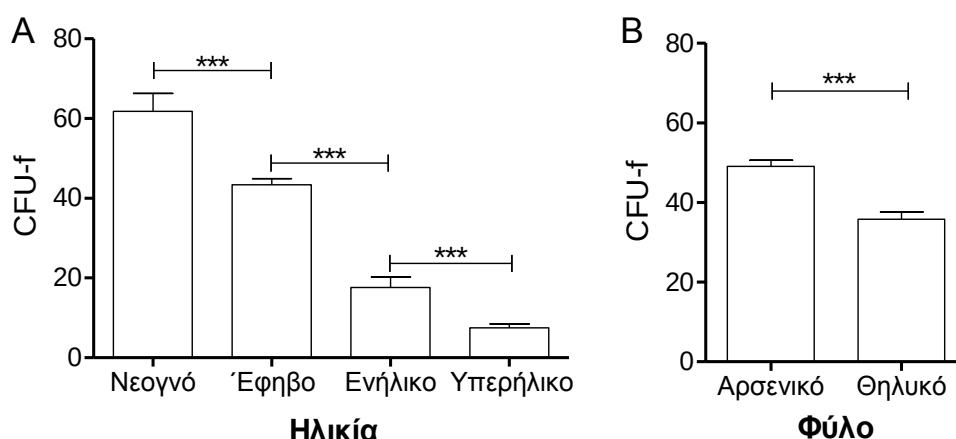
Από την άλλη, τα ανθρώπινα MSC μελετήθηκαν σε σχέση με τον ιστό προέλευσης, αφού είναι σημαντικό να χαρακτηριστούν ενδελεχώς οι διάφοροι πληθυσμοί ώστε να είναι δυνατή η καλύτερη χρήση τους σε πιθανά πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας.

Βέβαια κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά, όπως η διερεύνηση της έκφρασης των εμβρυικών γονιδίων έγιναν τόσο στο ανθρώπινο όσο και στο ποντικίσιο σύστημα, ώστε η μελέτη να είναι συγκριτική.

1. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ MSC ΑΠΟ ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

Βιβλιογραφικά οι απόψεις δίστανται για το πώς επηρεάζει η ηλικία και η καλλιέργεια τις διάφορες ιδιότητες των MSC. Επιπλέον υπάρχουν λίγες εργασίες που έχουν ασχοληθεί με το αν το φύλο είναι ένας σημαντικός παράγοντας της φυσιολογίας των MSC. Επιλέξαμε BALB/c ποντίκια, γένος που χρησιμοποιείται συχνά σε προ-κλινικά μοντέλα, και διερευνήσαμε κατά πόσο το φύλο και η ηλικία επηρεάζουν: α) τον ενδογενή πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων στον μυελό των οστών, β) τις φαινοτυπικές και πολλαπλασιαστικές ικανότητες των απομονωμένων και *in vitro* καλλιεργημένων MSC, γ) τις λειτουργικές ικανότητες των κυττάρων αυτών και δ) την έκφραση σημαντικών βλαστικών δεικτών. Ηλικιακά τα ζώα χωρίστηκαν σε

4 ομάδες κατά το εγχειρίδιο “The mouse in biomedical Research”: νεογνά (≤ 4 εβδομάδων), έφηβα (1μήνος- 3μηνών) ενήλικα (4- 9μηνών) και υπερήλικα (18- 24 μηνών)²²⁷. Τα *in vitro* καλλιεργημένα MSC χωρίστηκαν επίσης σε ομάδες, ανάλογα με τις ανα-καλλιέργειες που είχαν υποστεί (passage, p 3-7, 8-12, 13-17 και 18-25). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 9 πειραματόζωα ανά κατηγορία.



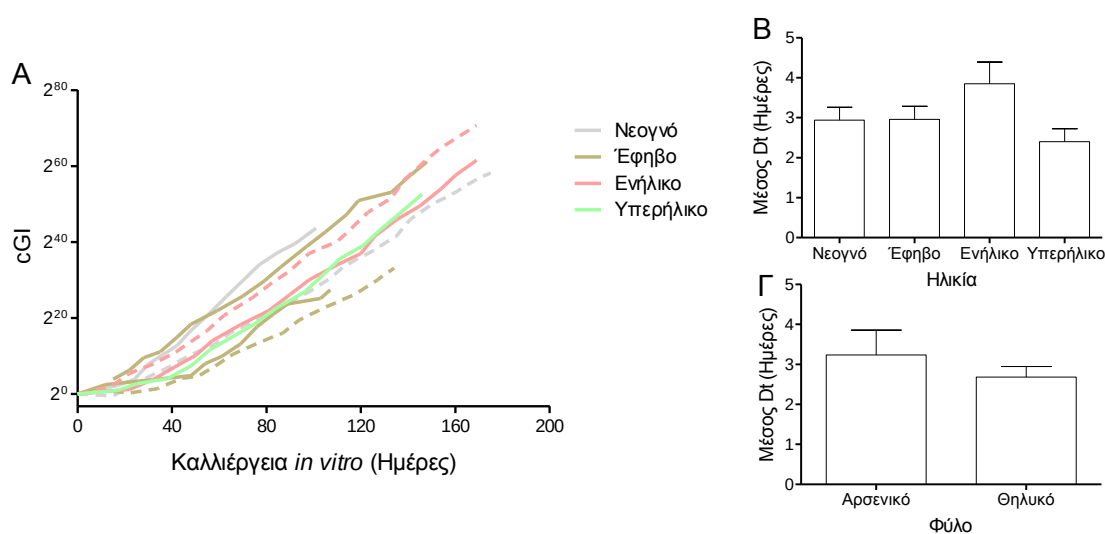
Σχήμα 1. Συχνότητα mMSC στον μυελό. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο αριθμό ($\pm$ SEM) CFU-f ανά 10^6 BM-MNC σε σχέση με την ηλικία (A) και το φύλο (B), (*P < 0.05, **P < 0.01 και ***P < 0.001).

1.1 ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν ο καθορισμός του ενδογενή αριθμού των βλαστικών/προγονικών κυττάρων στον μυελό των οστών. Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία CFU-f την ημέρα 0, δηλαδή την ημέρα της απομόνωσης των MSC από τον μυελό, και ο αριθμός των αποικιών που σχηματιστήκαν υπολογίσθηκε ανά 10^6 BM-MNC. Παρατηρήθηκε μεγάλη στατιστική διαφορά στον αριθμό του ενδογενή πληθυσμού MSC ανάμεσα στις διάφορες ηλικίες απομόνωσης και μεταξύ των δύο φύλων. Ο ενδογενής πληθυσμός των MSC φαίνεται να μειώνεται σημαντικά με την ηλικία. Δηλαδή, ο αριθμός των αποικιών που σχηματιστήκαν στην CFU-f δοκιμασία ήταν πολύ μεγαλύτερος στα νεογνίδια ποντίκια σε σχέση με τα έφηβα, τα ενήλικα και τα γέρικά ποντίκια αλλά και αναμεταξύ

τους (Σχήμα 1Α). Στο Σχήμα 1Β φαίνεται ενδεικτικά ο αριθμός των ινοβλαστικών αποικιών των θηλυκών και αρσενικών ποντικών στην εφηβεία. Τα θηλυκά ποντίκια είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό MSC σε σχέση με τα αρσενικά, σε όλες τις ηλικίες των πειραματόζων που ελέγχθηκαν (νεογνά, έφηβα, ενήλικα και υπερήλικα).

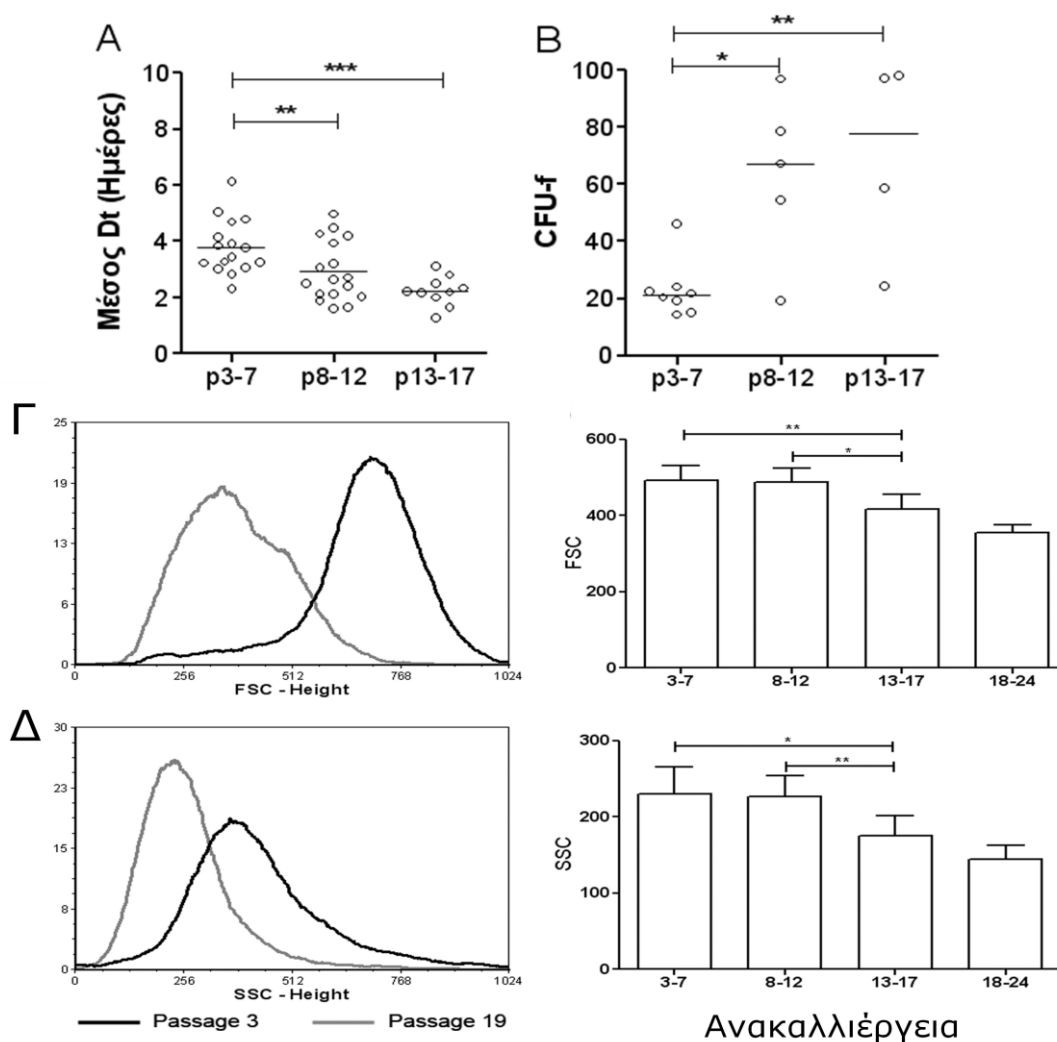
Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των MSC *in vitro*. Παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι μετά την επιλογή ενός καθαρού MSC πληθυσμού (αρνητικού για CD11b και CD45), γύρω στην ανακαλλιέργεια 2-3, ο ρυθμός ανάπτυξης των MSC δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο φύλλων ούτε και ανάμεσα στις διάφορες ηλικίες (Σχήμα 2Α). Η πληροφορία αυτή επαληθεύτηκε και με τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού που όπως φαίνεται στα Σχήματα 2Β και 2Γ είναι σχεδόν ίδιος ανεξάρτητα από την ηλικία καθώς και το φύλο του δότη, αντίστοιχα.



Σχήμα 2. Ρυθμός Ανάπτυξης των mBM-MSC *in vitro*. (Α) cG1 αντιπροσωπευτικών καλλιεργειών mBM-MSCs διαφορετικών ηλικιών. Μέσος χρόνος διπλασιασμού όλων των mBM-MSC καλλιεργειών ανα ηλικία (Β) και ανα φύλο (Γ).

Αντίθετα ο χρόνος διπλασιασμού φαίνεται να μειώνεται κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό (ανακαλλιέργεια) των BM-MSC. Δηλαδή ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των MSC είναι πιο αυξημένος στα προχωρημένα περάσματα

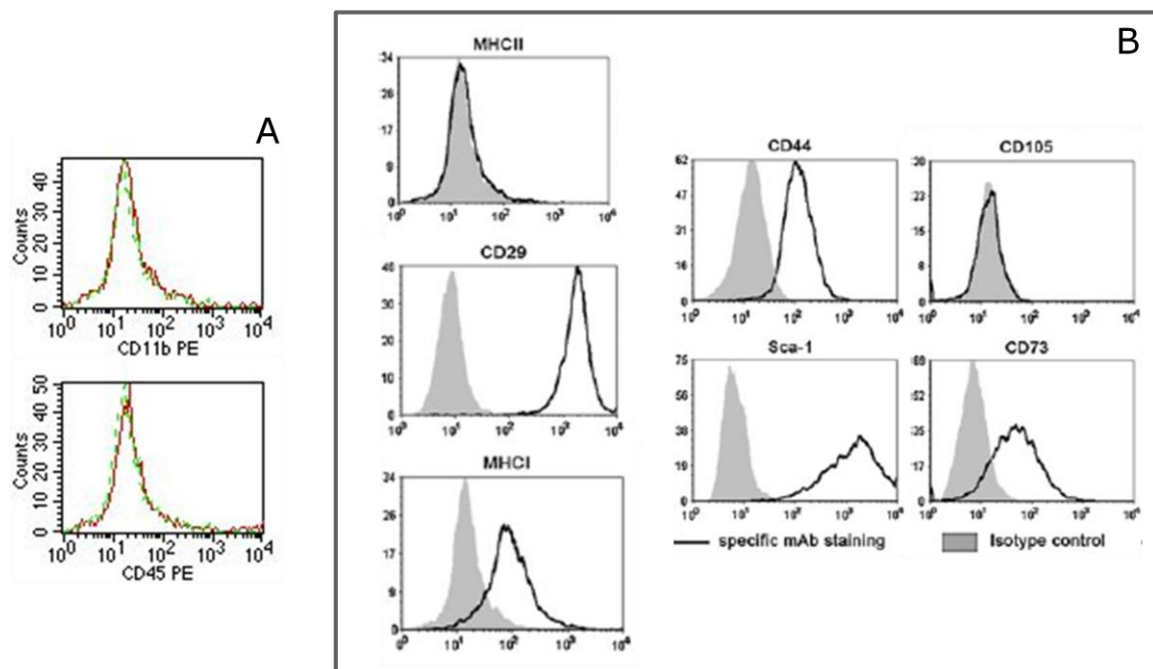
p13-17 σε σχέση με τα αρχικά p 3-7 (Σχήμα 3Α). Η παρατήρηση αυτή επαληθεύθηκε και με την δοκιμασία CFU-f, ο αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν ανά 100 MSC που καλλιεργήθηκαν ήταν τριπλάσιος (69.45 ± 17.6 SEM) στα p 13-17 σε σχέση με αυτόν στην αρχή της καλλιέργειας (p 3-7) που ήταν κατά μέσο όρο 22.85 ± 3.5 (Σχήμα 3Β). Μια άλλη σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, κατά την *in vitro* καλλιέργεια των BM-MSC, ήταν η συνεχής μείωση του μεγέθους (Σχήμα 3Γ) και της πολυπλοκότητας (Σχήμα 3Δ) των BM-MSC στα προχωρημένα περάσματα σε σχέση με τα αρχικά.



Σχήμα 3. Επίδραση της διάρκειας της *in vitro* καλλιέργειας: **(Α)** Στον μέσο χρόνο διπλασιασμού των *mBM-MSC*, **(Β)** στον μέσο αριθμό των αποικιών που σχηματίστηκαν ανά 100 MSC, **(Γ)** στο κυτταρικό μέγεθος και **(Δ)** στην κυτταρική πολυπλοκότητα. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

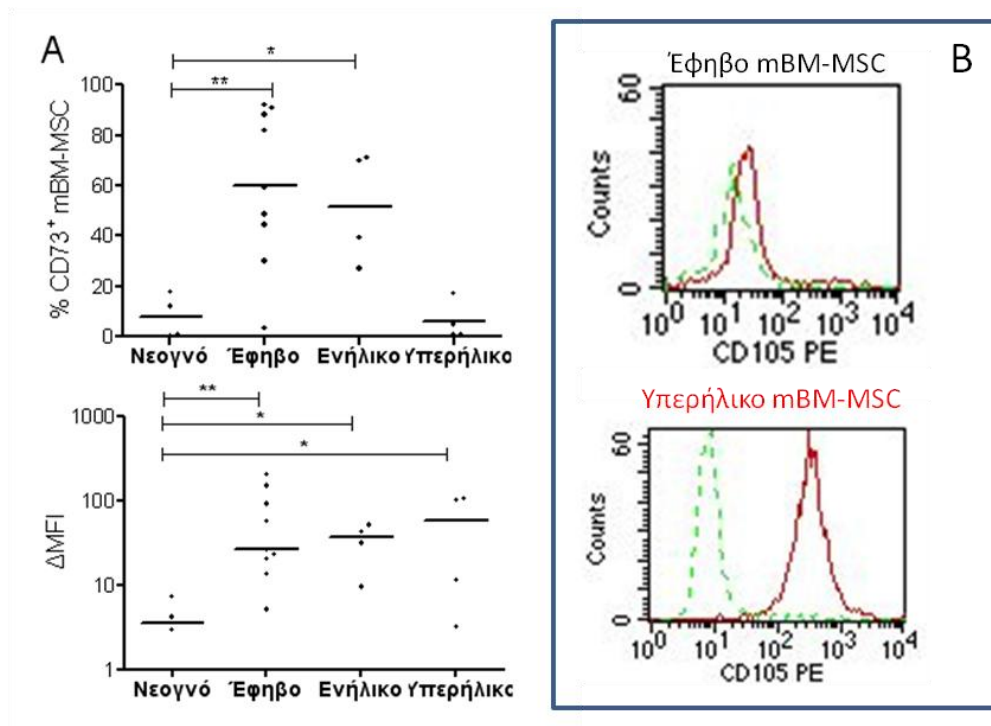
1.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Είναι ευρέως γνωστό πως η δυσκολία στην απομόνωση των MSC από τον μυελό των οστών του ποντικού βρίσκεται στην επιμόλυνση της καλλιέργειας με μακροφάγα/ μονοκύτταρα, κύτταρα παρομοίων ιδιοτήτων με τα MSC (μορφολογίας και προσκόλλησης στο πλαστικό) τα οποία όμως διαφέρουν από τα MSC στην κοκκίωση (τα MSC έχουν μικρότερη κοκκίωση) και στην έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD45 και CD11b, για τους οποίους τα MSC είναι αρνητικά. Στο p0, δηλαδή σχεδόν 2 εβδομάδες μετά την απομόνωση των κυττάρων από το BM υπάρχει σχεδόν 50% επιμόλυνση η οποία γίνεται μηδενική γύρω στις 6 εβδομάδες (p2). Η επιμόλυνση εξαλείφεται με τη χρήση θρεπτικού υλικού (RPMI) που περιορίζει την ανάπτυξη των μακροφάγων ενώ ευνοεί τα MSC, και με την χρήση τρυψίνης για περιορισμένο χρονικό διάστημα (μόνο για 2 λεπτά), κατά το οποίο τα μακροφάγα δεν ξεκολλούν και συνεπώς επιλέγεται ο MSC πληθυσμός.



Σχήμα 4. Ιστογράμματα ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος mBM-MSC στο p5. Χρώση (A) για τους απαραίτητους αρνητικούς δείκτες και (B) για τους κλασσικούς ειδικούς δείκτες επιφανείας.

Ως εκ τούτου, ο χαρακτηρισμός των MSC πληθυσμών ξεκινάει από το p2. Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα, ενός τυχαίου δείγματος, για τον κάθε επιφανειακό δείκτη φαίνονται στο Σχήμα 4. Όλα τα BM-MSC ανεξάρτητα από την ηλικία και το φύλο ήταν αρνητικά για τα CD45, CD11b και MHCII μόρια επιφανείας και παρέμειναν έτσι καθ'όλη την διάρκεια της καλλιέργειας τους. Επιπλέον, ήταν θετικά σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% για τους γνωστούς δείκτες επιφανείας CD29, CD44, MHCI και Sca-1. Από την άλλη η έκφραση του CD73 και του CD105, απαραίτητων δεικτών επιφανείας των ανθρώπινων MSC αλλά με λιγότερο ξεκάθαρο ρόλο στα MSC του ποντικού, εκφράζονταν σε χαμηλά ή σε μηδενικά ποσοστά, αντίστοιχα, στα BM-MSC ποντικού.



Σχήμα 5. Επίδραση της ηλικίας στον φαινοτυπο των mBM-MSC. (Α) Τα ποσοστά των CD73 θετικών κυττάρων είναι υψηλά στα έφηβα και ενήλικα ζώα ενώ η μεση ένταση φθορισμού έχει την υψηλότερη τιμή της στα υπερηλικά ζώα (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$). **(Β)** Τα mBM-MSC των υπερηλικών ζώων είναι τα μόνα που εκφράζουν το CD105 (το πράσινο ιστόγραμμα είναι ο αρνητικός μάρτυρας και το κόκκινο είναι το δείγμα).

Ο φαινότυπος των BM-MSC για τα CD29, CD44 και Sca-1 μόρια επιφανείας ήταν ανεξάρτητος από την ηλικία (Συμ. Σχήμα 1). Παρατηρήθηκε όμως αύξηση του ποσοστού έκφρασης καθώς και της μέσης τιμής φθορισμού του CD73 στα BM-MSC απομονωμένα από νεογνά ποντίκια σε σχέση με αυτά από τα ενήλικα και τα ηλικιωμένα (Σχήμα 5A). Μεγάλο ενδιαφέρον είχε και η εκφραση του CD105, που ενω ήταν αρνητική σε όλες τις ηλικίες, όλα τα mBM-MSC των υπερηλικων ποντικών βρέθηκαν να την εκφράζουν. Αντιπροσωπευτικό ιστογράμμο απο mBM-MSC έφηβου και υπερήλικου ποντικού φαίνεται στο Σχήμα 5B.

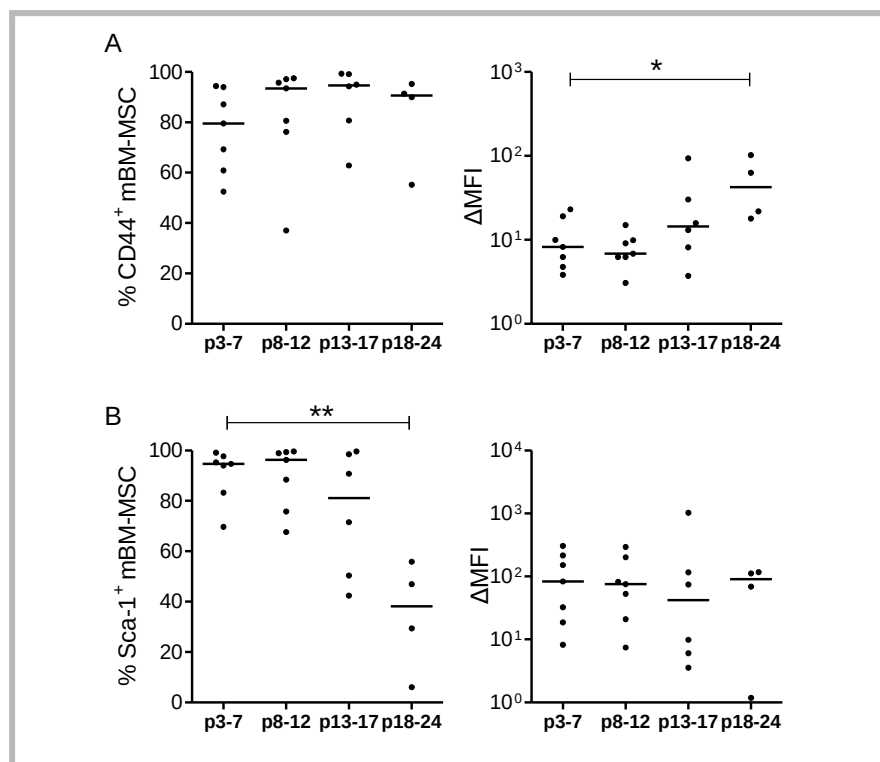
Κατά την *in vitro* καλλιέργεια των MSC παρατηρήθηκαν διαφορές: α) στα ποσοστά έκφρασης του Sca-1, που παρουσίασαν μείωση στα προχωρημένα περάσματα (p 13-24) σε σύγκριση με τα αρχικά (p3-7), β) στη μέση τιμή φθορισμού του CD44 στην οποία υπήρξε αύξηση στα προχωρημένα περάσματα (Σχήμα 6). Στο Συμπληρωματικό Σχήμα 2 φαίνονται τα ποσοστά και τα ΔΜFI των υπόλοιπων επιφανειακών δεικτών των mBM-MSC.

1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

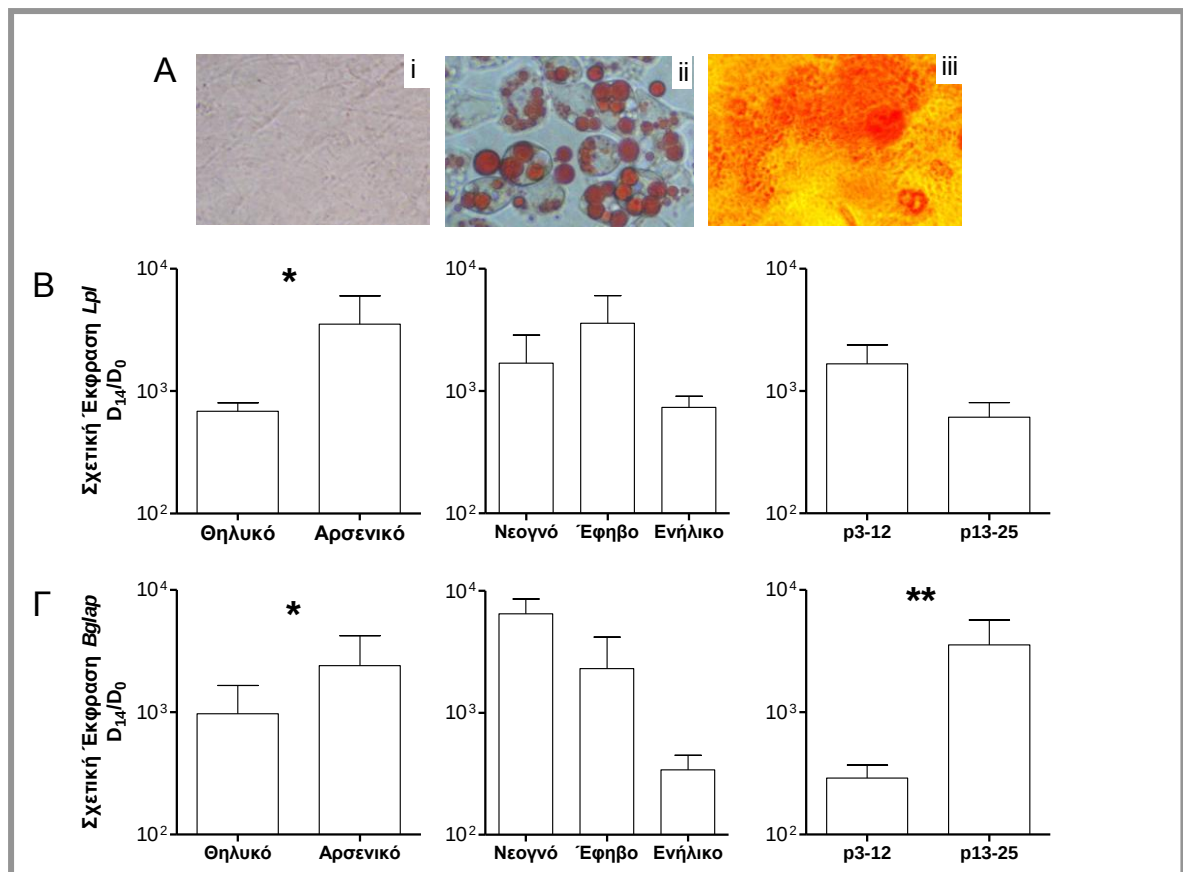
1.3.1 Διαφοροποίηση

Όλα τα δείγματα BM-MSC που εξετάστηκαν, ανεξαρτήτως φύλου, ηλικίας και passage, διαφοροποιήθηκαν σε οστεοβλάστες και λιποκύτταρα. Το ποσοστό διαφοροποίησης, όπως υπολογίστηκε με μικροσκοπική παρατήρηση μετά από την κατάλληλη χρώση με OilRedO ειδική για τα λιπίδια και Alizarin RedS ειδική για εναποθέσεις αλάτων ασβεστίου, κυμαινόταν μεταξύ 40-100% (Σχήμα 7Aii και 7Aiii, αντίστοιχα). Τα ποσοστά αυτά επαληθεύτηκαν με την μέθοδο της ποσοτικής PCR, με την οποία υπολογίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων ειδικών για τα λιπο-κύτταρα (λιπο-πρωτεϊνική λιπάση, *Lpl*) και τα οστεοκύτταρα (οστεοκαλσίνη, *Bglap*) κατά την 14^η ημέρα της διαφοροποίησης.

Τα BM-MSC που απομονώθηκαν από αρσενικά ποντίκια είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και των δυο γονιδίων σε σχέση με τα BM-MSC των θηλυκών ποντικών. Από την άλλη, η ηλικία φάνηκε να μην επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα για διαφοροποίηση των *in vitro* καλλιεργημένων BM-MSC, παρατηρήθηκε όμως τάση μείωσης της διαφοροποίησης των BM-MSC προς οστεοκύτταρα με την αύξηση της ηλικίας. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα λιπο-πρωτεϊνικής λιπάσης (*Lpl*) ενώ βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης οστεοκαλσίνης (*Bglap*) κατά την διαφοροποίηση των BM-MSC στα προχωρημένα περάσματα συγκριτικά με τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας ((Σχήμα 7B και Γ).



Σχήμα 6. Επίδραση της διάρκειας της *in vitro* καλλιέργειας στον φαινότυπο των mBM-MSC. Η εκτεταμένη *in vitro* καλλιέργεια επιφέρει σημαντική αύξηση στον συνολικό αριθμο CD44 αντιγόνων ανα κύτταρο (* $P < 0.05$) (A), αλλά επιφέρει σημαντική μείωση στο ποσοστό Sca-1⁺ κυττάρων (** $P < 0.01$) (B).

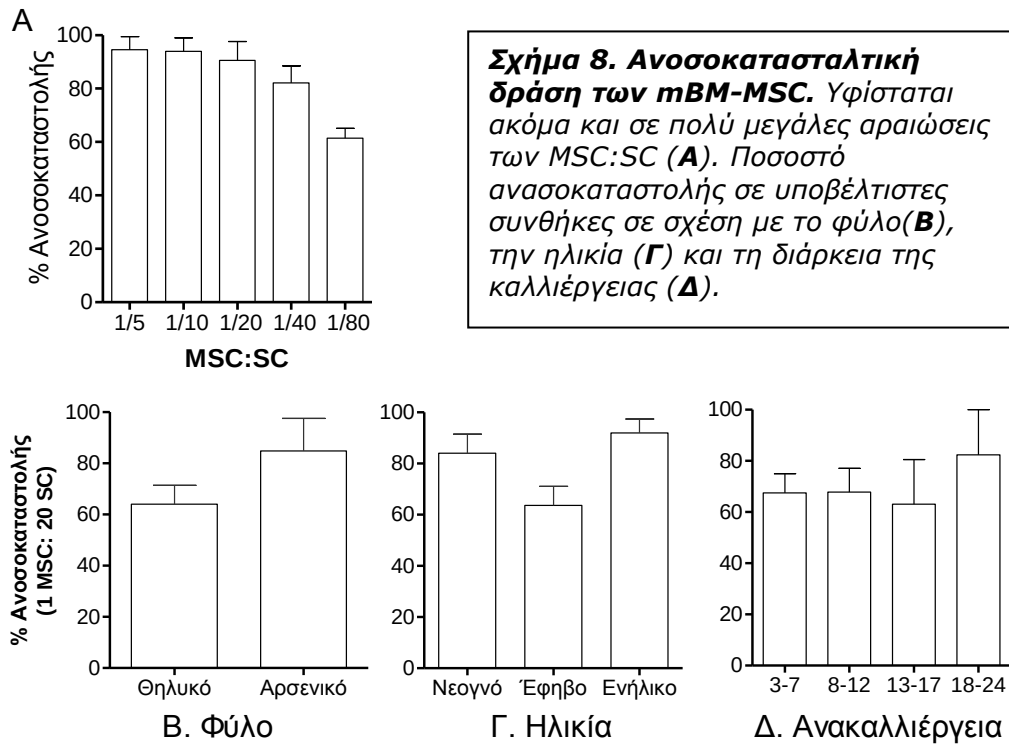


Σχήμα 7. Δυναμικό διαφοροποίησης των mBM-MSC. (Α) Μακροσκοπική παρατήρηση: κύτταρα καλλιεργημένα υπό κανονικές συνθήκες (i), διαφοροποιημένα προς λιποκύτταρα (ii) και οστεοβλάστες (iii) (Μεγέθυνση: $\times 40$). Σχετική έκφραση της Λιποπρωτεϊνικής Λιπάσης **(Β)** και της Οστεοκαλσίνης **(Γ)** ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την διάρκεια της καλλιέργειας. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή έκφρασης των γονιδίων $\pm$ SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

1.3.2 Ανοσοκαταστολή

Η ανοσοκατασταλτική δράση των MSC μελετήθηκε *in vitro*, εξετάζοντας την αναχαίτιση της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων του σπλήνα μέσω του TCR συμπλόκου. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αναλογίες BM-MSC προς σπληνοκύτταρα, από την 1:5 έως την 1:80. Σε όλες αυτές τις αραιώσεις τα BM-MSC προκάλεσαν ανοσοκαταστολή (Σχήμα 8Α).

Μιας και σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε $\geq 95\%$ ανοσοκαταστολή στις αραιώσεις 1:5 και 1:10 (MSC προς SC), χρησιμοποιήθηκαν υποβέλτιστες συνθήκες για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε πιθανές διαφορές ανάμεσα στις παραμέτρους που εξετάστηκαν.



Ειδικότερα επιλέχθηκε η αραιώση 1:20 όπου το ποσοστό καταστολής κυμαίνονταν από 60% έως 100%. Οι μικρές μεταβολές που εντοπίστηκαν, μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών MSC (Σχήμα 8B), ανάμεσα στις διαφορετικές ηλικιακές ομάδες που εξετάστηκαν (Σχήμα 8Γ), καθώς και σε σχέση με τον αριθμό των ανακαλλιεργειών που είχαν υποστεί τα MSC (Σχήμα 8Δ) ήταν χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, τα θηλυκά mBM-MSC τείνουν να είναι λιγότερο καλοί ανοσοκατασταλείς *in vitro* σε σχέση με τα MSC αρσενικών ποντικών ($p=0.0817$) αλλά και τα εφηβικά MSC έχουν μειωμένη ανοσοκατασταλτική δράση ($63.7\% \pm 7.4$) σε σχέση με τα MSC απομονωμένα από νεογνίδια ($84.02\% \pm 7.5$) ή ενήλικα ποντίκια ($91.96\% \pm 5.4$). Βέβαια, αυτές οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

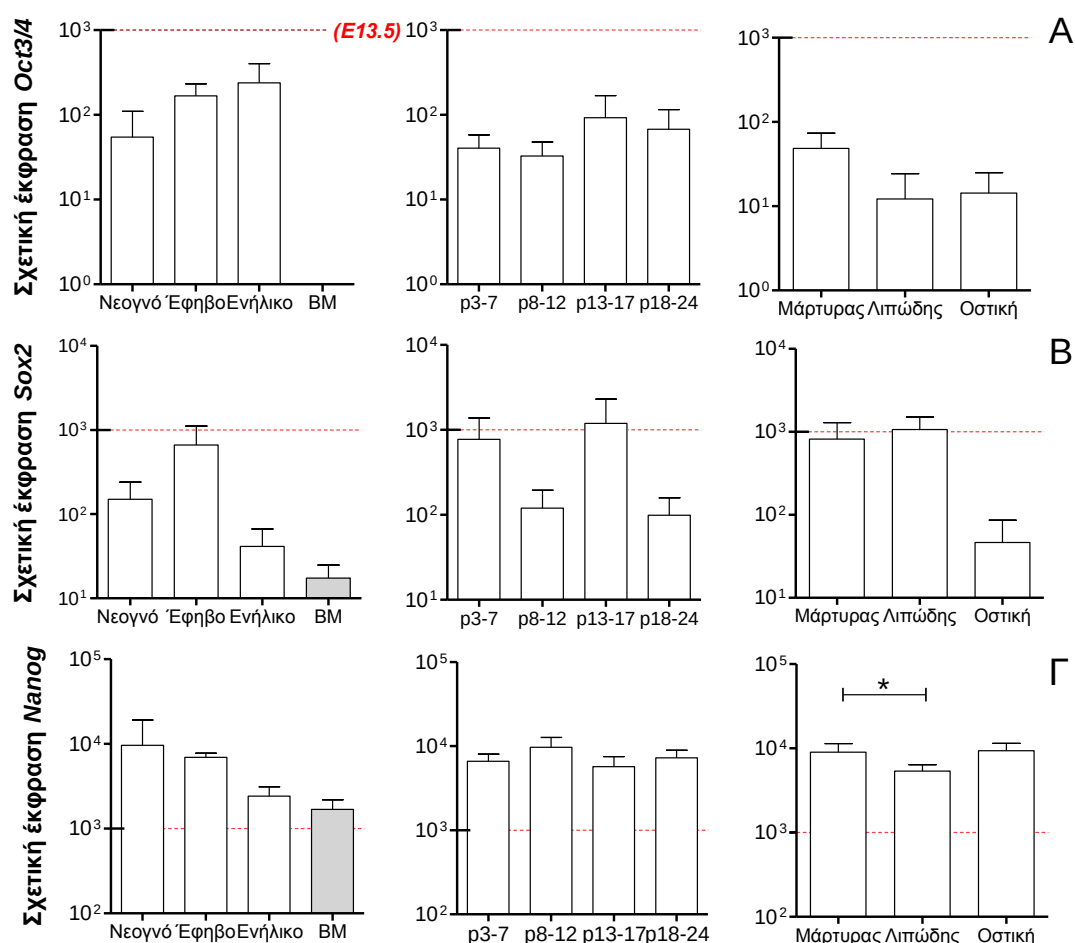
1.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

BM-MSC ποντικού εξετάστηκαν για την έκφραση των: Oct3/4, Sox-2 και Nanog, σημαντικών γονιδίων πολυδυναμικότητας, καθώς και για το Dazl και Crd-br, εμβρυικών γονιδίων με πιθανό ρόλο στα βλαστοκύτταρα. Αρχικά εξετάστηκαν διάφορα τυχαία δείγματα για την πιστοποίηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών σε σχέση με το θετικό μας μάρτυρα (E13.5). Στο Συμπληρωματικό Σχήμα 3Α φαίνονται τα προϊόντα του qPCR όπως έχουν τρέξει σε γέλη αгарόζης. Τα γονίδια Oct3/4 και Sox2 ανιχνεύτηκαν σε χαμηλά επίπεδα και όχι στο σύνολο των δειγμάτων αλλά στο 80%. Το Dazl ανιχνεύτηκε επίσης σε χαμηλά επίπεδα αλλά σε όλα τα δείγματα. Αντιθέτως το Nanog και το Crd-br ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 9Α και 9Β, αντίστοιχα, η έκφραση των Oct3/4 και Sox2 παρουσιάζει μια διακύμανση η οποία όμως δεν φαίνεται να συσχετίζεται με καμία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Αντιθέτως τα επίπεδα έκφρασης του Nanog τείνουν να μειώνονται όσο αυξάνεται η ηλικία του δότη (νεογνό: 9634 ± 4761 > έφηβο: 6940 ± 826.4 > ενήλικο: 2419 ± 698.4 , μέση τιμή $\pm$ SEM). Επίσης, φάνηκε ότι κατά την διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας η έκφραση του διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Μείωση των επιπέδων του Nanog παρατηρήθηκε κατά την διαφοροποίηση των mBM-MSC προς λιποκύτταρα (Σχήμα 9Γ). Το Dazl παρουσίασε αυξητική τάση με την ηλικία ($p=0.0798$), καμία όμως άλλη σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε (Συμπλ.Σχήμα 3Β).

Το μοτίβο έκφρασης του Crd-br, όσον αφορά την ηλικία ήταν παρόμοιο με αυτό του Nanog. Τα mBM-MSC απομονωμένα από ενήλικα ποντίκια βρέθηκαν να εκφράζουν το Crd-br σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά απομονωμένα από έφηβα ποντίκια ($p=0.0243$, Σχήμα). Η έκφραση του Crd-br διατηρήθηκε υψηλή καθ'όλη την διάρκεια της καλλιέργειας των mBM-MSC. Κατά την διαφοροποίηση των MSC προς οστεοβλάστες η έκφραση του Crd-br αυξήθηκε σημαντικά ενώ δεν

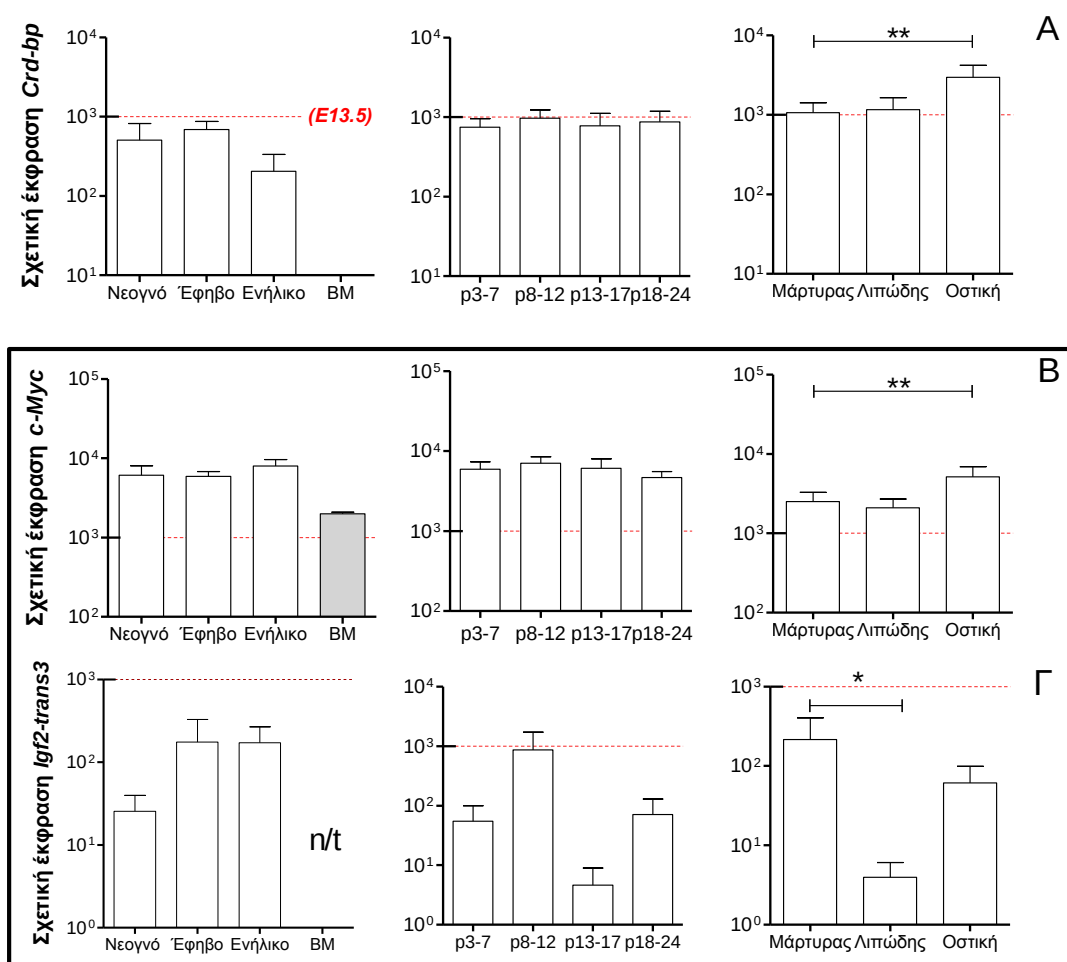
επηρεάστηκε κατά την λιπογένεση. Είναι σημαντικό να τονίσουμε εδώ πώς το Crd-br ήταν το μόνο από αυτά τα γονίδια που δεν βρέθηκε να εκφράζεται στα BM-MNC ποντικού (Σχήμα 10Α).



Σχήμα 9. Έκφραση εμβρυικών βλαστικών δεικτών στα mBM-MSC. Μέση τιμή ($\pm$ SEM) της γονιδιακής έκφρασης του Oct3/4 (Α), Sox2 (Β) και Nanog (Γ), σε σχέση με την ηλικία του δότη, την διάρκεια της καλλιέργειας και κατά τη διαφοροποίηση. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τον θετικό μάρτυρα. Η γκρί στήλη αντιπροσωπεύει την έκφραση σε ολικό μυελό των οστών (* $P < 0,05$).

Η ειδική αυτή έκφραση του γονιδίου της Crd-br στα BM-MSC μας προέτρεψε να εξετάσουμε και την έκφραση άλλων εμβρυικών γονιδίων που έχουν ταυτοποιηθεί ως στόχοι της Crd-br: το c-Myc, το h19 και Igf2trans3. Ειδικότερα, τα επίπεδα του c-Myc mRNA στα BM-MSC βρέθηκαν να είναι υψηλότερα από αυτά του αναπτυσσόμενου εμβρύου στην ημέρα E13.5 και να παραμένουν έτσι, ανεξάρτητα

από την ηλικία του ποντικού και κατά την ανακαλλιέργεια των mBM-MSC. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκφραση του c-Myc κατά την διαφοροποίηση των MSC προς οστεοβλάστες, όπως ακριβώς συνέβη και με την έκφραση της Crd-br (Σχήμα 10B).



Σχήμα 10. Έκφραση Crd-br και στόχων στα mBM-MSC. Μέση τιμή ($\pm$ SEM) της γονιδιακής έκφρασης του Crd-br (A), και δυο γονιδίων- στόχων της c-Myc (B) και Igf2trans3 (Γ), σε σχέση με την ηλικία του δότη, την διάρκεια της καλλιέργειας και κατά τη διαφοροποίηση. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τον θετικό μάρτυρα. Η γκρί στήλη αντιπροσωπεύει την έκφραση σε ολικό μυελό των οστών (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Στο Σχήμα 10Γ φαίνεται η έκφραση του Igf2trans3. Σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν ούτε με την ηλικία αλλά ούτε και με την ανακαλλιέργεια.

Παρατηρήθηκε όμως η μείωση της σχετικής έκφρασης του Igf2trans3 κατά την διαφοροποίηση των MSC προς λιποκύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης του h19 ήταν πολύ χαμηλά περίπου 1000 φορές κάτω από αυτά του θετικού μάρτυρα (E13.5), δεν ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα και συνεπώς δεν εξετάστηκαν περαιτέρω.

2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ MSC

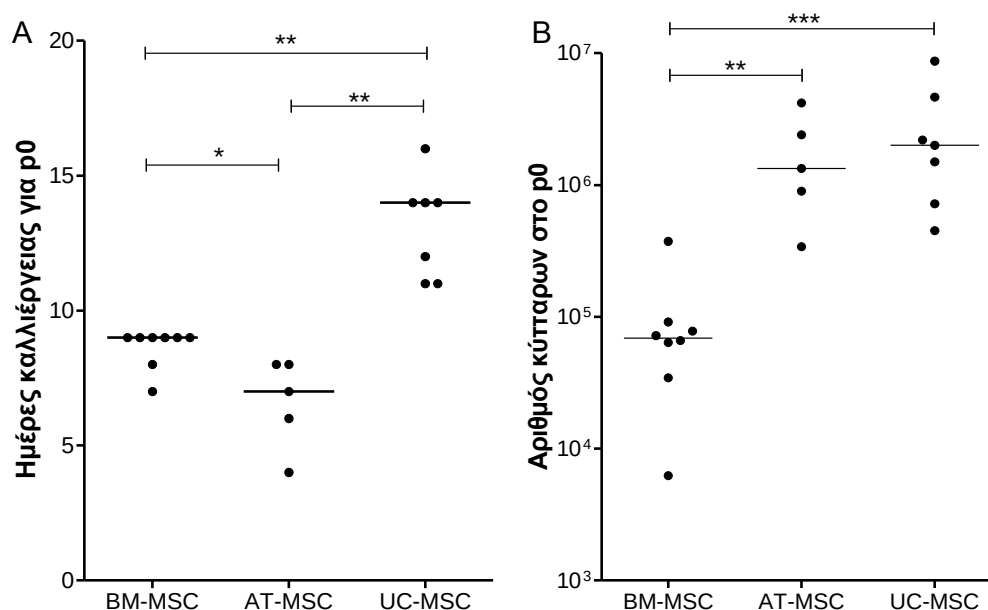
Τα MSC απομονώθηκαν πρώτη φορά από τον μυελό των οστών (BM) το 1970. Αρχικά χαρακτηρίστηκαν ως ινοβλαστικά κύτταρα με δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στον τομέα αυτό, και MSC έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς, έχουν διαφοροποιηθεί *in vitro* προς κύτταρα του βλαστικού δέρματος, στο οποίο ανήκουν, αλλά και προς κύτταρα άλλου εμβρυικού δέρματος όπως το νευροεκτόδερμα και το επιθήλιο. Κατανοώντας τη φυσιολογία των κυττάρων αυτών, εντοπίζοντας ομοιότητες και διαφορές ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς και στο μοριακό τους προφίλ ερχόμαστε ένα βήμα πιο κοντά στην ορθή χρήση των MSC σε προ-κλινικές και κλινικές μελέτες αναγεννησιακής ιατρικής.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, MSC απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από ενήλικες και εμβρυικές πηγές. Επιπλέον, διερευνήθηκε η έκφραση γονιδίων συνδεδεμένων με την πολυδυναμικότητα των βλαστοκυττάρων και την εμβρυική ανάπτυξη. Οι ενήλικες πηγές ήταν ο BM, η αρχική πηγή προέλευσης των MSC και ο λιπώδης ιστός που θεωρείται η πηγή με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα βλαστικών κυττάρων²²⁸. Οι εμβρυικές πηγές ήταν ο ομφάλιος λώρος και το ομφαλοπλακουντικό αίμα: πηγές προσβάσιμες με μη επεμβατικές μεθόδους. Το ποσοστό επιτυχίας απομόνωσης από όλες τις πηγές ήταν 100% με εξαίρεση το UCB, στο οποίο το ποσοστό απομόνωσης ανήλθε στο 20%, παρ' όλες τις διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκαν. Η παρατήρηση μας αυτή συμβαδίζει με την βιβλιογραφία και συνεπώς τα UCB-MSC δεν διερευνήθηκαν περαιτέρω.

2.1 ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Στη μελέτη αυτή συγκρίναμε το δυναμικό πολλαπλασιασμού των ενήλικων MSC με τα UC-MSC. Αρχικά, διαπιστώθηκε πως για να σχηματιστεί ένας κατάλληλος αριθμός αποικιών MSC, σε φιάλη καλλιέργειας 175 cm², από 5-10cm³ BM ή AT ή

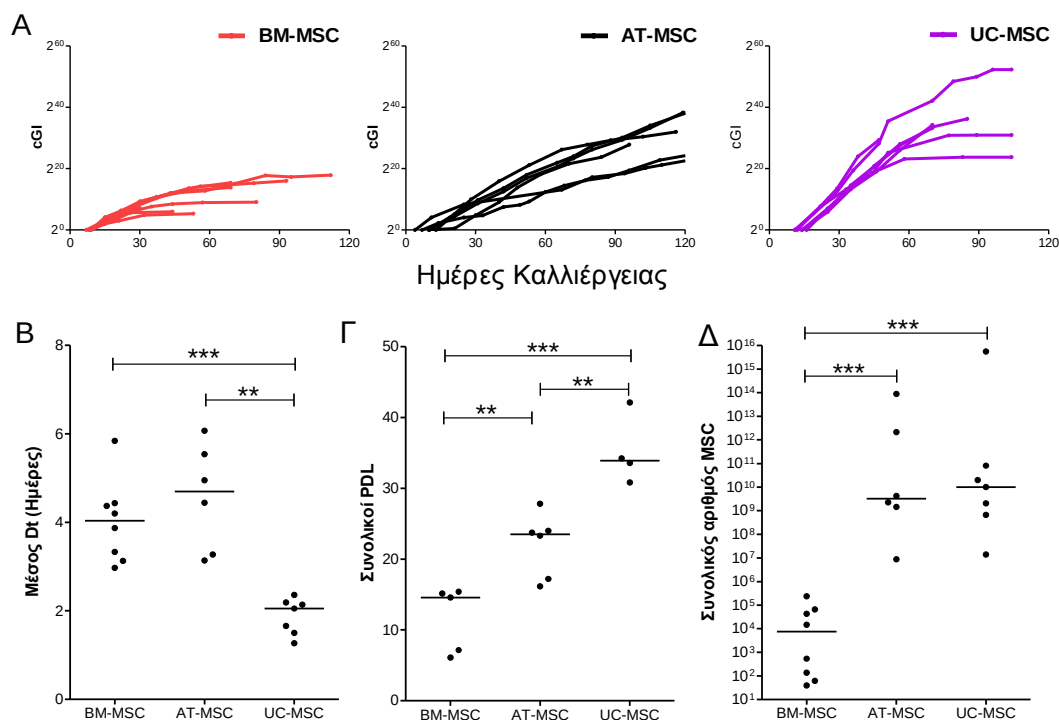
5cm² UC αρχικού υλικού χρειάζεται διαφορετικός χρόνος αναμονής στην καλλιέργεια (BM: 8.63±0.74, AT: 6.6±1.67 και UC: 13.14 ±1.86 και με ανώτερο χρόνο αυτό των 15 ημερών). Στην πρώτη ανακαλλιέργεια των MSC συλλέχθηκαν διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων ανάλογα με την πηγή προέλευσης, μια έμμεση πληροφορία για την περιεκτικότητα του κάθε ιστού σε αριθμό προγονικών κυττάρων (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Συγκριτική παρουσίαση του χρόνου που απαιτείται για την πρώτη ανακαλλιέργεια **(Α)** και του συνολικού αριθμού των κυττάρων σε αυτή **(Β)** ανάλογα με τον ιστό προέλευσης.

Μετά από αυτήν την πρώτη συλλογή κυττάρων και διατηρώντας σταθερή την πυκνότητα τους (250 κύτταρα/ cm²) σε κάθε ανακαλλιέργεια εφεξής, υπολογίσθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους. Κατά κύριο λόγο, τα AT- MSC φαίνεται πως μπορούν και πολλαπλασιάζονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα *in vitro* αλλά με χρόνο διαίρεσης στατιστικά μεγαλύτερο σε σχέση με τα UC- MSC (Γράφημα 12Α). Δηλαδή, για μια διαίρεση τα AT- MSC χρειάζονται κατά μέσο όρο 4,57± 1,19 ημέρες ενώ τα UC- MSC χρειάζονται περίπου το μισό χρόνο από αυτόν, δηλ 1,88± 0,41 ημέρες. Επομένως, στο ίδιο χρονικό διάστημα τα UC-MSC έχουν πολλαπλασιαστεί

τουλάχιστον δυο φορές περισσότερο από τα AT- MSC (Γράφημα 12B). Συνολικά τα UC- MSC, όταν καλλιεργήθηκαν κάτω από αυτές τις συνθήκες, πραγματοποίησαν $35,18 \pm 4,86$ διαιρέσεις σε περίπου 70 ± 5 ημέρες σε αντίθεση με τα AT- MSC που στο ίδιο χρονικό διάστημα πραγματοποίησαν μόνο $23,09 \pm 5,17$ διαιρέσεις (Γράφημα 12Γ).



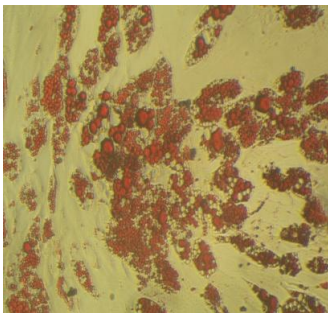
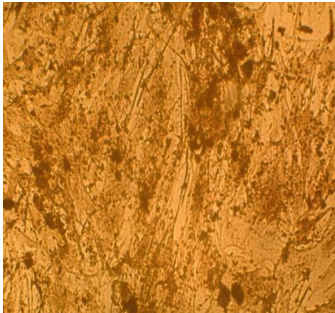
Σχήμα 12. Ρυθμός ανάπτυξης των MSC. (Α) Καμπύλες του ρυθμού αύξησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας MSC από τους διαφορετικούς ιστούς προέλευσης, μέχρι την 120 ημέρα. Μέσος χρόνος διπλασιασμού **(Β)**, συνολικός αριθμός διπλασιασμών του πληθυσμού **(Γ)** και συνολικός αριθμός κυττάρων που συλλέχθηκαν καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας **(Δ)**, από MSC των τριών διαφορετικών ιστών.

Όσον αφορά τα BM-MSC, αυτά τείνουν να έχουν το μικρότερο όριο ζωής *in vitro* μιας και παύουν να πολλαπλασιάζονται ή μειώνουν δραστικά τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους γύρω στις 70 ημέρες (πέρασμα 3 με 4). Ενώ τις πρώτες μέρες χρειάζονται σχεδόν το ίδιο χρονικό διάστημα με τα AT-MSC για να πραγματοποιήσουν μια διαίρεση ($4,02 \pm 0,93$ ημέρες), στο ίδιο χρονικό διάστημα

έχουν πολλαπλασιαστεί το λιγότερο- $11,67 \pm 4,64$ φορές- σε σχέση με τα MSC των άλλων πηγών απομόνωσης (Γράφημα 12).

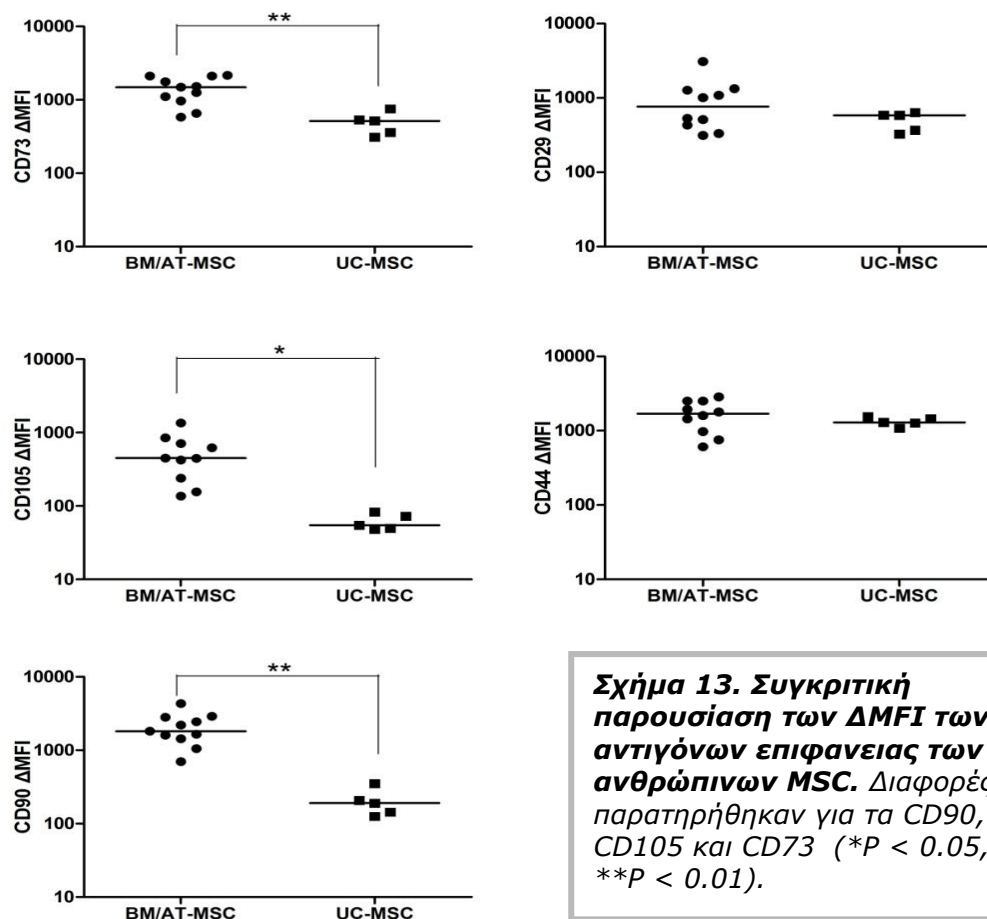
2.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Φαινοτυπικά, τα MSC όλων των πηγών ήταν: αρνητικά για CD45, CD11b ή CD14 και MHCII και θετικά σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% για τους γνωστούς δείκτες επιφανείας CD90, CD105, CD73, CD29 και CD44 (Συμπλ. Σχήμα 4). Επιπλέον, όλα τα MSC διαφοροποιήθηκαν προς λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα ανεξάρτητα από τον ιστό προέλευσης τους (Πίνακας 1).

Χαρακτηρισμός Ανθρώπινων MSC				
Φαινότυπος	Μόρια Επιφανείας	ΠΗΓΗ		
	(% $\pm$ SD)	BM	AT	UC
	CD90	95,7 $\pm$ 3,1	98,9 $\pm$ 0,7	98,4 $\pm$ 1,3
	CD73	96,5 $\pm$ 1,9	98,9 $\pm$ 0,4	98,6 $\pm$ 0,7
	CD105	94,8 $\pm$ 1,9	96,8 $\pm$ 4,5	95,9 $\pm$ 3,1
	CD44	97,9 $\pm$ 3,2	97,9 $\pm$ 1,0	98,1 $\pm$ 0,8
	CD29	98,8 $\pm$ 1,2	97,9 $\pm$ 1,7	98,0 $\pm$ 0,8
	CD45/11b	—	—	—
Διαφοροποίηση	Λιπογένεση	Οστεογένεση		
				

Πίνακας 1. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ανθρώπινων MSC.

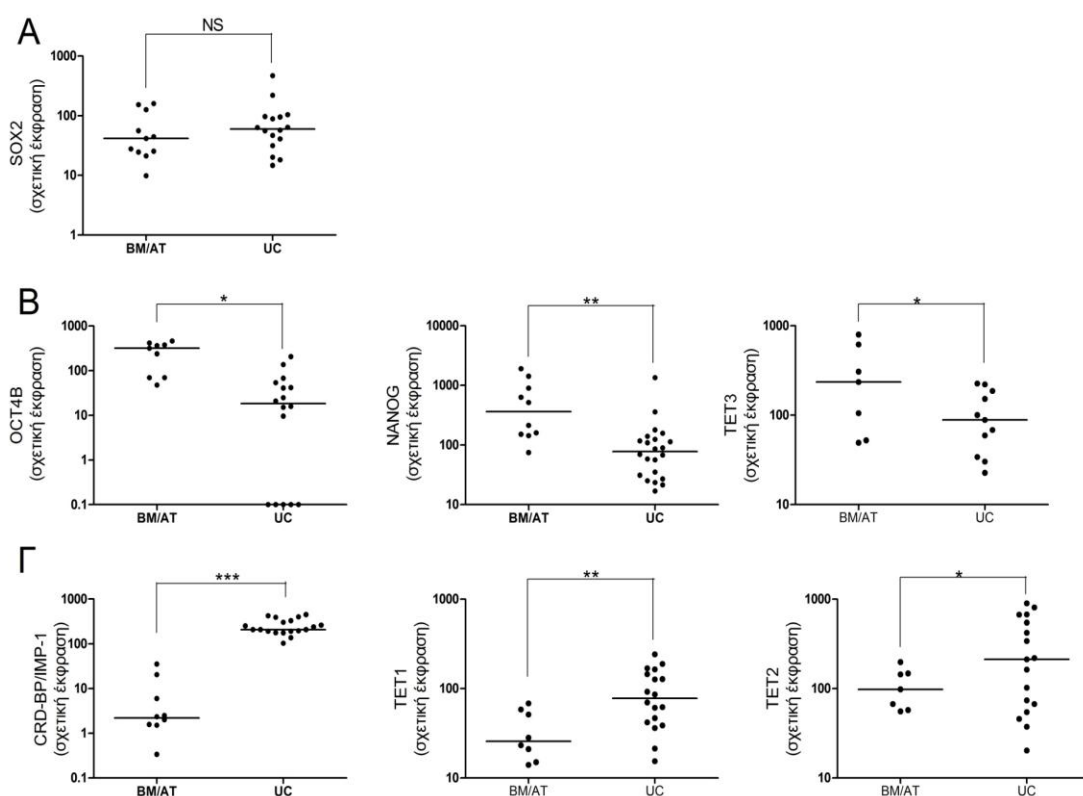
Ωστόσο, τα AT-MSC απέκτησαν το φαινότυπο των λιποκυττάρων σε συντομότερο χρονικό διάστημα, περίπου σε 7-10 ημέρες, σε σύγκριση με τις άλλες δύο κατηγορίες, που χρειάστηκαν. Διαφορές παρατηρήθηκαν, στη μέση ένταση φθορισμού (ΔMFI), η οποία υπολογίζεται με την αφαίρεση της μέσης τιμής έντασης φθορισμού του ισοτυπικού μάρτυρα από την αντίστοιχη τιμή φθορισμού για το ειδικό αντιγόνο επιφανείας και αντικατοπτρίζει τον αριθμό αντιγόνων ανά κύτταρο. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε πως τα UC- MSC έχουν στατιστικά πολύ μικρότερη ένταση φθορισμού σε σχέση με τα ενήλικα MSC για τους τρεις βασικούς δείκτες (CD90, CD105, CD73, Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Συγκριτική παρουσίαση των ΔMFI των αντιγόνων επιφανείας των ανθρώπινων MSC. Διαφορές παρατηρήθηκαν για τα CD90, CD105 και CD73 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

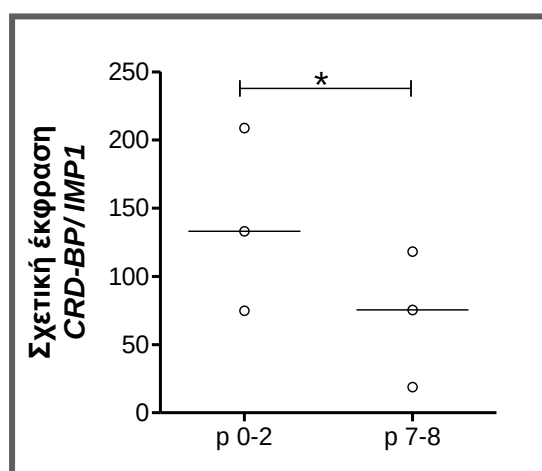
2.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ MSC

Τα γονίδια που διερευνήθηκαν ήταν τα εξής: OCT3/4, SOX2, NANOG, CRD-BP/IMP1, DAZL και τα γονίδια της TET οικογένειας (TET1, 2 και 3). Είναι πολύ σημαντικό να τονίσουμε πως στους ανθρώπους, σε αντίθεση με το ποντίκι, υπάρχουν δυο ισομορφές του OCT3/4 γονιδίου. Η OCT3/4 A ισομορφή που εκφράζεται κυρίως στα ESC και η OCT3/4B που εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Στην δική μας μελέτη συμπεριλάβαμε και τις δυο ισομορφές. Τα δείγματα MSC που ελέγχθηκαν χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους: στα απομονωμένα από ενήλικους ιστούς (BM-MSC και AT-MSC) και σε αυτά από εμβρυικούς ιστούς (UC-MSC).



Σχήμα 14. Συγκριτική παρουσίαση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα ανθρώπινα MSC.

Στα δείγματα που εξετάστηκαν, η ισομορφή A του OCT3/4 και το DAZL δεν ανιχνεύθηκαν, ενώ βρέθηκαν να εκφράζονται το SOX2, η ισομορφή B του OCT3/4, το NANOG, το CRD-BP/IMP1 καθώς και όλα τα γονίδια της TET οικογένειας. Το SOX2 ήταν το μόνο από τα γονίδια του οποίου τα επίπεδα έκφρασης ήταν ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης των MSC (Σχήμα 14Α). Διαφορές παρατηρήθηκαν στη σχετική έκφραση του OCT3/4B, του NANOG, του CRD-BP/IMP1 και σε όλα τα γονίδια της TET οικογένειας. Ειδικότερα η έκφραση του OCT3/4B, του NANOG και της TET3 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ($p < 0.0001$, $p = 0.0031$ και $p = 0.0215$ αντίστοιχα) στα MSC ενήλικης προέλευσης (Σχήμα 14Β). Τα επίπεδα έκφρασης του CRD-BP/IMP1, του TET1 και του TET2 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ($p < 0.0001$, $p = 0.0080$ και $p = 0.0435$ αντίστοιχα) στα UC-MSC (Σχήμα 14Γ). Επιπλέον διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση της CRD-BP/IMP1 μεταξύ των κυττάρων (UC-MSC) που συλλέχτηκαν στα p0-2 και στα p7-8 (Σχήμα 15).



Σχήμα 15. Έκφραση του CRD-BP/IMP1: σε αρχικό και προχωρημένο στάδιο καλλιέργειας των UC-MSC (* $P < 0.05$).

Η διαφορική αυτή έκφραση των γονιδίων στα UC-MSC σε συνδυασμό με τη μεγάλη διαφορά στον ρυθμό πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε ανάμεσα στα εμβρυικά και τα ενήλικα MSC και τα αρχικά και προχωρημένα στάδια της καλλιέργειας μας οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου αυτών των γονιδίων στην φυσιολογία των MSC.

3. ΡΟΛΟΣ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ MSC

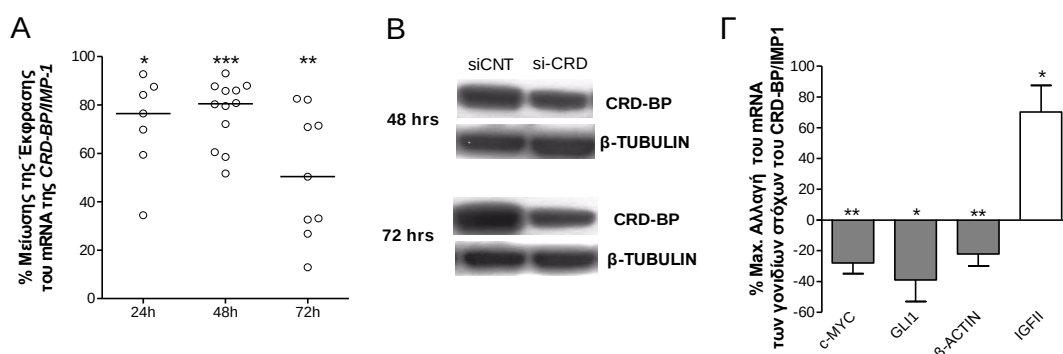
Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τον ρόλο των τριών αυτών γονιδίων (CRD-BP, TET1 και TET2) στα MSC πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατευθυνόμενης παρεμπόδισης της έκφρασής τους με ειδικά siRNA που σχεδιάσαμε. Αρχικά βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες επιμόλυνσης και η καταλληλότερη συγκέντρωση RNA και λιπιδίων επιμόλυνσης στα UC-MSC. Η παρακολούθηση του ποσοστού επιτυχίας της παροδικής επιμόλυνσης, που ήταν πάνω από 90%, έγινε χρησιμοποιώντας ένα μικρομοριακό RNA, που δεν προκαλούσε παρεμπόδιση σε κάποιο ευκαρυωτικό γονίδιο, αλλά ήταν συνδεδεμένο με τη χρωστική AlexaFluor488 (Συμπλ. Σχήμα 5).

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας σε διαφορετικά χρονικά σημεία, χρησιμοποιώντας το ειδικό siRNA μόριο και ένα αρνητικό μάρτυρα δηλαδή ένα siRNA που δεν προκαλούσε παρεμπόδιση της έκφρασης κάποιου γονιδίου (si-control). Αρχικά, πολιτικοποιήθηκε η έκφραση των γονιδίων-στόχων 24, 48 και 72h μετά την επιμόλυνση με τα siRNA μόρια. Στη συνέχεια, για να μπορέσουμε να διευκρινίσουμε τον πιθανό ρόλο των γονιδίων αυτών στη λειτουργικότητα των MSC, οι περισσότερες δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στις 48h μετά την επιμόλυνση.

3.1 ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1

Στο Σχήμα 16A παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης του CRD-BP/IMP1 και φαίνεται ότι ήδη 24h μετά την επιμόλυνση ήταν μειωμένα κατά περίπου 70%, παρέμειναν στα ίδια επίπεδα στις 48 ώρες και στη συνέχεια αυξήθηκαν σταδιακά, αλλά παρόλα αυτά παρέμειναν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις καλλιέργειες ελέγχου, 72 ώρες μετά την επιμόλυνση. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και με Western Blot. Η έκφραση της CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνης άρχισε να μειώνεται στις 48h και μειώθηκε ακόμα περισσότερο στις 72h μετά την επιμόλυνση (Σχήμα 16B).

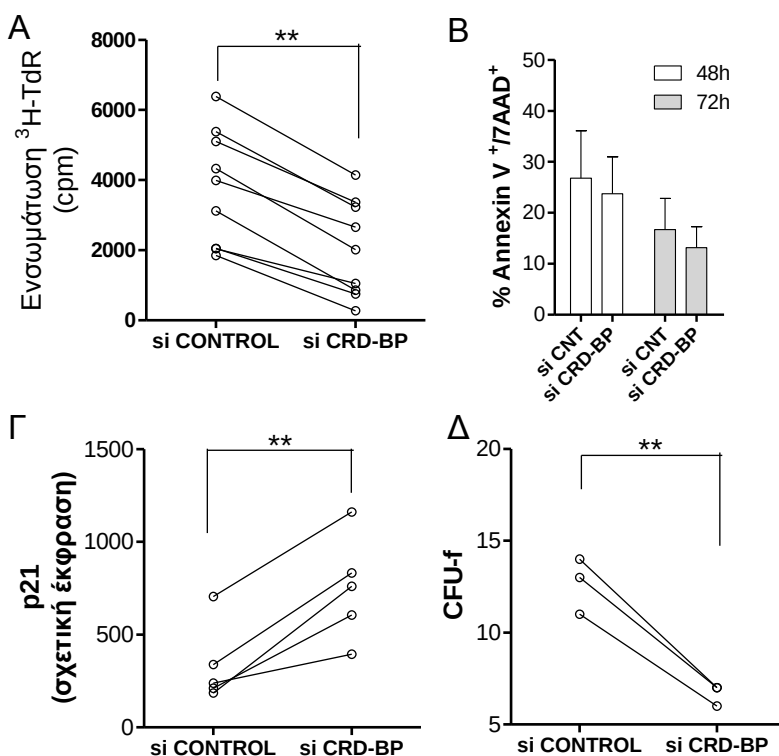
Μετά την επιτυχή παρεμπόδιση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 διερευνήθηκε πώς τα μειωμένα επίπεδα του γονιδίου αυτού επηρεάζουν την βιολογία των MSC. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκε η έκφραση ορισμένων γονιδίων που έχουν βρεθεί να είναι στόχοι της CRD-BP/IMP1 σε άλλους κυτταρικούς τύπους^{99, 128, 229-231}. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 16Γ τα επίπεδα έκφρασης του c-MYC, της β-ACTIN, και του GLI1 μειώθηκαν ενώ τα επίπεδα mRNA του 3'leader-IGFII αυξήθηκαν.



Σχήμα 16. Επιλεκτική παρεμπόδιση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 στα MSC. Σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA (A) και πρωτεΐνης (B) μέχρι και 72h μετά την επιμόλυνση. (Γ) Επίδραση της σίγασης της CRD-BP/IMP1 σε γονίδια στόχους της. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή έκφρασης των γονιδίων $\pm$ SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

Αφού διαπιστώθηκε ότι η κατευθυνόμενη παρεμπόδιση της CRD-BP/IMP1 επηρεάζει και την έκφραση γνωστών γονιδίων-στόχων της, ελέγχθηκαν οι επιπτώσεις στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των MSC. Πράγματι, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 17A, η μείωση της έκφρασης της CRD-BP/IMP προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στην ενσωμάτωση ^3H -θυμιδίνης στις καλλιέργειες των MSC που είχαν λάβει το ειδικό siRNA μόριο σε σχέση με αυτές που έλαβαν το si-control μόριο (μέση μείωση $54\% \pm 18$). Όπως εντοπίστηκε με χρώση των κυττάρων με AnnV/7AAD, η διαφορά αυτή δεν οφείλεται στην επαγωγή απόπτωσης από το si CRD-BP/IMP1 αφού τα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων μεταξύ των si-CRD-BP δειγμάτων και των si-control δειγμάτων, δεν παρουσιάζουν διαφορές (Σχήμα 17B). Επιπλέον, ανιχνεύτηκε η επαγωγή της έκφρασης του mRNA του p21/WAF

(Σχήμα 17Γ), γεγονός που είναι γνωστό ότι μπορεί να οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου όταν μάλιστα συνδυάζεται με μείωση της έκφρασης του c-MYC, όπως παρατηρήθηκε στο σύστημα μας. Διαφορές εντοπίστηκαν και στον αριθμό αποικιών που σχηματίστηκαν στην CFU-f δοκιμασία, όπου η παρουσία του CRDsi προκάλεσε μέση μείωση $47\% \pm 2\%$ (Σχήμα 17Δ).



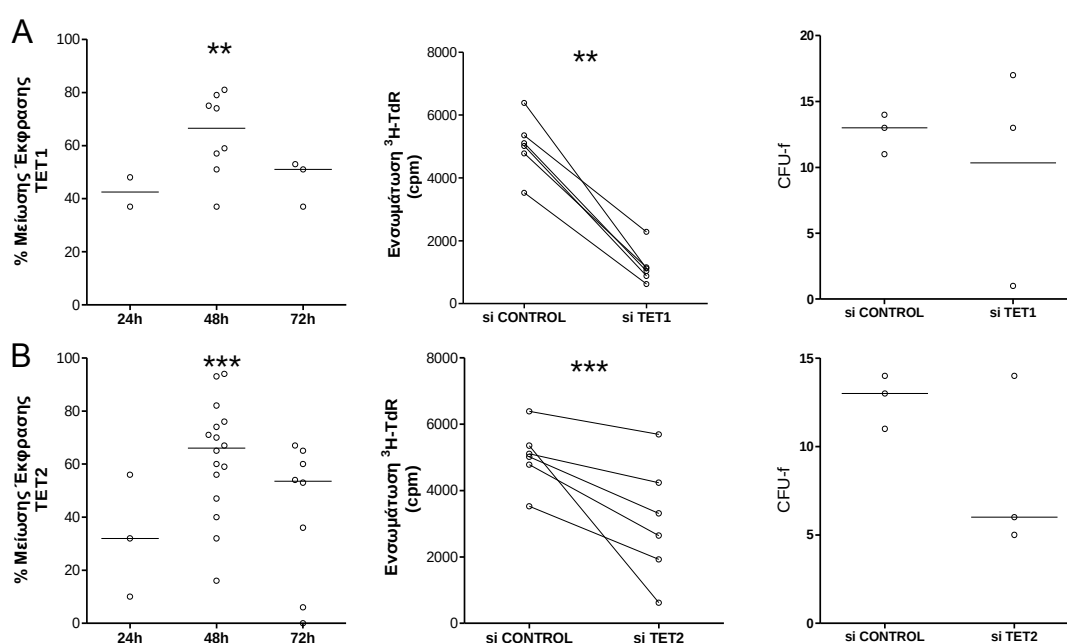
Σχήμα 17.
Επίδραση της επιλεκτικής παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 στον πολ/σμό των UC-MSC. Σημαντική μείωση του ρυθμού πολ/σμου (Α), που δεν σχετίζεται με απόπτωση (Β), συνοδεύεται από επαγωγή του p21 (Γ) και επιφέρει μείωση του *in vitro* ρυθμού αυτοανανέωσης (Δ). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή φθορισμού $\pm$ SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

3.2 ΠΙΘΑΝΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ TET1 ΚΑΙ ΤΗΣ TET2 ΣΤΑ MSC

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την διερεύνηση του ρόλου της TET οικογένειας στα MSC ήταν παρόμοια με αυτή για την CRD-BP/IMP1. Αρχικά, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 2 διαφορετικά siRNA μόρια ειδικά για την κάθε απομεθυλάση και χρησιμοποιήθηκαν σε πιλοτικά πειράματα κατευθυνόμενης παρεμπόδισης για την επιλογή του πιο αποτελεσματικού. Αφού επιλέχθηκε το πιο αποτελεσματικό (το οποίο 48 ώρες μετά την επιμόλυνση προκαλεί 70% μείωση στα

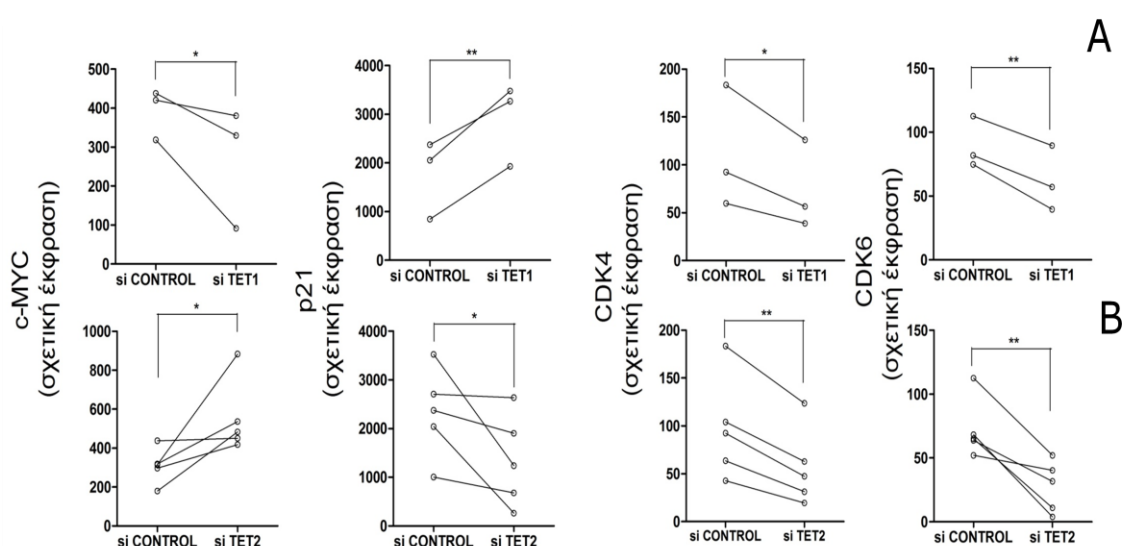
mRNA επίπεδα της κάθε απομεθυλάσης) χρησιμοποιήθηκε για τα περαιτέρω πειράματα (Σχήμα 18Α και Β).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε πώς επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των MSC η καταστολή της έκφρασης του TET1 ή TET2 γονιδίου. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 18Α και Β, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενσωμάτωσης ^3H -θυμιδίνης από τα MSC που είχαν επιμολυνθεί με το ειδικό siRNA μόριο είτε για την TET1 είτε για την TET2. Η μείωση αυτή όμως ήταν πολύ μεγαλύτερη στα κύτταρα που είχε γίνει επιλεκτική παρεμπόδιση της TET1. Όπως διαπιστώθηκε με την ειδική χρώση AnlnV/7AAD, οι διαφορές αυτές δεν οφείλονται στην επαγωγή απόπτωσης (Συμπλ Σχήμα 6Α και Β, αντιστοίχα). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των αποικιών που σχηματίστηκαν στην δοκιμασία CFU-f ούτε για την TET1 αλλά ούτε και για την TET2, πιθανόν λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων (Σχήμα 18Α και Β).



Σχήμα 18. Επίδραση της επιλεκτικής παρεμπόδισης της έκφρασης του TET1 (Α) και του TET2 (Β) στον πολ/σμό των UC-MSC. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης των γονιδίων στις 48h και μείωση του ρυθμού πολ/σμό των κυττάρων (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

Εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου για να επιβεβαιωθεί η μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού. Το μοτίβο έκφρασης του c-MYC και του p21 ήταν αντίθετα για την TET1 και την TET2. Μετά την επιλεκτική παρεμπόδιση του TET1, το c-MYC βρέθηκε σημαντικά μειωμένο και το p21 αυξημένο, δεδομένα παρόμοια με ό,τι παρατηρήθηκε μετά την επιλεκτική παρεμπόδιση της CRD-BP/IMP1. Αντιθέτως, μετά την παρεμπόδιση της έκφρασης του TET2, το c-MYC βρέθηκε σημαντικά αυξημένο και το p21 μειωμένο. Η μείωση της έκφρασης και των δυο αυτών γονιδίων της TET οικογένειας προκάλεσε τη σημαντική μείωση των CDK4 και 6 mRNA, πρωτεΐνες της οικογένειας των κινασών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 19).



Σχήμα 19. Επίδραση της επιλεκτικής παρεμπόδισης της έκφρασης του TET1(A) και του TET2 (B) στην έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου.

3.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1 ΑΠΟ TET1 ΚΑΙ TET2

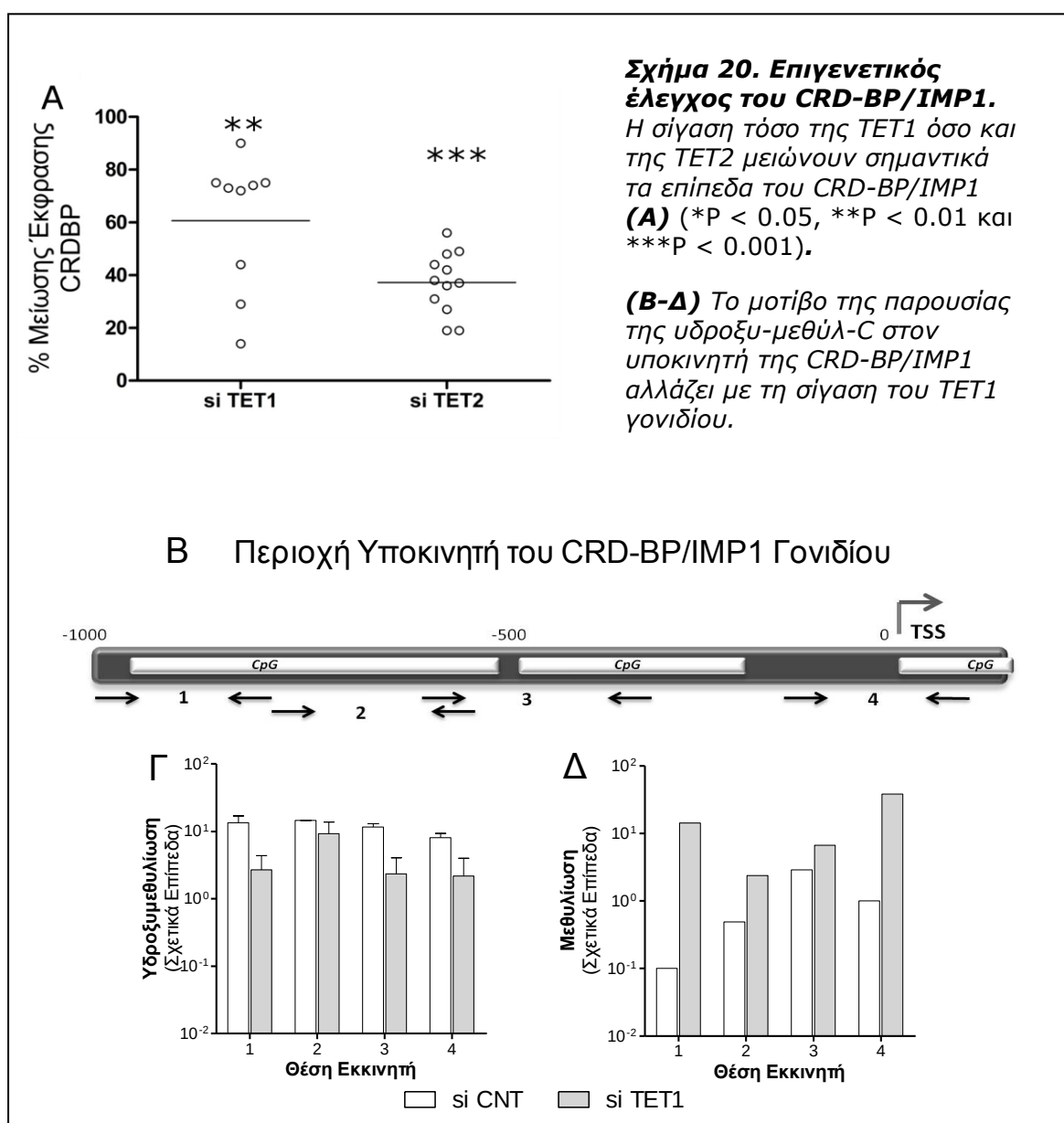
Προηγούμενες παρατηρήσεις στο εργαστήριο μας που υποδεικνύουν ότι η έκφραση της *CRD-BP/IMP1* βρίσκεται κάτω από επιγενετικό έλεγχο καθώς και το γεγονός ότι η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων TET1 και TET2 επηρέασε την ικανότητα πολλαπλασιασμού των MSC, όπως ακριβώς έγινε και με την μειωμένη έκφραση της *CRD-BP/IMP1* μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι μέλη της TET οικογένειας μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφραση του γονιδίου της *CRD-BP/IMP1*.

Για να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι η *CRD-BP/IMP1* είναι στόχος της TET1 της TET2 απομεθυλάσης, όπως συμβαίνει και με το Nanog στα mESC, αξιολογήσαμε τις αλλαγές των επιπέδων mRNA της *CRD-BP/IMP1*, μετά την επιτυχημένη μείωση της έκφρασης των TET1 ή TET2 γονιδίων.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 20Α η έκφραση της *CRD-BP/IMP1* μειώθηκε κατά $61\% \pm 25$ με την καταστολή της έκφρασης της TET1 και κατά $37\% \pm 12$ με την καταστολή της έκφρασης της TET2, 48h μετά την επιμόλυνση MSC καλλιιεργειών με το αντίστοιχο siRNA μόριο. Τα ευρήματα αυτά είναι η πρώτη ένδειξη ότι η έκφραση της *CRD-BP/IMP1* βρίσκεται όντως κάτω από τον επιγενετικό έλεγχο της TET οικογένειας στον πληθυσμό των MSC.

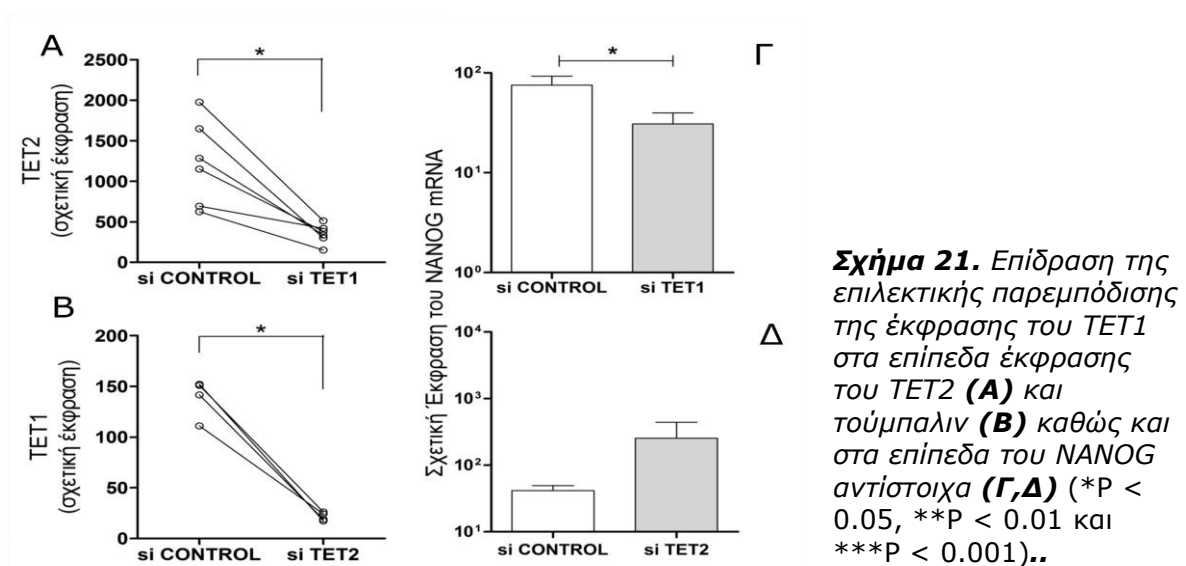
Η έμμεση αυτή ένδειξη του επιγενετικού ελέγχου της *CRD-BP/IMP1*, επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανάλυσης των επιπέδων μεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου αυτού. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ειδικό είτε για μεθυλιωμένο ή υδροξυμεθυλιωμένο DNA και ανάλυσης με ειδικούς εκκινητές σε ποσοτική PCR. Λόγω της μεγαλύτερης πτώσης που επέφερε η επιλεκτική παρεμπόδιση της TET1 στην έκφραση της *CRD-BP/IMP1*, επιλέχθηκε να μελετηθεί η μεθυλίωση σε MSC που είχαν επιμολυνθεί με siTET1. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα υδροξυμεθυλίωσης και μεθυλίωσης στην περιοχή (πλούσια σε CpG περιεχόμενο) του υποκινητή 1kb

μπροστά από την αρχή του σημείου έναρξης της μεταγραφής (transcription start site, TSS, Σχήμα 20B). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 20Γ περίπου 70% μείωση της υδροξυμεθυλίωσης παρατηρήθηκε σε τρεις από τις τέσσερις περιοχές και 30% στην τέταρτη στα κύτταρα που έλαβαν το ειδικό si. Η μείωση αυτή αντανακλάται από την αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή της CRD-BP/IMP-1 σε τουλάχιστον μια από τις τέσσερις περιοχές πλούσιες σε CpG (Σχήμα 20Δ).

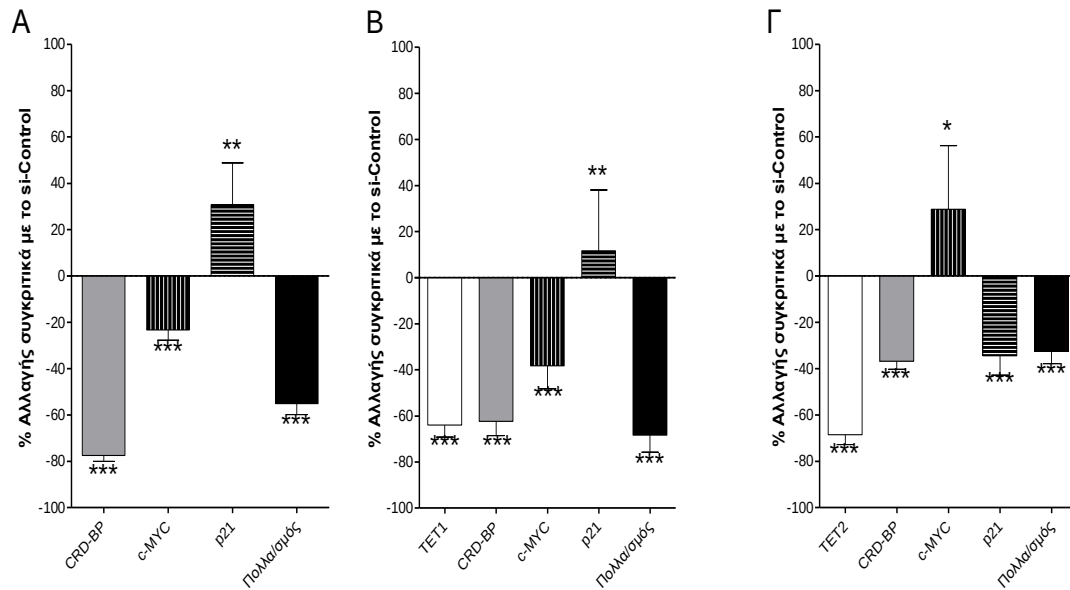


Επιπλέον, πρόσφατες δημοσιεύσεις απέδειξαν πως η TET1 απομεθυλάση ελέγχει την έκφραση της TET2 στα mESC. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας

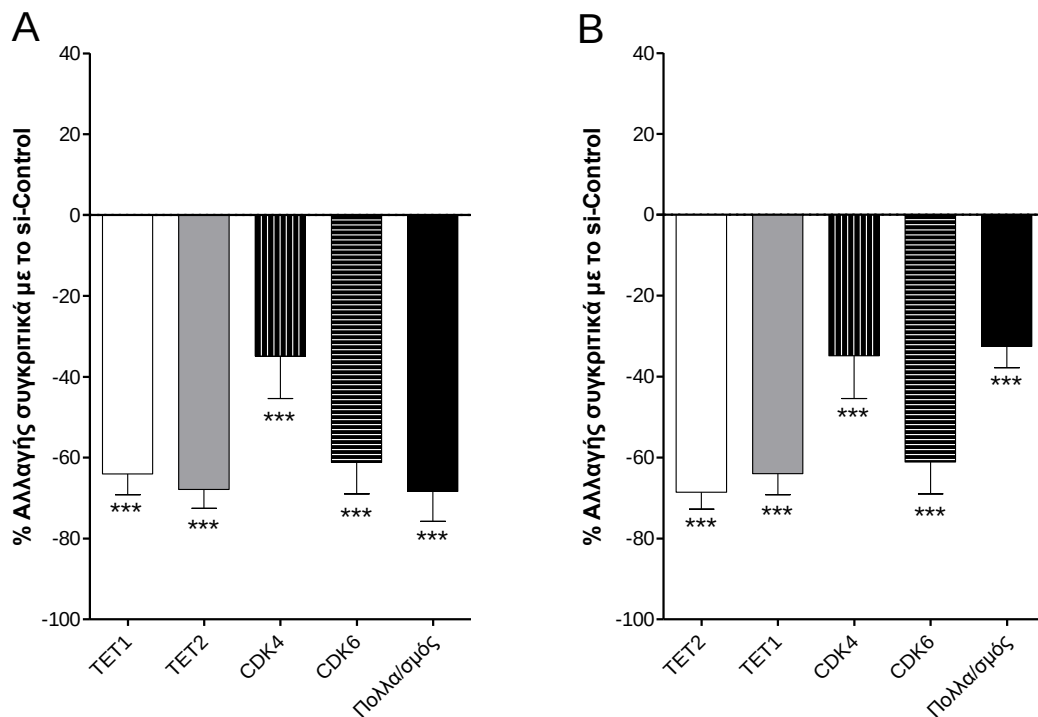
διερευνήθηκε αν αυτός ο μηχανισμός ελέγχου υπάρχει και στα ανθρώπινα MSC. Πράγματι, τα επίπεδα mRNA της TET2 βρέθηκαν να είναι σημαντικά μειωμένα μετά την ειδική καταστολή της έκφρασης της TET1 ($69\% \pm 15$, Σχήμα 21A). Επιπλέον όμως εξετάστηκε αν ισχύει και ο αντίστροφος μηχανισμός ελέγχου. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκαν με qPCR τα επίπεδα mRNA του TET1 γονιδίου μετά την παρεμπόδιση της έκφρασης του TET2 γονιδίου και βρέθηκαν επίσης μειωμένα ($84\% \pm 5$, Σχήμα 21B). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ένας μηχανισμός θετικής ανάδρασης (positive feedback loop) μπορεί να συνδέει τα γονίδια αυτά μεταξύ τους. Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι η έκφραση του NANOG βρέθηκε μειωμένη μετά την επιλεκτική παρεμπόδιση της TET1 όπως έχει αναφερθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες στα mESC, ενώ η επιλεκτική παρεμπόδιση του TET2 φάνηκε να μην επηρεάζει την έκφραση του NANOG (Σχήμα 21Γ και Δ, αντίστοιχα).



Για να επιβεβαιώσουμε ότι οι παραπάνω παρατηρήσεις μας είναι ανεξάρτητες από τον ιστό προέλευσης των MSC, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε καλλιέργειες MSC από ενήλικους ιστούς. Τα αποτελέσματά μας ήταν επαναλήψιμα. Στα Σχήματα 22 και 23 παρουσιάζονται τα συνολικά, συμπερασματικά, αποτελέσματα από όλους τους ιστούς.



Σχήμα 22. Συνοπτική παρουσίαση της επίδρασης της σίγασης της CRD-BP/IMP1, της TET1 και της TET2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στα επίπεδα των ρυθμιστών του κύκλου c-μγς και p21. Το μοτίβο των κυτταρικών αλλαγών είναι όμοιο μεταξύ της CRD-BP/IMP1 και της TET1 (*P < 0.05, **P < 0.01 και ***P < 0.001).



Σχήμα 23. Συνοπτική παρουσίαση της επίδρασης της σίγασης της TET1 και της TET2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στα επίπεδα των ρυθμιστών του κύκλου CDK4/6 (*P < 0.05, **P < 0.01 και ***P < 0.001).

4. IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι η γήρανση των οργανισμών σε ένα βαθμό, οφείλεται στη γήρανση των βλαστοκυττάρων, είτε ως αποτέλεσμα κληρονομικών ενδογενών συμβάντων, όπως βλάβες στο DNA, είτε λόγω εξωγενών παραγόντων, όπως οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον τους. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στη μειωμένη αναγεννητική ικανότητα των βλαστοκυττάρων που φαίνεται ότι τελικά οδηγεί στη γήρανση των θηλαστικών.

Στην παραπάνω υπόθεση, βασίστηκε ο σχεδιασμός αυτού του *in vivo* πειράματος που εξετάζει αν η συστηματική λήψη «νεαρών» MSC προλαμβάνει κάποιες ασθένειες σχετιζόμενες με την ηλικία. Επικεντρωθήκαμε, κυρίως, σε εκείνες που οφείλονται είτε σε ιστούς συνυφασμένους με τα MSC, όπως το οστό, ο λιπώδης ιστός και ο χόνδρος, είτε σε γεροντικές ασθένειες σχετιζόμενες με την πιθανή ανοσοκατασταλτική τους δράση.

Συνοπτικά, BM-MSC από αρσενικά ποντίκια 6-8 εβδομάδων χορηγήθηκαν ενδοφλέβια (iv) για 6 ή 12 μήνες σε θηλυκά ποντίκια ηλικίας 12 μηνών, σε μηνιαία βάση για τους πρώτους 6 μήνες και σε τριμηνιαία για τους υπόλοιπους 6. Διαφορές σε ποικίλες παραμέτρους εντοπίστηκαν ανάμεσα στα πειραματόζωα που έλαβαν MSC και στους μάρτυρες, που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Η συχνότητα κακοήθειας ήταν παρόμοια σε όλες τις ομάδες και το προσδόκιμο ζωής σχετικά αυξημένο στα πειραματόζωα που έλαβαν την έγχυση.

4.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ MSC

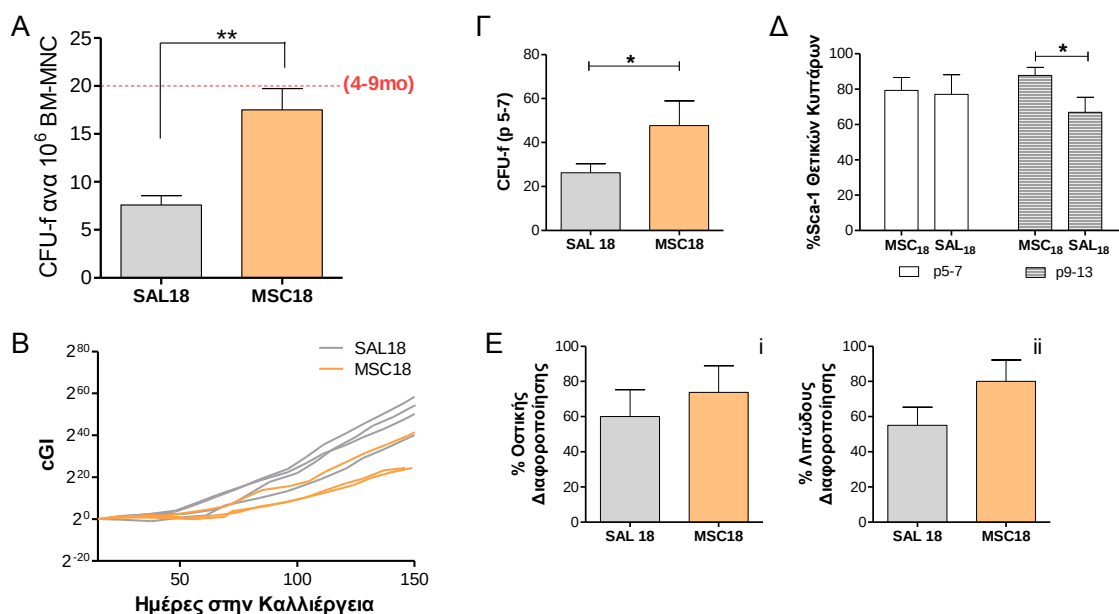
MSC απομονώθηκαν - από τον μυελό των οστών ποντικών που λάμβαναν κυτταρική θεραπεία για 6 μήνες (δηλαδή ηλικίας 18 μηνών) και από τους αντίστοιχους μάρτυρες και χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και λειτουργικά. Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε, ήταν ο καθορισμός του ενδογενή αριθμού προγονικών κυττάρων στον μυελό με την δοκιμασία CFU-f. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 24Α ο

αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκαν από το BM ποντικών ηλικίας 18 μηνών που έλαβαν MSC ήταν ίδιος με αυτόν ενήλικων ποντικών (ηλικίας 4-9 μηνών) και στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος συγκριτικά με τις αποικίες των μαρτύρων. Η παρατήρηση αυτή μας έκανε να αναρωτηθούμε εάν η διαφορά στον αριθμό των αποικιών που σχηματίστηκαν, οφείλεται στη διατήρηση των ενδογενών προγονικών κυττάρων μέσω της παρακρινούς δράσης των MSC της κυτταρικής θεραπείας ή στην ενσωμάτωση των νέων MSC στην πηγή προέλευσης τους. Το ερώτημα αυτό απαντήθηκε, διερευνώντας την παρουσία του γονιδίου Sry που είναι ειδική για το Y χρωμόσωμα, σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από τον μυελό των οστών των ποντικών. Το γονίδιο δεν εντοπίστηκε σε κανένα δείγμα και αυτό είναι μια σημαντική ένδειξη για την απουσία των αρσενικών MSC από το μυελό των θηλυκών ποντικών. Να σημειωθεί εδώ ότι η ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιήσαμε για την ανίχνευση του Sry γονιδίου, έφτασε σε αρκετά μεγάλη αραίωση (ένα αρσενικό κύτταρο στα 10^5 θηλυκά κύτταρα).

Στην συνέχεια, εξετάστηκαν οι *in vitro* διαφορές των MSC από τα πειραματόζωα που έλαβαν κυτταρική θεραπεία και από τους μάρτυρες. Μετά την αρχική επιλογή του πληθυσμού των MSC (p2), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές κατά την *in vitro* καλλιέργεια τους. Όπως φαίνεται στο (Σχήμα 24B) ο ρυθμός ανάπτυξης των MSC *in vitro*, υπολογισμένος με το cGI, δεν διαφέρει ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τον ρυθμό διπλασιασμού τους που είναι σχεδόν ίδιος ανεξάρτητα από την πηγή των MSC.

Αντιθέτως, διαφορές εντοπίστηκαν στην ικανότητα των MSC για *in vitro* αυτοανανέωση όπως αυτή υπολογίστηκε με την CFU-f δοκιμασία, στα p 5-7. Ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκαν από τα MSC των μαρτύρων ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος, σχεδόν ο μισός, σε σχέση με των MSC από τα πειραματόζωα που έλαβαν την έγχυση των νέων κυττάρων (Σχήμα 24Γ). Γεγονός που δείχνει πως υπάρχουν περισσότερα πολύδυναμα κύτταρα στις καλλιέργειες MSC από τα πειραματόζωα που έλαβαν την έγχυση. Η παρατήρηση αυτή μπορεί

έμμεσα να επαληθευτεί και με τα ποσοστά των SCA-1 θετικών κυττάρων που μειώθηκαν με την *in vitro* καλλιέργεια στα MSC της ομάδας SAL₁₈ ενώ παρέμειναν ίδια στην MSC₁₈ ομάδα (Σχήμα 24Δ).



Σχήμα 24. Φαινότυπος mBM-MSC των μαρτύρων και των ποντικών που έλαβαν κυτταρική θεραπεία. (Α) Συχνότητα mMSC στον μυελό. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο αριθμό ($\pm$ SEM) CFU-f ανά 10⁶ BM-MNC -η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τον μέσο αριθμό CFU-f ποντικών ενήλικης ηλικίας. **(Β)** Ρυθμός *in vitro* πολ/σμού, **(Γ)** και **(Δ)** Χαρακτηριστικά *in vitro* αυτοανανέωσης με την διάρκεια της καλλιέργειας **(Ε)** Ποσοστά διαφοροποίησης των MSC (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

Φαινοτυπικά καθώς και λειτουργικά δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα MSC, ανεξάρτητα από την ομάδα απομόνωσης, διαφοροποιήθηκαν προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα (Σχήμα 24Ε). Βέβαια, μεγαλύτερο ποσοστό των MSC από τα πειραματόζωα που έλαβαν την έγχυση διαφοροποιήθηκε προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.

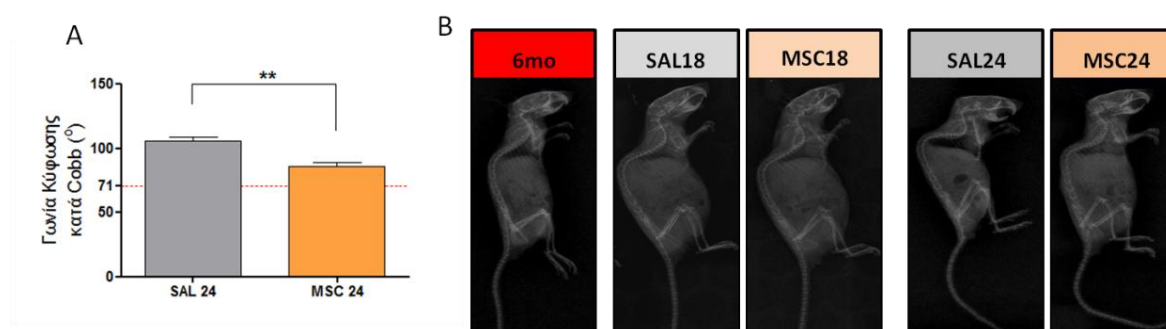
4.2 ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ

Η γήρανση του οργανισμού αντανακλάται σε μεγάλο βαθμό από το μυοσκελετικό εκφυλισμό. Το μυοσκελετικό σύστημα αποτελείται από τρεις βασικούς τύπους ιστού: τα οστά, τους χόνδρους και τους μυς. Τα MSC είναι τα προγονικά κύτταρα που δίνουν δυο από τους τρεις αυτούς ιστούς. Βασιζόμενοι σε αυτό το δεδομένο αξιολογήθηκε η επίδραση της χορήγηση των νέων MSC στη γήρανση του μυοσκελετικού συστήματος. Φαινοτυπικά/ μακροσκοπικά, οι ποντικοί που έλαβαν τα MSC παρουσίασαν μεγαλύτερη σωματική ενεργητικότητα, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, οι οποίοι παρουσίασαν αταξία, βραδυκινησία ή/και ακινησία.

Επιπλέον, εξετάστηκε ο βαθμός λорδοκύφωσης -μιας κατάστασης συνυφασμένης με την γήρανση τόσο στους ανθρώπους όσο και στο ποντίκι- που αποδίδεται στην οστεοπόρωση. Ακτινολογική ανάλυση έδειξε ότι ο σχηματισμός λорδοκύφωσης ήταν σημαντικά καθυστερημένος στα πειραματόζωα που έλαβαν έγχυση MSC για 12 μήνες σε σχέση με τους μάρτυρες ποντικούς (SAL24). Διαφορές όμως δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των πειραματόζωων ηλικίας 18 μηνών, μιας και ο βαθμός λорδοκύφωσης ήταν αμελητέος στην ηλικία αυτή. Η μέθοδος Cobb που χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτικοποίηση της κύφωσης, εφαρμόστηκε και επαλήθευσε την παραπάνω παρατήρηση (Σχήμα 25).

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μια άλλη κατάσταση που σχετίζεται με την αυξημένη ηλικία, χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου που καλύπτει την επιφάνεια των οστών μέσα στην άρθρωση, και από οστική υπερπλασία στα όρια των αρθρικών επιφανειών των οστών δημιουργώντας έτσι οστικές προεξοχές, που λέγονται οστεόφυτα^{232, 233}. Στην δική μας μελέτη τα πειραματόζωα που έλαβαν έγχυση νέων MSC για 6 καθώς και για 12 μήνες (ηλικίας 18 και 24 μηνών, αντίστοιχα) δεν εμφάνισαν οστεοαρθρικούς εκφυλισμούς και οι αρθρικές τους επιφάνειες ήταν συγκρίσιμες με πειραματόζωα ηλικίας 6 μηνών (Σχήμα 26Α). Ειδικότερα, ο αρθρικός χόνδρος αυτών των ποντίκων διατήρησε τον αριθμό των

χονδροκυττάρων καθώς και την περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες, σε αντίθεση με αυτόν από την ομάδα των μαρτύρων (SAL18 και SAL24). Τα ποντίκια από την ομάδα των μαρτύρων είχαν αρθρώσεις με οστεοαρθρικές αλλαγές και τα SAL24 ποντίκια είχαν επίσης και οστικές προεξοχές. Οι παρατηρήσεις αυτές στην αρχιτεκτονική του ιστού ανιχνεύτηκαν μικροσκοπικά μετά από ειδική χρώση (Σχήμα 26B).



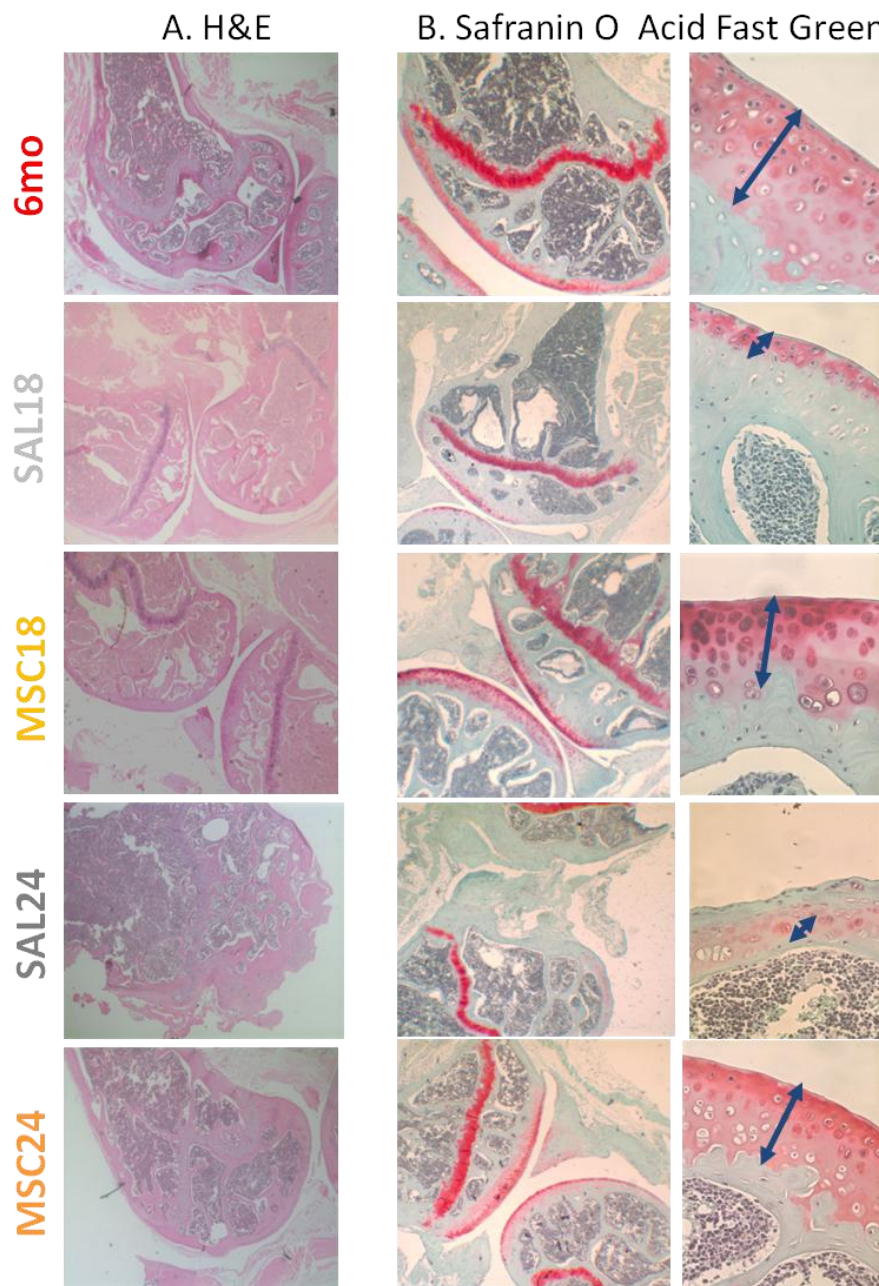
Σχήμα 25. Βαθμός λорδοκύφωσης: **(Α)** όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο Cobb -η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την μέση τιμή της γωνίας κύφωσης ζώων ηλικίας 6 μηνών, **(Β)** αντιπροσωπευτικές ακτινογραφίες των διαφόρων ομάδων πειραματόζώων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

4.3 ΔΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ

Ο ιστός του δέρματος επηρεάζεται σημαντικά κατά τη γήρανση, και οι δερματικές αλλοιώσεις και παθολογίες είναι βαθιά συνδεδεμένες με αυτήν. Το δέρμα αποτελείται από την επιδερμίδα, το χόριο και το υποδόριο λίπος. Το υποδόριο κομμάτι του δέρματος προέρχεται κατά την ανάπτυξη του εμβρύου από το μεσέγχυμα και αποτελείται από λιποκύτταρα και συνδετικό ιστό.

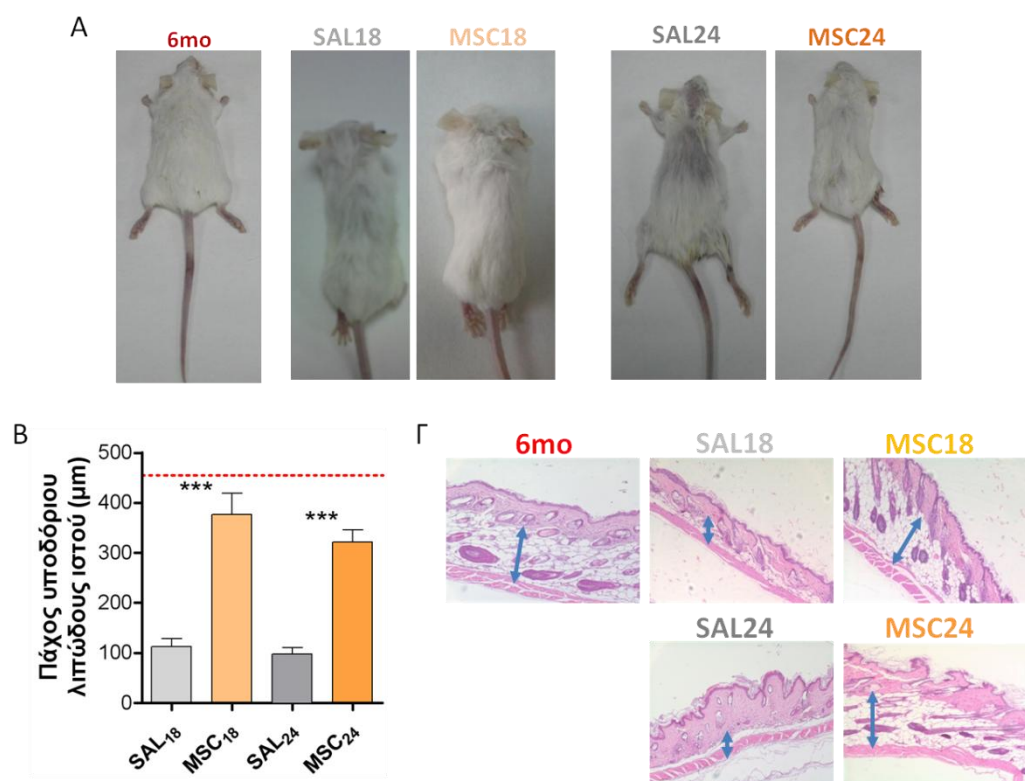
Μακροσκοπικά τα πειραματόζωα που έλαβαν MSC, διατήρησαν το τρίχωμα τους σε σύγκριση με τους μάρτυρες που είχαν σημαντική αραίωση, αλωπεκία και λεπτότερο δέρμα (Σχήμα 27Α). Επιπλέον, υπήρχαν διαφορές στο υποδόριο τμήμα του δέρματος. Κατά τη διατομή του ραχιαίου δέρματος παρατηρήθηκε διατήρηση του υποδόριου λίπους από τα πειραματόζωα που έλαβαν έγχυση νέων MSC σε επίπεδα

σχεδόν ίδια με αυτά ποντικών 6 μηνών. Οι μάρτυρες στερούνταν υποδόριου λίπους σημαντικά και στις δυο ηλικίες (18 και 24 μηνών). Οι παρατηρήσεις αυτές ανιχνεύτηκαν μικροσκοπικά με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (Σχήμα 27B και Γ).



Σχήμα 26. Αρθρώσεις του μηρού και της κνήμης του οπισθίου αριστερού άκρου αντιπροσωπευτικών πειραματοζώων κάθε ομάδας. Η διαφορετική περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες που ανιχνεύτηκε με ειδική χρώση Safranin O Acid Fast Green σημειώνεται με μπλέ βέλος (μεγέθυνση: x40).

Διαφορές δεν παρατηρήθηκαν σε κανένα από τα άλλα δυο στρώματα- πάχος της δερμίδας στην επιδερμίδα, περιεκτικότητα σε κολλαγόνο και ελαστίνη στο χόριο όπως διαπιστώθηκε με τις κατάλληλες χρώσεις (Συμπλ. Σχήμα 7).

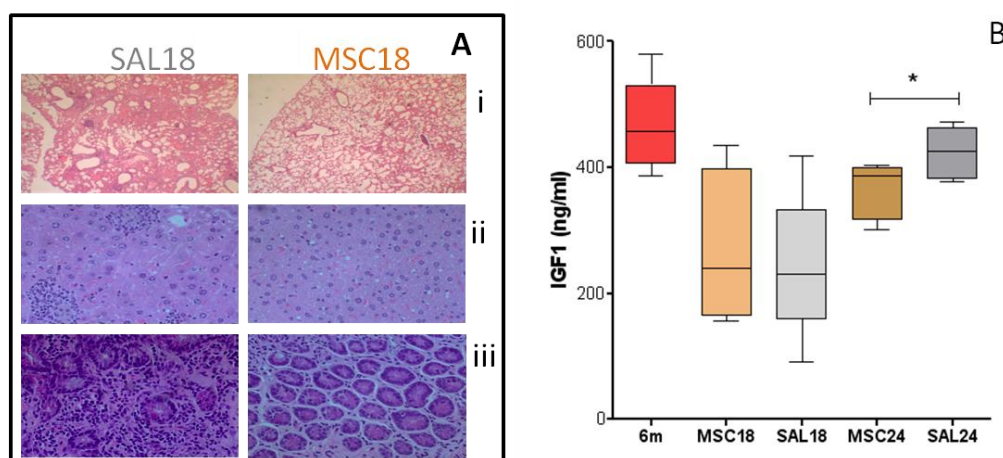


Σχήμα 27. Δερματικός ιστός. (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες πειραματοζώων όλων των ομάδων. **(Β)** και **(Γ)** Σημαντικές Διαφορές στο υποδόριο λίπος των πειραματοζώων της κάθε ομάδας (χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης, μεγέθυνση: x40). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την μέση τιμή πάχους των ζώων ηλικίας 6 μηνών (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$).

4.4 ΦΛΕΓΜΟΝΗ/ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

Η χρόνια φλεγμονή θεωρείται ότι εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών ασθενειών σχετιζομένων με την ηλικία, ενώ η γήρανση συνοδεύεται από μεταβολές του ανοσοποιητικού συστήματος προωθώντας φλεγμονώδεις διεργασίες. Από την άλλη, τα MSC είναι γνωστό πως προκαλούν ανοσοκαταστολή. Συνδυάζοντας τα δυο

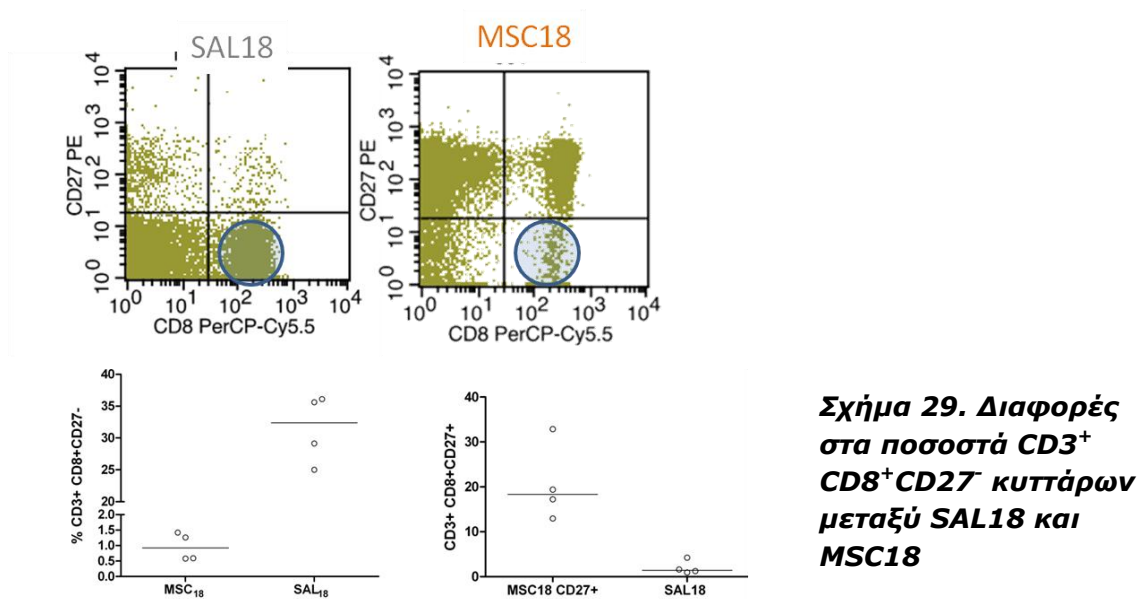
αυτά δεδομένα στη μελέτη μας, εξετάσαμε την ανοσολογική γήρανση και την ύπαρξη φλεγμονής σε διάφορους ιστούς.



Σχήμα 28. Τα πειραματόζωα που έλαβαν έγχυση MSC παρουσίασαν: (Α) Μειωμένες εστίες φλεγμονής και (Β) Μείωση του IGF1.

Η ομάδα των μαρτύρων παρουσίασε φλεγμονώδεις εστίες σε διάφορα τμήματα οργάνων. Ειδικότερα, όλα τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου ανέπτυξαν φλεγμονές του πνεύμονα (Σχήμα 29Ai) και ένα μεγάλο ποσοστό από αυτά ανέπτυξαν ήπια ηπατίτιδα ή/και κολίτιδα (4 από τα 7, Σχήμα 28Aii και Aiii, αντίστοιχα). Αντιθέτως, τα πειραματόζωα της ομάδας που έλαβαν νέα MSC διατήρησαν κανονική αρχιτεκτονική ιστού, χωρίς εστίες φλεγμονής. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις που συσχετίζονται με κολίτιδα, ηπατίτιδα και πνευμονική φλεγμονή ανιχνεύτηκαν με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.

Επιπλέον εξετάστηκε η συγκέντρωση του αυξητικού παράγοντα IGF1 στο περιφερικό αίμα των ποντικών. Ο IGF1 χρειάζεται σε μεγάλα επίπεδα κατά την εφηβεία αλλά στον ενήλικο οργανισμό μειωμένα επίπεδα IGF1 αποτελούν θετικό δείκτη για το προσδόκιμο ζωής²³⁴. Τα πειραματόζωα ηλικίας 24 μηνών που είχαν λάβει έγχυση είχαν μειωμένα επίπεδα IGF1 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 28B).



Σχήμα 29. Διαφορές στα ποσοστά $CD3^+ CD8^+ CD27^-$ κυττάρων μεταξύ SAL18 και MSC18

Η γήρανση χαρακτηρίζεται από αλλαγές στους πληθυσμούς των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, της λειτουργικότητας τους καθώς και της συσσώρευσης λεμφοκυττάρων μνήμης και εξάντληση των παρθένων λεμφοκυττάρων²³⁵. Μία σημαντική ομάδα λεμφοκυττάρων μνήμης, τελικού σταδίου (exhausted/senescent) είναι αυτή των $CD3^+ CD8^+ CD27^-$ πληθυσμού. Όπως αναμενόταν, κύτταρα σπλήνας απομονωμένα από τους ποντικούς που έλαβαν εγχύσεις MSC, είχαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά των εξαντλημένων T-κυττάρων μνήμης σε σχέση με τα σπληνοκύτταρα από τους μάρτυρες όπως ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Σχήμα 29). Αλλαγές που παρατηρήθηκαν σε άλλους πληθυσμούς φαίνονται στο Συμπληρωματικό Σχήμα 8.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο πληθυσμός των MSC βρίσκεται στο επίκεντρο των μελετών την τελευταία δεκαετία. Κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας, μελετήσαμε διεξοδικά τις ιδιότητες των MSC από το ποντίκι σε σχέση με την ηλικία και την *in vitro* καλλιέργεια και των ανθρώπινων MSC σε σχέση με την πηγή προέλευσης τους.

Τα ESC έχουν διερευνηθεί εκτενώς και είναι ο πληθυσμός που χρησιμοποιείται κατά κόρον για την αποκρυπτογράφηση των μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση του εμβρύου. Τα χαρακτηριστικά τους αποτελούν τον "stem" χαρακτήρα και ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να βρεθεί ποιά από αυτά τα χαρακτηριστικά διατηρούνται και στα υπόλοιπα βλαστοκύτταρα. Συνεπώς, μελετήθηκε η έκφραση σημαντικών εμβρυικών δεικτών στους διαφορετικούς MSC πληθυσμούς. Τέλος, στήθηκε ένα προκλινικό μοντέλο επίδρασης των MSC στη γήρανση, στο οποίο τα ζώα λάμβαναν εγχύσεις MSC από νεαρά ζώα.

1. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ MSC

1.1 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

MSC απομονώθηκαν και από τα δυο φύλα Balb/c ποντικών από διάφορα στάδια της ζωής των πειραματόζωνων. Τα ευρήματά μας ότι ο μυελός των οστών θηλυκών ποντικών, ανεξαρτήτως ηλικίας, είχαν σημαντικά μειωμένο αριθμό mBM-MSC, σε σχέση με αυτό των αρσενικών ποντικών, συμφωνεί με τα ευρήματα άλλων ομάδων που παρατήρησαν μειωμένη φυλοσύνδετη επούλωση του οστού σε θηλυκούς Sprague-Dawley αρουραίους εξαιτίας του χαμηλού αριθμού MSC²³⁶. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να εξηγήσουν γιατί οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς στην οστεοπόρωση, μιας και ο ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της είναι ο ανεπαρκής σχηματισμός νέου οστού κατά την διάρκεια της αναδιαμόρφωσης του.

Όπως παρατηρήθηκε το ενδογενές δυναμικό ανάπτυξης των mBM-MSC μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας. Ωστόσο, άπαξ τα κύτταρα καλλιεργηθούν *in vitro* έχουν παρόμοιες ικανότητες πολλαπλασιασμού ανεξάρτητα από την ηλικία και το φύλο. Ειδικότερα, τα mBM-MSC κατά την διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας πραγματοποίησαν πάνω από 70 διπλασιασμούς του πληθυσμού τους –το γνωστό όριο Hayflick των σωματικών κυττάρων. Βέβαια, η *in vitro* πολλαπλασιαστική ικανότητα των MSC, δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα το *in vivo* δυναμικό τους μιας και τα κύτταρα αυτά κατά κύριο λόγο βρίσκονται στον οργανισμό σε κατάσταση ηρεμίας, επιβεβαιώνει όμως την πολλαπλασιαστική τους δυνατότητα όταν λάβουν τα κατάλληλα σήματα. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την εξωγενή θεωρία της γήρανσης, που δηλώνει πως τα κύτταρα οδηγούνται σε πολλαπλασιαστική σίγαση από τις αλλαγές εντός του περιβάλλοντα ιστού. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί στο παρελθόν σε διάφορες μελέτες^{82, 143, 237, 238}.

Ανθρώπινα MSC απομονώθηκαν από το BM την αρχική πηγή προέλευσης των MSC, τον λιπώδη ιστό και από τον ομφάλιο λώρο, την ενήλικη και την εμβρυική πηγή αντίστοιχα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αριθμό προγονικών κυττάρων. Ο ρυθμός διπλασιασμού των BM-MSC υπολογίστηκε από το p1 έως το p5 μιας και τα BM-MSC σε αυτό το σημείο (p5) σταματούν να πολλαπλασιάζονται, πιθανόν εξ αιτίας του αρχικού χαμηλού αριθμού κυττάρων που απαντώνται στο BM (1 MSC: 10000 BMMNC). Για τα AT-MSC και UC-MSC ο ρυθμός διπλασιασμού υπολογίστηκε από το p1 έως το p9¹⁴⁴. Ειδικότερα, τα εμβρυικά MSC πολλαπλασιάζονται σχεδόν δυο φορές πιο γρήγορα από τα ενήλικα. Με το πέρας της καλλιέργειας όμως, όλα τείνουν να αυξάνουν τον μέσο χρόνο διπλασιασμού τους και τελικά σταματούν να διαιρούνται. Επιπλέον, αυξάνουν σε μέγεθος και κοκκίωση²³⁹. Σε αντίθεση τα BM-MSC του ποντικού με την παρατεταμένη *in vitro* καλλιέργεια μειώνουν τον μέσο χρόνο διπλασιασμού τους όπως επίσης μειώνεται το μέγεθος και η πολυπλοκότητα των κυττάρων αυτών. Αυτές οι σημαντικές διαφορές μπορεί να

οφείλονται σε κάτι τεχνικό, όπως πχ στην απομόνωση ενός πιο προγονικού πληθυσμού, άρα και με καλύτερο δυναμικό αυτο-ανανέωσης, από τον μυελό των οστών του ποντικού από ότι του ανθρώπου ή στις μεγαλύτερες απαιτήσεις των ανθρώπινων MSC σε ειδικούς αυξητικούς παράγοντες, πέρα από το απλό μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται συνήθως.

Βεβαία εάν θέσουμε κατά μέρος τους τεχνικούς λόγους, υπάρχουν μηχανισμοί ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των κύτταρων ειδικοί για κάθε είδος. Ένας από αυτούς είναι η έκφραση της τελομεράσης και συνεπώς του μεγέθους των τελομερών. Τα εργαστηριακά ποντίκια φαίνεται να έχουν μεγαλύτερα τελομερή και συνεχή έκφραση της τελομεράσης, γεγονότα που συμβάλλουν στον μεγαλύτερο αριθμό διαιρέσεων που μπορούν να πραγματοποιηθούν από ένα κύτταρο και κατά συνέπεια από ένα βλαστοκύτταρο. Άρα τα απομονωμένα από το ποντίκι MSC θα ήταν λογικό να πολλαπλασιάζονται για πολύ περισσότερο. Η ικανότητα αυτή των mBM-MSC να πραγματοποιούν περισσότερες διαιρέσεις σε ένα βαθμό μπορεί έμμεσα να ενισχυθεί και από τα δικά μας αποτελέσματα εξαιτίας της συνεχούς υψηλής έκφρασης της Crd-br/Imp1 και του c-Myc (μιας και η τελομεράση αποτελεί σημαντικό στόχο του c-Myc) στα MSC ποντικού σε αντίθεση με τα ανθρώπινα MSC όπου η έκφραση της CRD-BP/IMP1 μειώνεται με τις ανακαλλιέργειες όπως μειώνεται και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών. Επιπλέον η προοδευτική μείωση των τελομερών από την κυτταρική διαίρεση, και η μείωση του πολλαπλασιασμού των βλαστοκυττάρων, μπορεί να παρέχει ένα επιπλέον εμπόδιο για την εξέλιξη ανθρώπινης κακοήθειας/ όγκου, μηχανισμός που δεν έχει παρατηρηθεί ως τώρα στα εργαστηριακά ποντίκια. Επίσης το μέγεθος των τελομερών συσχετίζεται αντίστροφα με την διάρκεια ζωής ενός είδους, γεγονός που σε πρώτη όψη φαίνεται αντιφατικό, από την άλλη όμως είναι λογικό εάν αντιληφθεί κανείς το ενεργειακό κόστος κάθε πολλαπλασιασμού και απόπτωσης που χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για να την ομοιόσταση του, σε αντίθεση με έναν

οργανισμό που απλά διατηρεί την ομοιόσταση του με το να διπλασιάζει τα κύτταρα του πιο σπάνια²⁴⁰.

1.2 ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ

Φαινοτυπικές διαφορές δεν παρατηρηθήκαν για τα μόρια επιφανείας CD29 και CD44 σε κανέναν από τους πληθυσμούς MSC που εξετάστηκαν. Η έκφραση του CD73 και του CD105 αυξάνονται σημαντικά με την ηλικία του ποντικού. Πιο συγκεκριμένα τα mBM-MSC από ενήλικα ποντίκια φαίνεται να έχουν πενταπλάσιες τιμές CD73 από τα mBM-MSC απομονωμένα από νεογνά ποντίκια. Ο φυσιολογικός ρόλος της CD73 διαφέρει ανάμεσα στους οργανισμούς αλλά και μεταξύ των ιστών του ίδιου οργανισμού. Οι Resta et al έδειξαν πως τα ώριμα T και B λεμφοκύτταρα σε αντίθεση με τα ανώριμα είχαν 10πλάσια δραστηριότητα του CD73, γεγονός που συνδέεται με την ικανότητα τους για προσκόλληση και μετανάστευση¹⁵⁵, παρόλα αυτά πρέπει να μελετηθεί παραπάνω αν ο ρόλος αυτός ισχύει και για τα MSC. Τα mBM-MSC απομονωμένα από γηραιά ζώα εκφράζουν CD105 σε μεγάλο ποσοστό, γύρω στο 70%. Η έκφραση του μορίου αυτού δεν παρατηρήθηκε σε καμία άλλη ηλικιακή περίοδο στα mBM-MSC, μιας και το CD105 δεν αποτελεί απαραίτητο δείκτη χαρακτηρισμού των MSC ποντικού. Η CD105 αποτελεί βασικό δείκτη των ενδοθηλιακών κυττάρων- όμως εκφράζεται και σε κύτταρα του συνδετικού ιστού- συνεπώς οι περισσότερες μελέτες σχετικά με το μόριο αυτό έχουν γίνει στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μια από αυτές συσχετίζει την επαγωγή της έκφραση της CD105 (short endoglin) κατά την ενδοθηλιακή γήρανση και υποστηρίζει πως η έκφραση της μπορεί να συμβάλει στην εξαρτώμενη από την ηλικία αγγειακή παθολογία²⁴¹. Εάν κάποια ανάλογη συσχέτιση ισχύει και για τα mBM-MSC χρειάζεται να διερευνηθεί.

Από την άλλη η έκφραση του Sca-1 είχε πτωτική τάση με την *in vitro* καλλιέργεια. Όπως προαναφέρθηκε, το μεγάλο χρονικό διάστημα καλλιέργειας *in vitro* επέφερε μείωση του μεγέθους και της κοκκίωσης των κυττάρων. Τα

αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με των Meirelles Lda και Nardi, που παρατήρησαν χαμηλή έκφραση Sca-1 σε έναν υποπληθυσμό MSC με μικρό κυτταρικό μέγεθος και πολυπλοκότητα¹⁴³. Ο πιο πιθανός ρόλος του Sca-1 ως μόριο-αγγελιοφόρος είναι να αλλάζει την ισορροπία του κυττάρου μεταξύ αυτοδιπλασιασμού και διαφοροποίησης, συνεπώς η πτωτική του τάση με την *in vitro* καλλιέργεια να υποδεικνύει πιθανά μια τάση μείωσης της πολυδυναμικότητας των MSC.

Αλλαγές στα μόρια επιφάνειας, που συμπίπτουν με αυτά που επηρεαστήκαν και στο ποντίκι, αλλά αφορούσαν όχι τόσο τα ποσοστά έκφρασης των μορίων αλλά την μέση τιμή φθορισμού (ΔMFI) τους, παρατηρήθηκαν και ανάμεσα στα ανθρώπινα MSC απομονωμένα από τις διάφορες πηγές. Το ΔMFI δίνει μια ένδειξη του αριθμού των μορίων στην επιφάνεια του κάθε κυττάρου. Συγκεκριμένα, οι τιμές ΔMFI των CD73, CD90 και CD105 ήταν υψηλότερες στα ενήλικα MSC σε σχέση με τα UC-MSC. Μόρια που φάνηκαν να επηρεάζονται με την ηλικία και στα mBM-MSC (εκτός από το CD90 που δεν εξετάστηκε στο ποντίκι) και σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, συνεπώς θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των κυττάρων.

Δηλαδή, τα ενήλικα MSC υπερ-εκφράζουν τα μόρια αυτά- πιθανά λόγω προηγούμενων σημάτων που έχουν λάβει κατά την ανάπτυξη του οργανισμού- για καλύτερη απόκριση των κυττάρων στις αυξημένες απαιτήσεις, για αναγέννηση και αναδιαμόρφωση, του ενήλικα οργανισμού.

1.3 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ

Τα MSC ποντικού ασκούν μια πολύ ισχυρή ανοσοκαταστολή *in vitro* ακόμη και σε πολύ χαμηλούς αριθμούς, σε αντίθεση με τα ανθρώπινα MSC τα οποία ασκούν την ανοσοκατασταλτική τους δράση σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση (από προηγούμενες παρατηρήσεις στο εργαστήριο μας).

Η ανοσοκατασταλτική ικανότητα των mBM-MSC δοκιμάστηκε καθόλη την διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας σε σχέση με το φύλο και την ηλικία. Η

ανοσορύθμιση από τα mBM-MSC ασκείται ως επί το πλείστον μέσω διαλυτών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του TGF- β , HGF και του μονοξειδίου του αζώτου¹⁸¹, παράγοντες που επηρεάζουν διαφορετικά την κάθε ομάδα του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην δική μας μελέτη διερευνήθηκε μόνο ένα κομμάτι αυτής της δράσης- η επίδραση τους στα T κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι αυτή παραμένει αμετάβλητη ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, παρόλου που βιβλιογραφικά έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην παραγωγικότητα των αυξητικών παραγόντων των MSC με την παροδο της ηλικίας και τον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Ίσως τελικά η ανοσοκατασταλτική τους δράση να είναι το αποτέλεσμα της συσσωρευτικής δράσης πολλών μορίων, μια υπόθεση που θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

1.4 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Υπάρχει μεγάλη ανομοιομορφία στα αποτελέσματα μελετών σχετικά με το πώς επηρεάζει η ηλικία και ο *in vitro* πολλαπλασιασμός την ικανότητα διαφοροποίησης των mBM-MSC. Οι Kretlow et al. ανέφεραν ότι η ικανότητα των MSC για διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα μειώθηκε με την ηλικία²⁴². Οι Gou et al. παρατήρησαν ότι η εκτεταμένη καλλιέργεια των mBM-MSCs επηρέασε την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα²³⁷. Οι Sethe et al. σε ένα άρθρο ανασκόπησης παραθέτουν συγκεντρωτικά στοιχεία που αποδεικνύουν τελικά πως το δυναμικό διαφοροποίησης των MSC προς οστεοκύτταρα μειώνεται με την ηλικία²³⁸. Οι δικές μας παρατηρήσεις συμφωνούν με το γενικό αυτό συμπέρασμα του άρθρου ανασκόπησης των Sethe et al..

Διφορούμενα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σχετικά με την διαφοροποίηση των mBM-MSC προς λιποκύτταρα που δείχνουν πως η διαφοροποίηση τους είτε παραμένει σταθερή είτε αυξάνεται με την ηλικία. Στην δική μας μελέτη δεν υπήρχε ένα ξεκάθαρο μοτίβο της λιπογέννεσης σε σχέση με την

ηλικία, όμως παρατηρήθηκε μια πτωτική τάση κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, που θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει το μειωμένο δυναμικό αναγέννησης των MSC λόγω γήρανσης²⁴³. Σύμφωνα και με άλλες δημοσιεύσεις^{169, 244}, η ικανότητα των MSC να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα μειώνεται με την *in vitro* καλλιέργεια σε αντίθεση με την ικανότητα διαφοροποίησης τους προς οστεοκύτταρα, η οποία αυξάνεται.

Αυτό που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην δική μας μελέτη είναι η διαφορά στο δυναμικό διαφοροποίησης των MSC των δύο φύλων, με τα αρσενικά να έχουν αυξημένους δείκτες διαφοροποίησης (*Lpl* και *Bglap*) σε σχέση με τα θηλυκά MSC. Η παρατήρηση αυτή θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω συγκριτικά με τις διαφορές στην φυσιολογία των δυο φύλων, πιθανά με *in vivo* πειράματα.

2. ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα MSC είναι κύτταρα που έχουν προέλθει από το μεσόδερμα –πρωτίστως απαντώνται στον μυελό των οστών ενός οργανισμού- και υφίστανται ιστο-ειδική διαφοροποίηση για να παράγουν πιο εξειδικευμένα κύτταρα (λίπος, οστό, χόνδρο και στρώμα) καθώς και κύτταρα άλλου εμβρυικού δέρματος, όπως πχ τα νευρικά κύτταρα.

Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα λοιπόν θα πρέπει να διατηρούν, κατά ένα βαθμό, μέρος των εμβρυικών χαρακτηριστικών τους²²⁴. Το OCT3/4 βρίσκεται στην κορυφή της ιεραρχίας των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την πολυδυναμικότητα των ESC με το να αναστέλλει την έκφραση ιστο-ειδικών γονιδίων και να προάγει την έκφραση "stem" γονιδίων. Η καταστολή του OCT3/4, μαζί και άλλων ρυθμιστών της πολυδυναμικότητας, όπως το SOX2 και το NANOG, έχει συσχετισθεί με την δέσμευση και την διαφοροποίηση των ESC προς κάποιο εμβρυικό δέρμα. Από κάποιες ερευνητικές ομάδες έχει ανιχνευτεί μόνο η έκφραση του OCT3/4 στα MSC,

ενώ από άλλες όλων των ρυθμιστών πολυδυναμικότητας. Στην δική μας μελέτη βρέθηκε να εκφράζεται σε αφθονία στα MSC (ποντικίσια και ανθρώπινα) το NANOG, κάτι που παρατηρήθηκε και από τους Riekstina et al που μελέτησαν την έκφραση των μεταγραφικών αυτών παραγόντων σε ανθρώπινα MSC απομονωμένα από διάφορες πηγές. Από την άλλη, η έκφραση και κατ' επέκταση ο πιθανός ρόλος των Oct3/4 και Sox2 στα mBM-MSC παραμένει αντιφατικός. Οι Riekstina et al ανίχνευσαν την έκφραση του OCT3/4 αλλά όχι του SOX2 στα ανθρώπινα MSC του BM²⁴⁵. Ενώ οι Greco et al βρήκαν πως τα MSC εκφράζουν όλους τους εμβρυικούς μεταγραφικούς παράγοντες OCT3/4, NANOG και SOX2. Επιπλέον, στην μελέτη των Greco et al το OCT3/4 φάνηκε: να επηρεάζει την έκφραση παρόμοιων γονιδίων στα MSC και στα ESC, να προωθεί την έκφραση ειδικών γονιδίων για τα MSC και να ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού τους κύκλου²⁴⁶.

Σε αυτή την εργασία, μελετήσαμε εκτός από την έκφραση των τριών κύριων μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην πολυδυναμικότητα των ESC, την έκφραση μιας καινούριας ομάδας πρωτεϊνών, της TET οικογένειας των απομεθυλασών, με επίσης σημαντικό ρόλο στην πολυδυναμικότητα των βλαστοκυττάρων, καθώς και την έκφραση δυο άλλων γονιδίων: του Dazl και του Ctd-br/Imp-1. Τα γονίδια αυτά εξετάστηκαν λόγω της ειδικής έκφρασης τους σε κυτταρικούς πληθυσμούς με εμβρυικές ή πολυδύναμες ικανότητες.

Συγκεκριμένα το Dazl βρέθηκε να εκφράζεται σε βλαστοκύτταρα απομονωμένα από αμνιακό υγρό και να παίζει σημαντικό ρόλο κατά την δημιουργία των γαμετικών κυττάρων -τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (διαφοροποίηση από ESC)²⁴⁷⁻²⁴⁹. Στο δικό μας σύστημα βρέθηκε να εκφράζεται στα mBM-MSC σε χαμηλά αλλά σταθερά επίπεδα, και στον ολικό μυελό των οστών του ποντικού- κύτταρα που εξετάστηκαν ως μάρτυρες ενήλικης προέλευσης- σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά των MSC και παρόμοια με τα επίπεδα του E13.5 εμβρύου. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως πιθανά και άλλα κύτταρα του μυελού των οστών εκφράζουν το Dazl. Οι Johnson et al. με τα πειράματά τους εντόπισαν γενετικά κύτταρα στο BM

που διατηρούσαν την παραγωγή ωαρίων στην ενήλικη ζωή²⁵⁰, ενώ οι Nayernia et al. διαφοροποίησαν βλαστοκύτταρα από τον μυελό των οστών ποντικών σε αρσενικά γενετικά κύτταρα²⁵¹. Από την άλλη η έκφραση του Dazl, με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής, δεν μπορούσε να ανιχνευτεί στα ανθρώπινα BM-MSC. Όλες αυτές οι πληροφορίες υποδεικνύουν έναν διαφορετικό ρόλο για το Dazl, στο ανθρώπινο και το ποντικίσιο σύστημα, κάτι που μπορεί να συνδέεται με την διαφορετική ρύθμιση της πολυδυναμικότητας στα δύο συστήματα ή με την δευτερεύουσα σχέση του γονιδίου αυτού στην ρύθμιση της πολυδυναμικότητας. Θα ήταν βεβαίως πολύ ενδιαφέρον να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του στην πολυδυναμικότητα των mBM-MSC.

Επιπλέον, εντοπίζεται για πρώτη φορά στον MSC πληθυσμό- ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης των κυττάρων- η έκφραση του CRD-BP/IMP1.

Τα mBM-MSC ποντικού είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του Crd-bp/Imp-1 ανεξάρτητα από την ηλικία του δότη και διατήρησαν την έκφραση αυτή υψηλή, ανεξάρτητα από την *in vitro* καλλιέργεια. Η CRD-BP/IMP-1 είναι μια mRNA δεσμευτική πρωτεΐνη με εμβρυικό μοτίβο έκφρασης¹⁰⁶ και έχει βρεθεί στο παρελθόν από την δική μας ερευνητική ομάδα να εκφράζεται στα UCB-HSC²⁵² και κατά την ανάπτυξη του εμβρύου στην δημιουργία των τενόντων, ενώ η έλλειψη της προκαλεί νανισμό του εμβρύου εξαιτίας του μειωμένου ρυθμού πολλαπλασιασμού ινοβλαστών. Αναγνωρίζει πολλούς διαφορετικούς στόχους mRNA. Αυτοί που επιλέξαμε να μελετήσουμε στα mBM-MSC λόγω της σημασίας τους στην πολυδυναμικότητα των ESC και στην εμβρυογένεση είναι το c-Myc, το IGFII και το H19. Η έκφραση του IgflI-leader3 και του h19 mRNA ήταν πολύ χαμηλή σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των δυο αυτών γονιδίων στο έμβρυο E13.5. Κατά την διαφοροποίηση των MSC προς λιποκύτταρα παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση της έκφρασης του IgflI-leader3, παρατήρηση που συμφωνεί με την εργασία των Jones et al που λέει πως η μείωση της έκφρασης του IGFII στον ενήλικα οργανισμό συνοδεύεται από την αυξημένη απόθεση λίπους και παχυσαρκίας εξαιτίας της

επιρροής του IGFII στον μεταβολισμό του λίπους²⁵³. Συνεπώς η έκφραση του IgfII-leader3 στα MSC και στην διαφοροποίηση τους προς λιποκύτταρα είναι από τα λίγα δεδομένα που είναι γνωστά για τον ρόλο του IGFII στον ενήλικο οργανισμό.

Ένας βασικός στόχος της Crd-bp/Imp1 είναι το c-Myc, μια πολυλειτουργική, πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση και στην ενεργοποίηση πολλών ειδικών-ESC γονιδίων^{102, 254}. Στην δική μας μελέτη, το c-Myc βρέθηκε να εκφράζεται σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά του E13.5. Η υψηλή αυτή έκφραση ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία του δότη και δεν μεταβλήθηκε από την *in vitro* καλλιέργεια. Οι παρατηρήσεις μας, μαζί με τον γνωστό ρόλο του c-Myc στην διατήρηση του κυτταρικού κύκλου, πιθανά να υποστηρίζουν τον ρόλο της Crd-bp/Imp1 στον πολλαπλασιασμό των MSC μιας και η CRD-BP/IMP1 επηρεάζει την μετα-μεταγραφική μοίρα των στόχων της με το να καθορίζει την ενδοκυττάρια θέση τους, να αλλάζει τον χρόνο ημιζωής τους καθώς και την μεταφρασιμότητά τους^{255, 256}. Δηλαδή η συνεχής σταθερή έκφραση του Crd-bp/Imp1 κρατά σταθερή την έκφραση του c-Myc και συνεπώς τα MSC πολλαπλασιάζονται/ αυτό-ανανεώνονται *in vitro*. Εξάλλου μελέτες έχουν δείξει ότι η ποσότητα αλλά και η χρονική στιγμή έκφρασης του c-MYC είναι τεράστιας σημασίας για τον αριθμό iPS κυττάρων που θα παραχθούν⁷. Μιας και το μοτίβο έκφρασης του Crd-bp/Imp1 και του c-Myc συμπίπτουν και κατά την διαφοροποίηση- αύξηση και των δυο γονιδίων κατά την διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα για την πιθανή επαγωγή της απόπτωσης για την οστεοποίηση των κυττάρων- το Crd-bp/Imp1 θα μπορούσε να έχει κάποιο συντονιστικό ρόλο στη φυσιολογία των βλαστικών κυττάρων^{257, 258}.

Ο ρόλος της Crd-bp/Imp1 στον πολλαπλασιασμό των mBM-MSC, επιβεβαιώθηκε και στα ανθρώπινα MSC. Στο δεύτερο κομμάτι της μελέτης αυτής δείχνουμε πως τα MSC εμβρυϊκής προέλευσης, που *in vitro* πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από ότι τα ενήλικα ομόλογα τους- BM και AT- εκφράζουν επίσης σημαντικά υψηλότερα επίπεδα CRD-BP/IMP-1, γεγονός που θα μπορούσε να υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο του γονιδίου αυτού στην *in vivo* ικανότητα αυτό-ανανέωσης των MSC.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της CRD-BP/IMP-1 στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των MSC, προχωρήσαμε σε πειράματα επιλεκτικής παρεμπόδισης της έκφρασης του γονιδίου αυτού. Πράγματι η μείωση της έκφρασης του CRD-BP/IMP-1 οδήγησε σε σημαντική αναστολή του πολλαπλασιασμού των MSC, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς και στη μεταβολή του μοτίβου έκφρασης των πιο γνωστών στόχων του CRD-BP/IMP-1: *c-MYC*, *IGF-II*, *GLI1* και *β-ACTIN*. Ειδικότερα η μειωμένη έκφραση CRD-BP/IMP-1 προκάλεσε σημαντική μείωση του *c-MYC* mRNA- μια αλληλένδετη σχέση που παρατηρήθηκε και στα mBM-MSC καθώς και αύξηση του p21, γεγονότα που επιφέρουν την παραμονή των κυττάρων στην φάση G1 του κύκλου.

Θα ήταν εύλογο όμως να αναρωτηθεί κανείς πώς ελέγχεται η έκφραση της CRD-BP/IMP-1 στα κύτταρα αυτά; Προηγούμενα δεδομένα από πειράματα στα HSC, έδειξαν ότι η έκφραση του CRD-BP/IMP-1 πιθανά ρυθμίζεται επιγενετικά, μιας και κάτω από κανονικές συνθήκες δεν εντοπίζεται η έκφραση της CRD-BP/IMP-1 στα BM-CD34⁺ προγονικά κύτταρα, αλλά εντοπίζεται μετά από την προσθήκη της 5-azacytidine- ενός μη ειδικού παράγοντα απομεθυλίωσης του DNA- στην καλλιέργεια. Επιπλέον πρόσφατα βρέθηκε ότι οι Tet1 και Tet2 απομεθυλάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία των mESC^{95, 96}. Αυτές οι παρατηρήσεις ήταν που μας οδήγησαν να εξετάσουμε στα MSC, την πιθανή ρύθμιση της CRD-BP/IMP-1 από μέλη της TET οικογένειας. Αρχικά μελετήθηκε το μοτίβο έκφρασης των TET πρωτεϊνών στα MSC αφού δεν υπήρχαν προηγούμενα δεδομένα. Όλοι οι MSC πληθυσμοί, ενήλικης και εμβρυικής προέλευσης, βρεθήκαν να εκφράζουν τις TET πρωτεΐνες, η *TET1* και *TET2* όμως εκφράζονταν περισσότερο στα UC-MSC όπως και η CRD-BP/IMP-1.

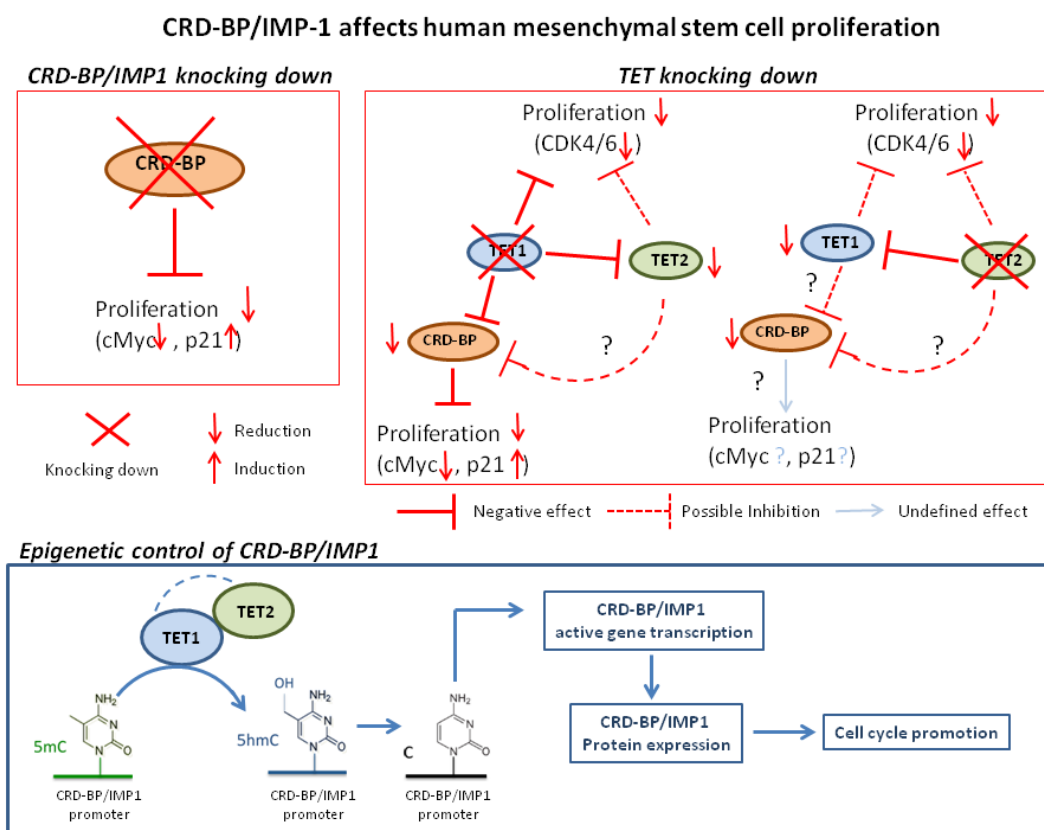
Η διαφορική αυτή έκφραση, που ακολουθεί το μοτίβο της έκφρασης της CRD-BP/IMP-1, μας οδήγησαν να διευκρινίσουμε περαιτέρω τον ρόλο των TET1 και TET2, με πειράματα επιλεκτικής παρεμπόδισης. Όντως βρέθηκε, πως η μείωση της έκφρασης του TET1 ή του TET2 επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των MSC,

όμως σε διαφορετικό βαθμό. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με των Koh *et al* που αναφέρουν ότι οι επιπτώσεις της μείωσης της TET1 ήταν κυρίαρχες σε σχέση με τον ηπιότερο αποτέλεσμα της μείωσης της TET2⁹⁶. Η μείωση της TET1 οδήγησε στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου μέσω της σημαντικής αύξησης των επιπέδων του p21 και με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων του c-MYC, φαινόμενα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν με την σίγαση της CRD-BP/IMP1. Ασθενέστερη αλλά σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε και με την μείωση της TET2, αν και παρατηρήθηκε το αντίθετο φαινόμενο από ότι με την TET1 (μείωση των επιπέδων του p21 και αύξηση του c-MYC). Η επιλεκτική παρεμπόδιση τόσο της TET1 όσο και της TET2 προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα των CDK4 και 6, βασικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Συνεπώς η TET1 επηρεάζει τόσο το c-MYC/p21 όσο και το CDK4/6 μονοπάτι, εξηγώντας έτσι την πιο ισχυρή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά την μείωση της έκφρασης της. Οι ηπιότερες επιπτώσεις που παρατηρήθηκαν με την επιλεκτική παρεμπόδιση της TET2 μπορούν να εξηγηθούν από την ικανότητά της να επηρεάζει μόνο τις CDK4 και 6 χωρίς όμως να ρυθμίζει καταλλήλως τα c-MYC και /ή p21.

Μιας και οι επιπτώσεις της καταστολής της έκφρασης της TET1 και της TET2 επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό των MSC, αυτό αποτέλεσε σημαντική ένδειξη για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου τους στην ρύθμιση της έκφρασης της *CRD-BP/IMP-1*. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση του *CRD-BP/IMP-1* mRNA, μετά την καταστολή της έκφρασης του TET1 και του TET2. Η TET1, όμως προκάλεσε σχεδόν διπλάσια μείωση του *CRD-BP/IMP-1* από αυτή της TET2. Πιθανά λοιπόν η έκφραση του *CRD-BP/IMP-1* ελέγχεται άμεσα από την TET1. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από το μοτίβο μεθυλίωσης του υποκινητή του *CRD-BP/IMP1* που διαπιστώθηκε ότι αλλάζει όταν κλείνει η έκφραση της TET1. Βέβαια, πρέπει να μελετηθεί το μοτίβο αυτό και μετά την επιλεκτική παρεμπόδιση του TET2. Επιπλέον δημοσιεύτηκε πρόσφατα ότι η TET1 αλλά και η TET2 συνδέονται φυσικά με το NANOG, όμως μόνο η TET1 και ο NANOG δεσμεύονται στο DNA, δίνοντας έτσι έναν ρόλο

συμπαράγοντα στη TET2. Ανάμεσα στα γονίδια που μπορεί να ελέγχει το σύμπλοκο TET1/NANOG στα ESC, φαίνεται να είναι και αυτό της CRD-BP/IMP1 (IGF2BP1), και μάλιστα σε πολύ υψηλή θέση, τρίτο κατά σειρά. Η κατάταξη αυτή προσδιορίστηκε με βάση τη δεσμευτική ικανότητα του συμπλόκου στις διάφορες DNA αλληλουχίες και περιλαμβάνει περιοχές πλούσιες σε γονίδια σημαντικά για την πολυδυναμικότητα και την διαφοροποίηση των ESC²⁵⁹.

Αν η έκφραση της CRD-BP/IMP1 εμπλέκεται μόνο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των MSC ή έχει και άλλους ρόλους στην φυσιολογία των MSC παραμένει να διερευνηθεί. Στο παρακάτω σκίτσο συνοψίζεται διαγραμματικά ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών: CRD-BP/IMP1, TET1 και TET2 στα MSC έτσι όπως ορίστηκε για πρώτη φορά στην εργασία αυτή.



3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στο τρίτο μέρος της παρούσας μελέτης εξετάστηκε κατά πόσον η συστηματική χορήγηση MSC θα μπορούσε να δράσει ευεργετικά ή ακόμα και να καθυστερήσει την γήρανση σε ένα προκλινικό μοντέλο ποντικού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε μεσήλικες ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκαν, επαναληπτικά, MSC από τον BM νεαρών ομόλογων ζώων. Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εξετάσαμε τα ζώα για τυχόν μεταβολές σε δύο διαφορετικά επίπεδα: α) σε ορισμένα τυπικά χαρακτηριστικά του BM-MSC των υποβληθέντων σε αγωγή ποντικών και της ομάδας ελέγχου και β) για την παρουσία χαρακτηριστικών γήρανσης στο επίπεδο του οργανισμού συνδεδεμένα με τα MSC, όπως μυοσκελετικό εκφυλισμό, δερματική ατροφία, φλεγμονώδεις ασθένειες, κλπ.

Όπως διαπιστώθηκε στο πρώτο κομμάτι της εργασίας αυτής, η συχνότητα των MSC μειώνεται με την γήρανση του οργανισμού. Δεδομένου ότι το BM αποτελεί τη βασική αποθήκη των MSC, επιδιώξαμε να εκτιμήσουμε αν η χορήγηση MSC θα μπορούσε να συμβάλλει στην αναπλήρωση του BM-MSC πληθυσμού. Πράγματι, με την CFU-f δοκιμασία βρέθηκε ενισχυμένη η δυνατότητα αυτοανανέωσης του πληθυσμού MSC των υπό αγωγή ζώων, ενδεικτικό γεγονός υψηλότερης συχνότητας πολυδύναμων MSC.

Παρόλα αυτά όταν τα MSC απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν *in vitro*, οι πληθυσμοί και των δυο ομάδων παρουσίασαν παρόμοια ικανότητα πολλαπλασιασμού. Παρατήρηση που συμφωνεί με τα στοιχεία μας από την πρώτη φάση της εργασίας αυτής κατά την οποία μελετήθηκε το πώς επηρεάζει το φύλο και η ηλικία τον MSC πληθυσμό. Δηλαδή ότι κατά την επιλογή και την επέκταση *in vitro*, όλα τα BM παρασκευάσματα παρουσιάζουν συγκρίσιμη πολλαπλασιαστική ικανότητα, ανεξάρτητα από την ηλικία του δότη. Επιπλέον, τα δεδομένα του προκλινικού αυτού μοντέλου υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον εάν παρέχονται τα απαραίτητα

σήματα. Ως εκ τούτου, ενισχύεται για άλλη μια φορά η εξωγενής θεωρία της γήρανσης των βλαστοκυττάρων που δηλώνει ότι τα κύτταρα οδηγούνται σε γήρανση κυρίως λόγω των αλλαγών στο μικροπεριβάλλον τους.

Παρόλο που ο στόχος αυτού του μοντέλου δεν ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των MSC, μας ενδιέφερε τουλάχιστον να διερευνήσουμε αν παρατηρήσεις μας οφείλονταν στην ανασύσταση του ενδογενούς MSC πληθυσμού από τα χορηγούμενα MSC ή μέσω της παρακρινούς δράσης τους. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκαν αρσενικά MSC σε θηλυκούς ποντικούς προκειμένου να υπάρχει δυνατότητα αξιολόγησης της παρουσίας τους στο BM, με την ανίχνευση του γονιδίου SRY, ειδικού για το Y χρωμόσωμα. Το γονίδιο δεν ήταν ανιχνεύσιμο σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Παρατήρηση που συμφωνεί με την μελέτη των Lavasani et al, η οποία αποδεικνύει την ευεργετική επίδραση των MDSPC μέσω παρακρινούς δράσης, για την καθυστέρηση της γήρανσης σε ένα μοντέλο ποντικού πρόωρης γήρανσης²⁶⁰.

Ένα μεγάλο ποσοστό παθολογιών συνυφασμένων με την γήρανση σχετίζονται με διαφορετικούς τύπους συνδετικού ιστού, οι όποιοι είναι κυρίως μεσεγχυματικής προέλευσης, όπως το οστό, το λίπος, ο χόνδρος κλπ. Έτσι, θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσον η κυτταρική θεραπεία με MSC θα αμβλύνει αυτές τις παθολογικές αλλαγές. Συνεπώς, μετά την ολοκλήρωση του σχήματος εξετάστηκε το μυοσκελετικό και το δερματικό σύστημα για εκφυλιστικά σημάδια γήρανσης. Ο βαθμός λорδοκύφωσης των υποβληθέντων σε αγωγή ποντικών ήταν σημαντικά μειωμένος, ενώ δεν ανιχνεύθηκε οστεοαρθρικός εκφυλισμός και οι αρθρικές επιφάνειες τους ήταν συγκρίσιμες με ποντικούς 6-μηνών (ανώτατο όριο ενήλικων). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τα πρόσφατα στοιχεία που αναφέρθηκαν από τους Lavasani et al (ref). και Liu et al (ref). Συγκεκριμένα, οι Liu et al έδειξαν ότι η χορήγηση ενήλικων βλαστοκυττάρων ανακουφίζει τον οστεοπορωτικό φαινότυπο, αν και η θεραπεία είναι πιο αποτελεσματική όταν τα MSC που χρησιμοποιούνται έχουν απομονωθεί από νέους δότες. Επιπλέον, οι Lavasani et al

ανίχνευσαν σημαντική μείωση της σκελετικής μυϊκής ατροφίας, και νέο-αγγείωση τόσο στον εγκέφαλο όσο και στους ιστούς των μυών μετά την χορηγία μυικών βλαστοκυττάρων (muscle-derived stem cells, MDSC)²⁶⁰.

Επιπλέον, ο υποδόριος λιπώδης ιστός του ραχιαίου δέρματος ήταν σημαντικά αυξημένος, ενώ η γούνα και το δέρμα δεν εμφάνιζαν σημάδια εκφυλισμού στα ποντίκια που λάμβαναν θεραπεία. Οι Kim *et al* έχουν αναφέρει στο παρελθόν ότι η υποδόρια χορήγηση βλαστοκυττάρων σε άτριχα νεαρά ποντίκια που έχουν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία βελτίωσε το δερματικό πάχος και το περιεχόμενο κολλαγόνου στο χόριο. Η βελτίωση αυτή ήταν το αποτέλεσμα της έκκρισης αυξητικών παραγόντων και της ενεργοποίησης των δερματικών ινοβλαστών²⁶¹. Η μελέτη μας μαζί με αυτήν των Kim *et al* υποστηρίζουν την πιθανή χρήση των MSC στη κυτταρική θεραπεία για την μετρίαση των εκφυλισμών του δέρματος.

Η ανοσολογική δυσλειτουργία ομοίως συμβάλλει στη γήρανση του οργανισμού²⁶². Η φλεγμονή που προκαλείται από τον τραυματισμό των ιστών, ένα σύνθηδες φαινόμενο στον ηλικιωμένο οργανισμό, καθώς και η εξάντληση των κυτταρικών υποπληθυσμών υπευθύνων για τις ανοσοαποκρίσεις οδηγούν σε συστηματικές δυσλειτουργίες κατά την γήρανση. Είναι γνωστό ότι τα MSC προκαλούν ανοσοκατασταλή²⁶³⁻²⁶⁵. Στο δικό μας μοντέλο παρατηρήθηκε μειωμένη φλεγμονή στους ιστούς του πνεύμονα, του ήπατος και των εντέρων. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που υποδηλώνει ότι τα MSC θα μπορούσαν να ανακουφίσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε διαφορετικά συστήματα, όταν χορηγηθούν *in vivo* σε ηλικιωμένα ποντίκια.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα καθώς και την παρόμοια συχνότητα κακοήθειας που συναντήθηκε, η συστηματική χορήγηση των MSC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματική κυτταρική θεραπεία για την πρόληψη της γήρανσης.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ -ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Συνοπτικά, τα δεδομένα αυτής της εργασίας ενισχύουν την εξωγενή θεωρία της γήρανσης των βλαστοκυττάρων, εντοπίζουν διαφορές στην ικανότητα διαφοροποίησης των MSC των δύο φύλων και στις πολλαπλασιαστικές ικανότητες μεταξύ των ανθρώπινων και ποντικίστων BM-MSC, καθώς και ανάμεσα στους διαφόρους ιστούς από τους οποίους απομονώθηκαν τα ανθρώπινα MSC. Ειδικότερα φαίνεται αυτή η διαφορά που παρατηρήθηκε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των διαφόρων πληθυσμών MSC να είναι ανάλογη της έκφρασης της CRD-BP/IMP-1.

Η γήρανση/ ωρίμανση του κυτταρικού αυτού πληθυσμού, που μελετήθηκε τόσο στα BM-MSC από το ποντίκι όσο και σε ανθρώπινα διαφορετικής ιστολογικής προέλευσης (ενήλικης και εμβρυικής) παρατηρήθηκε να συνδέεται με την έκφραση μορίων επιφανείας των MSC που αποτελούν σημαντικούς δείκτες αυτού του πληθυσμού: του CD73 και του CD105.

Το μοντέλο της κυτταρικής θεραπείας που εξετάσαμε, μας έδειξε πως η ομοιόσταση των ιστών, ειδικών της μεσοδερμικής διαφοροποίησης, διατηρείται όταν υποβοηθείται από κυτταρική έγχυση βλαστοκυττάρων, και ο οργανικός φαινότυπος των γηραιών ποντικών βελτιώνεται από την θετική επιρροή των MSC στο ανοσολογικό σύστημα. Περαιτέρω πειράματα κυτταρικής θεραπείας θα χρειαστούν για να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί δράσης των MSC που συντέλεσαν στην καθυστέρηση της γήρανσης. Επίσης θα είχε ενδιαφέρον να συγκριθούν τα αποτελέσματα της χορήγησης ενήλικων MSC με τα νεαρά που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή.

Τέλος, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας δείχνουν πως τα MSC έχουν κοινούς μηχανισμούς με τους εμβρυικούς ιστούς, όπως οι πρωτεΐνες TET1/2, NANOG και CRD-BP/IMP-1 καθώς και ο έλεγχος της έκφρασης γονιδίων με απομεθυλίωση. Δεδομένα που ενισχύουν τον ρόλο αυτών των μορίων στην λειτουργικότητα των MSC και βοηθούν στην αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών

πολυδυναμικότητας των βλαστοκυττάρων. Στο μέλλον θα ήταν πολύ σημαντικό να εξεταστεί και πώς οι πρωτεΐνες αυτές επηρεάζονται κατά την διαφοροποίηση των MSC.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC) είναι ένας πολύ σημαντικός πληθυσμός κυττάρων κυρίως λόγω της εύκολης απομόνωσής του από πολλούς ιστούς, της ικανότητας του για διαφοροποίηση προς ποικίλα προγονικά κύτταρα του μεσεγγύματος ή άλλου δέρματος καθώς και λόγω των ανοσορυθμιστικών τους δυνατοτήτων. Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός του πληθυσμού αυτού είναι μεγάλης σημασίας μιας και τα MSC τα τελευταία χρόνια αποτελούν έναν από τους πιο υποσχόμενους πληθυσμούς για κυτταρική θεραπεία και πολύ συχνά χρησιμοποιούνται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας εστιάσαμε :

- Στον διεξοδικό χαρακτηρισμό των MSC από το μυελό των οστών BALB/c ποντικών (mBM-MSC), λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του μοντέλου αυτού ανάμεσα στα ζωικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε πως επηρεάζει το φύλο και η ηλικία του δότη τις βασικές ιδιότητες (πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ανοσοκατασταλτική δράση) των mBM-MSC. Παρατηρήθηκε, μείωση της συχνότητας των προγονικών κυττάρων στο BM με την ηλικία και χαμηλότερες συχνότητες MSC σε όλους τους θηλυκούς δότες ανεξαρτήτως ηλικίας. Μετά την απομόνωση και επιλογή του πληθυσμού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις ιδιότητες των MSC. Όμως η εκτενής καλλιέργεια τους, προκάλεσε αύξηση του ρυθμού διπλασιασμού, μείωση του μεγέθους και της πολυπλοκότητας των κυττάρων.
- Επιπλέον, τα mBM-MSC εξετάστηκαν για την έκφραση των τριών πιο σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ESC): *Oct3/4*, *Sox-2*, και *Nanog*, καθώς και για την έκφραση δυο mRNA δεσμευτικών πρωτεϊνών της *Crd-bp/Imp1* και της *Dazl*, οι οποίες εκφράζονται στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του ομφαλιοπλακουντικού αίματος (UCB-CD34⁺-HSC) και στα βλαστικά κύτταρα του αμνιακού υγρού, αντίστοιχα. Αναφέρουμε, για πρώτη φορά, την

έκφραση της *Crdbp/Imp1* και της *Dazl* στον mBM-MSC πληθυσμό. Η έκφραση του *Dazl*, *Oct3/4*, και *Sox2* ανιχνεύθηκε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, σε αντίθεση με αυτήν των *Crd-bp/Imp1*, *c-Myc* (τον πιο σημαντικό στόχο της *Crd-bp/Imp1*) και *Nanog*, που εκφράζονταν σε υψηλά επίπεδα, ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του δότη, ή την *in vitro* καλλιέργεια.

- Στον προσδιορισμό της επίδρασης της ενδοφλέβιας χορήγησης νεαρών mBM-MSC σε ηλικιωμένα ποντίκια για την καταπράυνση του φαινοτύπου της γήρανσης. Μελέτες των τελευταίων χρόνων έχουν συνδέσει την γήρανση με την εξάντληση της αποθήκης των βλαστοκυττάρων. Επομένως, η ενίσχυση του πληθυσμού αυτού με συστηματική χορήγηση βλαστικών κυττάρων θα μπορούσε πιθανά να βελτιώσει τον φαινότυπο της γήρανσης μέσω της βελτιωμένης αναγέννησης των ιστών. Εδώ δείχνουμε για πρώτη φορά την θετική έκβαση αυτής της χορήγησης, πιθανά μέσω παρακρινούς δράσης: α) στον οργανισμό σαν σύνολο (πρόληψη μυοσκελετικού εκφυλισμού, δερματικής ατροφίας, μείωση φλεγμονώδους απόκρισης κλπ.) και β) στον ίδιο τον mBM-MSC πληθυσμό.

Συνεπώς, το πιλοτικό αυτό προκλινικό μοντέλο καθώς και τα δεδομένα από το πρώτο μέρος της μελέτης ενισχύουν την αντίληψη ότι τα βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ 'αόριστον εάν παρέχονται τα απαραίτητα σήματα.

- Στην έκφραση του CRD-BP/IMP1 στους διαφορετικούς πληθυσμούς MSC ανθρώπινης προέλευσης, συγκεκριμένα BM-MSC, AT-MSC (λιπώδους ιστού) και UC-MSC (ομφάλιου λώρου). Εδώ δείχνουμε για πρώτη φορά ότι αυτά τα MSC έχουν ένα μοτίβο διαφορετικής έκφρασης του CRD-BP/IMP-1 που μπορεί να συσχετιστεί με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Τα UC-MSC που έχουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού εκφράζουν επίσης CRD-BP/IMP1 σε υψηλότερα επίπεδα. Μετά από πειράματα επιλεκτικής παρεμπόδισης της έκφρασης του CRD-BP/IMP1

παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της *in vitro* αυτοανανέωσης τους. Επιπλέον επιβεβαιώνεται πως η έκφραση της CRD-BP/IMP1 βρίσκεται υπό επιγενετικό έλεγχο και μέλη της οικογένειας των TET απομεθυλασών εμπλέκονται στην ρύθμιση της στα ανθρώπινα MSC. Ειδικότερα το TET1, TET2, CRD-BP/IMP1 μαζί με το c-Myc αποτελούν αναπόσπαστα κομμάτια ενός πολύπλοκου δικτύου που συμμετέχουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των MSC.

ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSC) is a population that can be found in many tissues and can differentiate towards many different lineages. Unraveling their profile is of great importance, due to the fact that these cells are very often used in preclinical and clinical studies. During the course of this study we focused on:

- The thorough characterization of the bone marrow MSC (BM-MSC) population derived from the BALB/c species, considering the significance of the murine model amongst animal models. Specifically, we examined the effect of gender, age, and *in vitro* culture on the basic properties (proliferation, differentiation, and immunosuppressive potential) of mouse BM-MSC (mBM-MSC); and found a decline of the progenitor frequencies in the BM with age, lower MSC frequencies in all female donors, and an increase in the mBM-MSC proliferation rate upon *in vitro* propagation.
- We also examined mBM-MSC for the expression of the 3 major embryonic stem cell transcription factors, Oct3/4, Sox-2, and Nanog, as well as 2 mRNA binding proteins, Coding Region Determinant Binding Protein/Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1 (Crd-bp/Imp1) and Deleted in Azoospermia-Like (Dazl), which are expressed in umbilical cord blood hematopoietic stem cells and amniotic fluid stem cells, respectively. We report, for the first time, the expression of *Crdbp/Imp1* and *Dazl* in mBM-MSC. *Dazl*, *Oct3/4*, and *Sox2* were detected in relatively low levels in contrast to *Crd-bp/Imp1*, its major target *c-Myc*, as well as *Nanog*, which were expressed redundantly, irrespective of sex, donor age, or *in vitro* passaging.

These findings could further support the extrinsic theory of aging of the MSC population and the potential implication of embryonic genes in adult stem cell physiology.

- Determining the effect of intravenous administration of young mBM-MSC to elderly mice in the alleviation of the aging phenotype in a preclinical mouse model. Aging has been recently linked to stem cell exhaustion. Therefore an enhancement in tissue regeneration through the replenishment of the stem cell pool could probably improve the aging phenotype. Here we show the positive outcome of this administration: a) on organismal characteristics linked to aging, such as prevention of musculoskeletal degeneration, cutaneous atrophy, inflammatory diseases etc. and b) on the mBM-MSC population itself.

Once again the extrinsic theory of aging is supported which states that stem cells are driven into senescence by changes within the surrounding tissue. The data presented herein along with data from the first part of this study strengthen the notion that the cells possess the ability to proliferate indefinitely if the necessary signals are provided.

- The expression of CRD-BP/IMP1 in different MSC populations of human origin, specifically BM-MSC, adipose tissue (AT), and umbilical cord (UC). Here we demonstrate for the first time that these MSC have a differential pattern of CRD-BP/IMP-1 expression that could correlate with their proliferation rate. UC- MSC that have a higher proliferation rate also express CRD-BP/IMP1 at higher levels. Also, gene knocking down resulted in significant reduction of cell proliferation and *in vitro* self renewal. We also provide evidence that members of the TET family of demethylases are involved in the epigenetic regulation of CRD-BP/IMP-1 in human MSC. We show that TET1, TET2, CRD-BP/IMP1 along with c-MYC are pivotal parts of a complex network involved in the regulation of MSC proliferative capacity.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*. Jun 7 2007;1(1):35-38.
2. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. Feb 7 1997;88(3):287-298.
3. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 1964;51:29-36.
4. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. Jan 7 2000;100(1):157-168.
5. Robert Lanza JG, Brigid Hogan, et al. *Essentials of Stem Cell Biology*: Elsevier Academic Press; 2006.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. Aug 25 2006;126(4):663-676.
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Nov 30 2007;131(5):861-872.
8. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. Jul 9 1981;292(5819):154-156.
9. Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol*. May 2007;211(2):279-286.
10. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. Dec 15 1988;336(6200):688-690.
11. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. Dec 15 1988;336(6200):684-687.
12. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. Jul 1 1998;12(13):2048-2060.

13. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* Aug 2 1999;18(15):4261-4269.
14. Sekkai D, Gruel G, Herry M, et al. Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells. *Stem Cells.* Nov-Dec 2005;23(10):1634-1642.
15. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development.* Mar 2005;132(5):885-896.
16. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* Jun 15 1998;12(12):1769-1774.
17. Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(5):770-778.
18. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* Jan 2004;10(1):55-63.
19. Hao J, Li TG, Qi X, Zhao DF, Zhao GQ. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* Feb 1 2006;290(1):81-91.
20. Valdimarsdottir G, Mummery C. Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells. *APMIS.* Nov-Dec 2005;113(11-12):773-789.
21. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* Oct 31 2003;115(3):281-292.
22. Gerrard L, Rodgers L, Cui W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells.* Oct 2005;23(9):1234-1241.
23. Qi X, Li TG, Hao J, et al. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 20 2004;101(16):6027-6032.
24. Xu RH, Chen X, Li DS, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol.* Dec 2002;20(12):1261-1264.
25. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods.* Mar 2005;2(3):185-190.

26. Sato N, Sanjuan IM, Heke M, Uchida M, Naef F, Brivanlou AH. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol.* Aug 15 2003;260(2):404-413.
27. Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells.* Apr 2005;23(4):489-495.
28. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development.* Mar 2005;132(6):1273-1282.
29. Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* Oct 2001;19(10):971-974.
30. Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood.* Apr 15 2004;103(8):2956-2964.
31. Brandenberger R, Wei H, Zhang S, et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol.* Jun 2004;22(6):707-716.
32. Dvash T, Mayshar Y, Darr H, et al. Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Hum Reprod.* Dec 2004;19(12):2875-2883.
33. Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* May 15 2004;269(2):360-380.
34. Dvorak P, Hampl A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2005;43(4):203-208.
35. Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, et al. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* Sep 2005;23(8):1200-1211.
36. Kang HB, Kim JS, Kwon HJ, et al. Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1. *Stem Cells Dev.* Aug 2005;14(4):395-401.
37. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* Nov 15 2000;227(2):271-278.
38. Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* Jun 1 1999;210(1):30-43.

39. Armstrong L, Hughes O, Yung S, et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet.* Jun 1 2006;15(11):1894-1913.
40. Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature.* May 29 2003;423(6939):541-545.
41. Takahashi K, Murakami M, Yamanaka S. Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans.* Dec 2005;33(Pt 6):1522-1525.
42. Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem.* Nov 12 2004;279(46):48063-48070.
43. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* Dec 23 1994;266(5193):2011-2015.
44. Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene.* May 4 2006;25(19):2697-2707.
45. Xu C, Rosler E, Jiang J, et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells.* Mar 2005;23(3):315-323.
46. Jirmanova L, Afanassieff M, Gobert-Gosse S, Markossian S, Savatier P. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene.* Aug 15 2002;21(36):5515-5528.
47. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* May 2004;29(5):233-242.
48. Lin T, Chao C, Saito S, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* Feb 2005;7(2):165-171.
49. Qu L, Huang S, Baltzis D, et al. Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3beta. *Genes Dev.* Feb 1 2004;18(3):261-277.
50. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* Aug 15 2004;18(16):1926-1945.

51. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nov 2005;6(11):872-884.
52. Elisa A. Casanova KBaPC. Molecular Mechanisms of Pluripotency in Murine Embryonic Stem Cells. In: Atwood C, ed. *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis*: Intech; 2011.
53. Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development.* Mar 1996;122(3):881-894.
54. Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct.* Jun 2001;26(3):137-148.
55. Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol.* Aug 1999;19(8):5453-5465.
56. Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, et al. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* Jul 15 2002;30(14):3202-3213.
57. Zeng X, Miura T, Luo Y, et al. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells.* 2004;22(3):292-312.
58. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* Jan 1 2003;17(1):126-140.
59. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol.* Nov 1994;166(1):259-267.
60. Tanaka TS, Kunath T, Kimber WL, et al. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* Dec 2002;12(12):1921-1928.
61. Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* Dec 2002;12(5-6):321-329.
62. Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* Feb 18 2005;280(7):5307-5317.
63. Chew JL, Loh YH, Zhang W, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* Jul 2005;25(14):6031-6046.

64. Pan G, Li J, Zhou Y, Zheng H, Pei D. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* Aug 2006;20(10):1730-1732.
65. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* May 30 2003;113(5):643-655.
66. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* May 30 2003;113(5):631-642.
67. Pan G, Pei D. The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus. *J Biol Chem.* Jan 14 2005;280(2):1401-1407.
68. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem.* Aug 18 2006;281(33):23319-23325.
69. Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, et al. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 5 2006;103(27):10294-10299.
70. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* Jul 1 2005;280(26):24731-24737.
71. Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.* Mar 2005;25(6):2475-2485.
72. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* Sep 23 2005;122(6):947-956.
73. Ng HH, Surani MA. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol.* May 2011;13(5):490-496.
74. Stead E, White J, Faast R, et al. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene.* Nov 28 2002;21(54):8320-8333.
75. Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol.* Dec 2006;209(3):883-893.
76. Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, et al. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron.* Aug 4 2005;47(3):353-364.

77. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* Sep 2002;12(9):432-438.
78. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development.* Feb 2007;134(4):635-646.
79. White J, Stead E, Faast R, Conn S, Cartwright P, Dalton S. Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle-regulated cyclin-dependent kinase activity during embryonic stem cell differentiation. *Mol Biol Cell.* Apr 2005;16(4):2018-2027.
80. Savatier P, Lapillonne H, van Grunsven LA, Rudkin BB, Samarut J. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene.* Jan 18 1996;12(2):309-322.
81. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* Nov 6 1998;282(5391):1145-1147.
82. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* Apr 2006;24(4):1095-1103.
83. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul 2006;7(7):540-546.
84. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* May 18 2006;441(7091):349-353.
85. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell.* Jan 2006;10(1):105-116.
86. Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis.* Jan 2004;38(1):32-38.
87. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* Apr 21 2006;125(2):315-326.
88. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* Oct 13 2004;23(20):4061-4071.
89. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* Apr 21 2006;125(2):301-313.
90. Buszczak M, Spradling AC. Searching chromatin for stem cell identity. *Cell.* Apr 21 2006;125(2):233-236.

91. Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, et al. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* Oct 2004;24(20):8862-8871.
92. Carlone DL, Lee JH, Young SR, et al. Reduced genomic cytosine methylation and defective cellular differentiation in embryonic stem cells lacking CpG binding protein. *Mol Cell Biol.* Jun 2005;25(12):4881-4891.
93. Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle.* Jun 1 2009;8(11):1698-1710.
94. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* May 15 2009;324(5929):930-935.
95. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* Aug 26 2010;466(7310):1129-1133.
96. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* Feb 4 2011;8(2):200-213.
97. Nielsen FC, Gammeltoft S, Christiansen J. Translational discrimination of mRNAs coding for human insulin-like growth factor II. *J Biol Chem.* Aug 15 1990;265(23):13431-13434.
98. Hansen TV, Hammer NA, Nielsen J, et al. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol.* May 2004;24(10):4448-4464.
99. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* Feb 1999;19(2):1262-1270.
100. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* Jan 1999;19(1):1-11.
101. Nie Z, Hu G, Wei G, et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell.* Sep 28 2012;151(1):68-79.
102. Laurenti E, Wilson A, Trumpp A. Myc's other life: stem cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* Dec 2009;21(6):844-854.
103. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene.* May 13 2002;21(21):3414-3421.

- 104.** Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev.* Oct 15 2008;22(20):2755-2766.
- 105.** Levens D. Disentangling the MYC web. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 30 2002;99(9):5757-5759.
- 106.** Ioannidis P, Mahaira L, Papadopoulou A, et al. CRD-BP: a c-Myc mRNA stabilizing protein with an oncofetal pattern of expression. *Anticancer Res.* May-Jun 2003;23(3A):2179-2183.
- 107.** Eilers M. Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells.* Feb 28 1999;9(1):1-6.
- 108.** Amati B. Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat Cell Biol.* May 2001;3(5):E112-113.
- 109.** Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev.* Oct 1996;76(4):1005-1026.
- 110.** Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* Oct 8 1993;75(1):73-82.
- 111.** Sun FL, Dean WL, Kelsey G, Allen ND, Reik W. Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature.* Oct 23 1997;389(6653):809-815.
- 112.** Weksberg R, Shen DR, Fei YL, Song QL, Squire J. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* Oct 1993;5(2):143-150.
- 113.** Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* Sep 20 2000;92(18):1472-1489.
- 114.** Ohana P, Kopf E, Bibi O, et al. The expression of the H19 gene and its function in human bladder carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* Jul 2 1999;454(1-2):81-84.
- 115.** Drewell RA, Brenton JD, Ainscough JF, et al. Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch. *Development.* Aug 2000;127(16):3419-3428.
- 116.** Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res.* Nov 15 2002;62(22):6442-6446.
- 117.** Bock O, Schlue J, Kreipe H. Reduced expression of H19 in bone marrow cells from chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia.* Apr 2003;17(4):815-816.

118. Ruiz i Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development*. Jun 1999;126(14):3205-3216.
119. Liu CZ, Yang JT, Yoon JW, et al. Characterization of the promoter region and genomic organization of GLI, a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway. *Gene*. Mar 16 1998;209(1-2):1-11.
120. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. Apr 3 1987;236(4797):70-73.
121. Villavicencio EH, Yoon JW, Frank DJ, Fuchtbauer EM, Walterhouse DO, Iannaccone PM. Cooperative E-box regulation of human GLI1 by TWIST and USF. *Genesis*. Apr 2002;32(4):247-258.
122. Gitelman I. Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol*. Sep 15 1997;189(2):205-214.
123. Hebrok M, Fuchtbauer A, Fuchtbauer EM. Repression of muscle-specific gene activation by the murine Twist protein. *Exp Cell Res*. May 1 1997;232(2):295-303.
124. Walterhouse D, Ahmed M, Slusarski D, et al. gli, a zinc finger transcription factor and oncogene, is expressed during normal mouse development. *Dev Dyn*. Feb 1993;196(2):91-102.
125. Wallace VA. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol*. Apr 22 1999;9(8):445-448.
126. Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL. Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol*. Apr 1994;162(2):402-413.
127. Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem*. Feb 15 2002;277(7):5548-5555.
128. Noubissi FK, Goswami S, Sanek NA, et al. Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA. *Cancer Res*. Nov 15 2009;69(22):8572-8578.
129. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. Sep 1976;4(5):267-274.

130. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2 1999;284(5411):143-147.
131. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. May 1999;14(5):700-709.
132. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. Jul 1994;21(3):429-435.
133. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
134. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. Jan 1999;65(1):22-26.
135. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. Apr 2001;7(2):211-228.
136. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 5 2000;97(25):13625-13630.
137. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. Jun 2009;80(6):1136-1145.
138. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. Apr 2000;109(1):235-242.
139. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. Aug 2001;44(8):1928-1942.
140. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. Aug 15 2003;102(4):1548-1549.
141. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. Oct 15 2001;98(8):2396-2402.
142. Young HE, Mancini ML, Wright RP, et al. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn*. Feb 1995;202(2):137-144.

- 143.** Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* Nov 2003;123(4):702-711.
- 144.** Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* May 2006;24(5):1294-1301.
- 145.** Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res.* Sep 1997;12(9):1335-1347.
- 146.** Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* Nov 2007;25(11):2896-2902.
- 147.** Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* Apr 10 2008;2(4):313-319.
- 148.** Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med.* Oct 26 2009;206(11):2483-2496.
- 149.** Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford).* Feb 2008;47(2):126-131.
- 150.** Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* May 25 1990;265(15):8361-8364.
- 151.** Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Oct 2010;299(4):H959-974.
- 152.** Perez-Gomez E, Del Castillo G, Juan Francisco S, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, Quintanilla M. The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:2367-2384.
- 153.** Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* Aug 9 2002;277(32):29197-29209.
- 154.** Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem.* Jul 30 2004;279(31):32858-32868.

155. Resta R, Hooker SW, Hansen KR, et al. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene*. Nov 15 1993;133(2):171-177.
156. Salmi M, Jalkanen S. Homing-associated molecules CD73 and VAP-1 as targets to prevent harmful inflammations and cancer spread. *FEBS Lett*. Jun 6 2011;585(11):1543-1550.
157. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. Jun 2006;20(8):1045-1054.
158. Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol*. Sep 15 2004;173(6):3581-3588.
159. Reif AE, Allen JM. The Akr Thymic Antigen and Its Distribution in Leukemias and Nervous Tissues. *J Exp Med*. Sep 1 1964;120:413-433.
160. Pont S. Thy-1: a lymphoid cell subset marker capable of delivering an activation signal to mouse T lymphocytes. *Biochimie*. Apr 1987;69(4):315-320.
161. Mason JC, Yarwood H, Tarnok A, et al. Human Thy-1 is cytokine-inducible on vascular endothelial cells and is a signaling molecule regulated by protein kinase C. *J Immunol*. Jul 15 1996;157(2):874-883.
162. Barclay AN. Localization of the Thy-1 antigen in the cerebellar cortex of rat brain by immunofluorescence during postnatal development. *J Neurochem*. Apr 1979;32(4):1249-1257.
163. Seeger RC, Danon YL, Rayner SA, Hoover F. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J Immunol*. Feb 1982;128(2):983-989.
164. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*. Oct 12 2001;294(5541):339-345.
165. Alberts B JA, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
166. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jan 2003;4(1):33-45.
167. Holmes C, Stanford WL. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells*. Jun 2007;25(6):1339-1347.
168. Mitchell PO, Mills T, O'Connor RS, et al. Sca-1 negatively regulates proliferation and differentiation of muscle cells. *Dev Biol*. Jul 1 2005;283(1):240-252.

169. Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One*. 2009;4(8):e6498.
170. Algire C, Medrikova D, Herzig S. White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. May 2013;1831(5):896-904.
171. Park KW, Halperin DS, Tontonoz P. Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metab*. Dec 2008;8(6):454-457.
172. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dec 2006;7(12):885-896.
173. Anthony Atala RPL. *Methods of Tissue Engineering*: Academic Press; 2002.
174. Georgiou KR, Hui SK, Xian CJ. Regulatory pathways associated with bone loss and bone marrow adiposity caused by aging, chemotherapy, glucocorticoid therapy and radiotherapy. *Am J Stem Cells*. 2012;1(3):205-224.
175. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. Dec 2004;3(6):379-389.
176. Rickard DJ, Wang FL, Rodriguez-Rojas AM, et al. Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone*. Dec 2006;39(6):1361-1372.
177. Sadler TW. *Langman's ιατρική εμβρυολογία: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας*; 2002.
178. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. Jul 15 2006;312(12):2169-2179.
179. Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2011;18:49.
180. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. Oct 2006;36(10):2566-2573.
181. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*.1(1):2.
182. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. Jun 2012;8(2):375-392.

- 183.** Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* May 2007;28(5):219-226.
- 184.** Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* Feb 15 2005;105(4):1815-1822.
- 185.** Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* Jan 2002;30(1):42-48.
- 186.** Abul K. Abbas AHHL. *Cellular and Molecular Immunology*: Elsevier; 2011.
- 187.** Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* May 15 2002;99(10):3838-3843.
- 188.** Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* Feb 15 2003;75(3):389-397.
- 189.** Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* Feb 2006;24(2):386-398.
- 190.** Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* May 1 2003;101(9):3722-3729.
- 191.** Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* Apr 1 2005;105(7):2821-2827.
- 192.** Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells.* Jul 2007;25(7):1753-1760.
- 193.** Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity.* May 2009;30(5):646-655.
- 194.** Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol.* Jul 1 2010;185(1):302-312.
- 195.** Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* Apr 2005;90(4):516-525.
- 196.** Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity.* May 2009;30(5):656-665.

197. Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. May 2009;30(5):636-645.
198. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. Jan 1 2006;107(1):367-372.
199. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. Aug 1 2008;112(3):461-469.
200. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev*. Aug 2008;224:58-69.
201. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevas CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. Jan 2006;24(1):74-85.
202. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. Feb 1 2008;111(3):1327-1333.
203. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. Feb 15 2006;107(4):1484-1490.
204. Poggi A, Zocchi MR. Antigen presenting cells and stromal cells trigger human natural killer lymphocytes to autoreactivity: evidence for the involvement of natural cytotoxicity receptors (NCR) and NKG2D. *Clin Dev Immunol*. Jun-Dec 2006;13(2-4):325-336.
205. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. Apr 1997;156:25-37.
206. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. May 15 2005;105(10):4120-4126.
207. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. Jun 25 2009;113(26):6576-6583.
208. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. Mar 1 2005;105(5):2214-2219.
209. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5:19.

210. Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* 2011;9:52.
211. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4:20.
212. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* Jul 9 2012;3(4):25.
213. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med.* Jun 2010;38(6):1110-1116.
214. Le Blanc K, Gotthardt C, Ringden O, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation.* Jun 15 2005;79(11):1607-1614.
215. Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* Jul 1 2004;94(1):92-95.
216. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* May 1 2004;363(9419):1439-1441.
217. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* May 27 2006;81(10):1390-1397.
218. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med.* Oct 2007;10(4):459-466.
219. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Oct 2009;21(10):1199-1205.
220. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep 2007;8(9):703-713.
221. Van Zant G, Liang Y. The role of stem cells in aging. *Exp Hematol.* Aug 2003;31(8):659-672.

- 222.** Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevas CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. Feb 2006;24(2):462-471.
- 223.** Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. Mar 1 2004;103(5):1662-1668.
- 224.** Janet Rossant PPLT. *Mouse Development*
Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis: ACADEMIC PRESS; 2002.
- 225.** Ezech UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer*. Nov 15 2005;104(10):2255-2265.
- 226.** Sambrook J. FEF, Maniatis T. *Molecular cloning – A laboratory manual*, : Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
- 227.** James G. Fox MTD, Fred W. Quimby, Stephen W. Barthold, Christian E. Newcomer and Abigail L. Smith. *The Mouse in Biomedical Research*, 2nd Edition: Academic Press; 2007.
- 228.** Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
- 229.** Chao JA, Patskovsky Y, Patel V, Levy M, Almo SC, Singer RH. ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev*. Jan 15 2010;24(2):148-158.
- 230.** Lemm I, Ross J. Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol*. Jun 2002;22(12):3959-3969.
- 231.** Runge S, Nielsen FC, Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem*. Sep 22 2000;275(38):29562-29569.
- 232.** Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, et al. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol*. Oct 20 1997;139(2):541-552.
- 233.** Reddi AH. Aging, osteoarthritis and transforming growth factor-beta signaling in cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(1):101.

234. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature*. Nov 7 1996;384(6604):33.
235. Di Mitri D, Azevedo RI, Henson SM, et al. Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells. *J Immunol*. Sep 1 2011;187(5):2093-2100.
236. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, et al. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*. Dec 2009;45(6):1065-1072.
237. Gou S, Wang C, Liu T, et al. Spontaneous differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells into adipocytes without malignant transformation after long-term culture. *Cells Tissues Organs*.191(3):185-192.
238. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*. Feb 2006;5(1):91-116.
239. Wagner W, Bork S, Horn P, et al. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*. 2009;4(6):e5846.
240. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*. Oct 2011;10(5):761-768.
241. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, et al. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res*. Dec 5 2008;103(12):1383-1392.
242. Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol*. 2008;9:60.
243. Barnett YA. *Aging- Methods and Protocols*: Humana Press Inc.; 2000.
244. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. Apr 2000;113 (Pt 7):1161-1166.
245. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, et al. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*. Dec 2009;5(4):378-386.
246. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells*. Dec 2007;25(12):3143-3154.

247. Haston KM, Tung JY, Reijo Pera RA. Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells in vivo and in vitro. *PLoS One*. 2009;4(5):e5654.
248. Stefanidis K, Loutradis D, Anastasiadou V, et al. Embryoid bodies from mouse stem cells express oxytocin receptor, Oct-4 and DAZL. *Biosystems*. Nov 2009;98(2):122-126.
249. Stefanidis K, Loutradis D, Koumbi L, et al. Deleted in Azoospermia-Like (DAZL) gene-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for germ cells research? *Fertil Steril*. Sep 2008;90(3):798-804.
250. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. Jul 29 2005;122(2):303-315.
251. Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest*. Jul 2006;86(7):654-663.
252. Ioannidis P, Mahaira LG, Perez SA, et al. CRD-BP/IMP1 expression characterizes cord blood CD34+ stem cells and affects c-myc and IGF-II expression in MCF-7 cancer cells. *J Biol Chem*. May 20 2005;280(20):20086-20093.
253. Jones BK, Levorse J, Tilghman SM. Deletion of a nuclease-sensitive region between the Igf2 and H19 genes leads to Igf2 misregulation and increased adiposity. *Hum Mol Genet*. Apr 1 2001;10(8):807-814.
254. Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*. Jan 23 2009;136(2):364-377.
255. Pelengaris S, Rudolph B, Littlewood T. Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. Feb 2000;10(1):100-105.
256. Singh AM, Dalton S. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*. Aug 7 2009;5(2):141-149.
257. Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol*. Jun 12 2000;149(6):1297-1308.
258. Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene*. May 13 1999;18(19):2967-2987.
259. Costa Y, Ding J, Theunissen TW, et al. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*. Mar 21 2013;495(7441):370-374.

- 260.** Lavasani M, Robinson AR, Lu A, et al. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun.* 2012;3:608.
- 261.** Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci.* Feb 2009;53(2):96-102.
- 262.** Pawelec G, Larbi A. Immunity and ageing in man: Annual Review 2006/2007. *Exp Gerontol.* Jan 2008;43(1):34-38.
- 263.** DeVeale B, Brummel T, Seroude L. Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell.* Aug 2004;3(4):195-208.
- 264.** Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. *Exp Gerontol.* Aug 2008;43(8):718-728.
- 265.** Andrews NP, Fujii H, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomeres and immunological diseases of aging. *Gerontology.* 2010;56(4):390-403.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	
Ανθρώπινα MSC	Ποντικίσια MSC
Λιπογένεση	
DMEM 10%	DMEM 10%
0.5 μ M Dexamethasone	10^{-8} M Dexamethasone
0.5 mM IBMX	0.5 μ M Isobutyl-methylxanthine (IBMX)
60 μ M Indomethacin	50 μ M Indomethacin
10 μ g/mL Insulin	5 μ g/mL Insulin
Οστεογένεση	
DMEM 10%	DMEM 10%
10^{-7} M Dexamethasone	10^{-9} M Dexamethasone
10mM b-glycerolphosphate	20mM b-glycerolphosphate
50 μ M L-ascorbic acid	0.5 μ M L-ascorbic acid

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Συνθήκες *in vitro* Διαφοροποίησης

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. Εκκινητές qPCR για την ανίχνευση της έκφρασης γονιδίων του ποντικού

Γονίδιο	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Τ Υβριδισμού (C°)	Προϊόν (bp)
<i>Gapdh</i>	GTGTTCTACCCCCAATGTG	GTCATTGAGAGCAATGCCAG	60	214
<i>Oct3/4</i>	CCAATCAGCTTGGGCTAGAG	CCTGGGAAAGGTGTCCCTGTA	60	130
<i>Sox2</i>	GCTGGGAGAAAGAAGAGGAG	ATCTGGCGGAGAATAGTTGG	60	180
<i>Nanog</i>	GAGTGTGGGTCTTCCTGGTC	GAGGCAGGTCTTCAGAGGAA	60	180
<i>Crd-bp</i>	GGCTGCTCCCTATAGCTCCT	CTGGTGGTGCAATCTTGATG	60	160
<i>c-Myc</i>	AGCGACTCTGAAGAAGAGCAA	GTTGTGCTGGTGAGTGGAGA	61	176
<i>Igf2</i>	CTGGACATTAGCTTCTCCTG	CAAACCTGAAGCGTGTCAACAA	58	224
<i>h19</i>	AGAGCTGGAGGAGAGTCGTG	TCCTCTCCAACCCTAGCTCA	63	160
<i>Dazl</i>	CCTCCAACCATGATGAATCC	CATAACTCCTCTGCTCTCCA	60	150
<i>Lpl</i>	GACACAGCTGAGGACACTTG	GACACTGGATAATGTTGCTGG	62	230
<i>Bglap</i>	ACCCTGGCTGCGCTCTGTCTCT	GGTTAAGCTCACACTGCTCC	62	184

Συμπληρωματικός Πίνακας 3. Εκκινητές qPCR για την ανίχνευση της έκφρασης των ανθρώπινων γονιδίων

Γονίδιο	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Τ Υβριδισμού (C°)	Προϊόν (bp)
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	60	224
<i>CRD-BP</i>	GACCCAGTCCAAGATAGACG	GTGTCCTTAGCCTCTTTATGC	60	140
<i>DAZL</i>	GGAGCTATGTTGTACCTCC	CCATGTAAGTAGATAAGCCAG	58	312
<i>IGF2</i>	CTGGAGACGTACTGTGCTACCCCC	GTGTCATATTGGAAGAACTTGCCC	65	115
<i>GLI1</i>	GTGCAAGTCAAGCCAGAACA	ATAGGGGCCTGACTGGAGAT	59	161
<i>β-ACTIN</i>	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	TCGTTAATGTCACGCACGAT	60	225
<i>TET1</i>	GACCCGGCCAGCGACCAAAAC	AAGGGCGCAGGAAACAGAGTCAT	59	111
<i>TET2</i>	ACACCAACCAAAAGAACAGCTGC	CCCTTCTGTCCAAACCTTTCTTCC	59	244
<i>TET3</i>	CAAGTTCCGCCTCGCAGGGG	GGGCGTGGGCACAGAAGTCC	59	223
<i>NANOG</i>	CCTGTGATTTGTGGGCCTG	GACAGTCTCCGTGTGAGGGAT	60	77
<i>SOX2</i>	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG	TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC	60	77
<i>OCT3/4A</i>	CTCCTGGAGGGCCAGGAATC	CCACATCGGCCTGTGTATAT	54	380
<i>OCT3/4B</i>	ATGCATGAGTCAGTGAACAG	CCACATCGGCCTGTGTATAT	54	302
<i>p21</i>	CAGCATGACAGATTTCTACCAC	AGACTAAGGCAGAAGATGTAGAG	60	135
<i>CDK4</i>	ATCTTTGACCTGATTGGGCT	AAAGTCAGCATTTCCAGCAG	60	157
<i>CDK6</i>	CACGAACAGACAGAGAAACC	TGAATGAAGAAAGTCCAGACCT	60	157
<i>c-MYC</i>	c-MYC PCR kit	(6406G), Ambion Inc	59	~100

Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Εκκινητές qPCR για την ανίχνευση του Sry γονιδίου

Γονίδιο	Forward	Reverse	T Υβριδισμού (°C)
Sry	CTCATCGGAGGGCTAAAGTG	AAGCTTTGCTGGTTTTTGGGA	62
Casein	GATGTGCTCCAGGCTAAAGTT	AGAAACGGAATGTTGTGGAGT	60

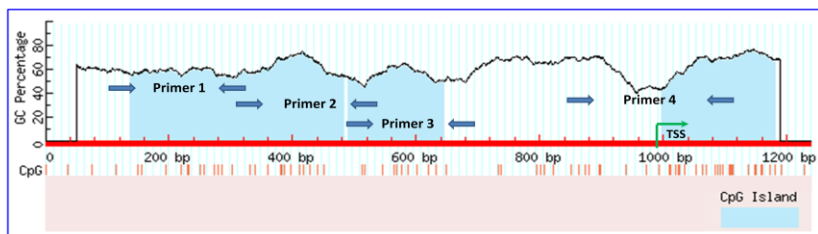
Συμπληρωματικός Πίνακας 5. Ειδικά μόρια si που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επιλεκτική παρεμπόδιση του αντίστοιχου γονιδίου

Γονίδιο	GenBank Accession No.	si Αλληλουχία
CRD-BP/IMP-1	NM_006546	CCUGGCUGCUGUAGGUCUU AAGACCUACAGCAGCCAGG
TET1	NM_030625	UCUUCAUCACUGCUUCUUCUU GAAGAAGCAGUGAUGAAGAUU
TET2	NG_028191	AUCACAGCUUGCAGGUGGAUU UCCACCUGCAAGCUGUGAUUU

Συμπληρωματική Εικόνα 1: Περιοχή του CRD-BP/IMP1 υποκινητή

MethPrimer result

Please cite MethPrimer: Li LC and Dahiya R. [MethPrimer: designing primers for methylation PCRs](#). Bioinformatics. 2002 Nov;18(11):1427-3
PMID: [12424112](#)



Sequence Name: IGF2BP1 1KB UPSTREAM
Sequence Length: 1238

CpG island prediction results
(Criteria used: Island size > 100, GC Percent > 50.0, Obs/Exp > 0.6)
3 CpG island(s) were found in your sequence

	Size	(Start - End)
Island 1	345 bp	(138 - 482)
Island 2	155 bp	(491 - 645)
Island 3	185 bp	(998 - 1182)

Συμπληρωματικός Πίνακας 6. Ειδικοί εκκινητές qPCR για την περιοχή του CRD-BP/IMP1 υποκινητή

Περιοχή	Forward	Reverse	Τ Υβριδισμού (°C)
1	CCTAAGACCTCCCCCTTCAG	AGGAAGCCGCAGGAAATAAT	60
2	CGTGGGGATCTCAAAACATT	TCGCACGAGCTGGTGATTTA	60
3	GCGACCCTCTCCTGAAGAC	GTCCAGCCCAGATCTCACAT	60
4	CGGGAGATTATCGGGTTTG	GGAGAGCCCAGGAGAAGTG	60

ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ WESTERN BLOT

RIPA buffer (Radio Immuno Precipitation Assay buffer)

150 mM sodium chloride

1.0% NP-40 or Triton X-100

0.5% sodium deoxycholate

0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate)

50 mM Tris, pH 8.0

TBS 10X: 24.2 g Tris, 84 g NaCl, ddH₂O στο 1L, pH στο 7.6 με HCl

Πρωτεϊνικοί Αναστολείς:

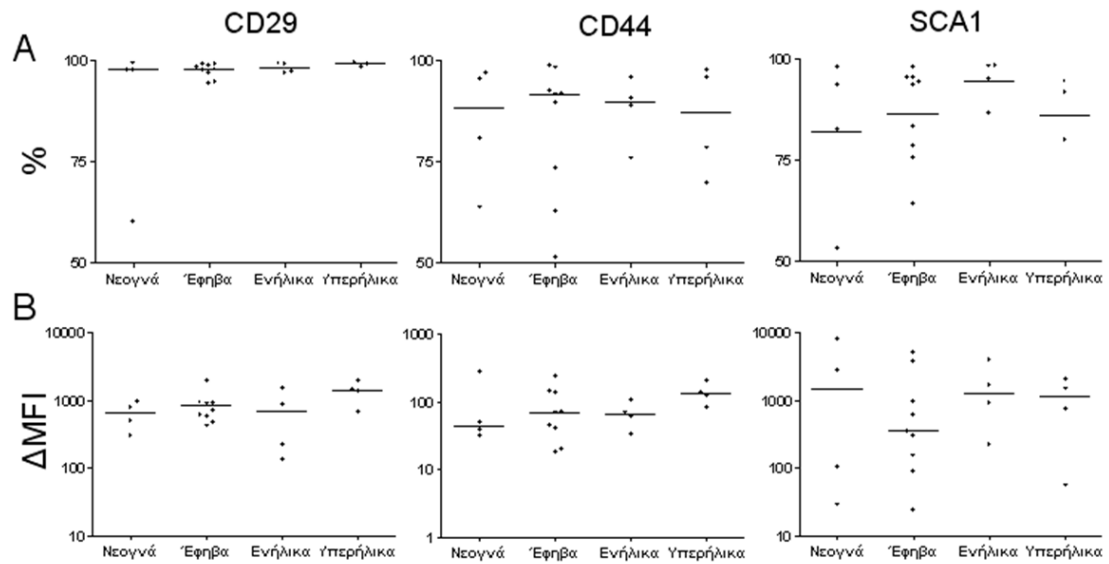
Inhibitor	Protease/phosphatase Inhibited	Final concentration in lysis buffer	Stock (store at -20°C)
Aprotinin	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin	2 µg/ml	Dilute in water, 10 mg/ml. Do not re-use thawed aliquots
Leupeptin	Lysosomal	5-10 µg/ml	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.
Pepstatin A	Aspartic proteases	1 µg/ml	Dilute in methanol, 1mM.
PMSF	Serine, Cysteine proteases	1 mM	Dilute in ethanol. You can re-use the same aliquot.
EDTA	Metalloproteases that require Mg ⁺⁺ and Mn ⁺⁺	5 mM	Dilute in dH ₂ O, 0.5M. Adjust pH to 8.0.
EGTA	Metalloproteases that require Ca ⁺⁺	1 mM	Dilute in dH ₂ O, 0.5M. Adjust pH to 8.0.
Na Fluoride	Serine/Threonine phosphatases	5-10 mM	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.
Na Orthovanadate	Tyrosine phosphatases	1 mM	Dilute in water. Do not re-use once defrosted.

Αντισώματα:

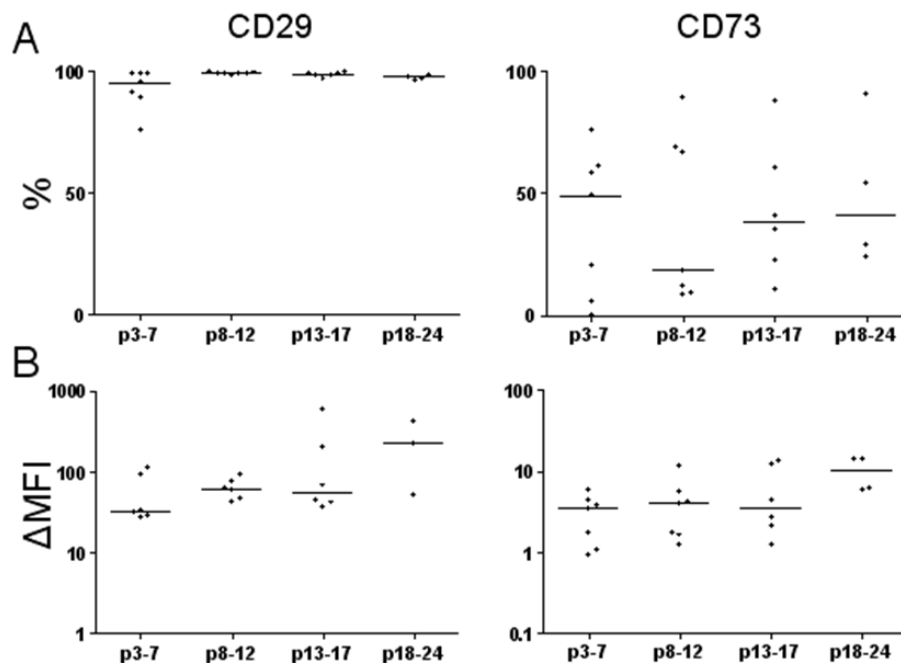
1. β-Tubulin (sc-5274)

2. IMP-1 (sc-166344)

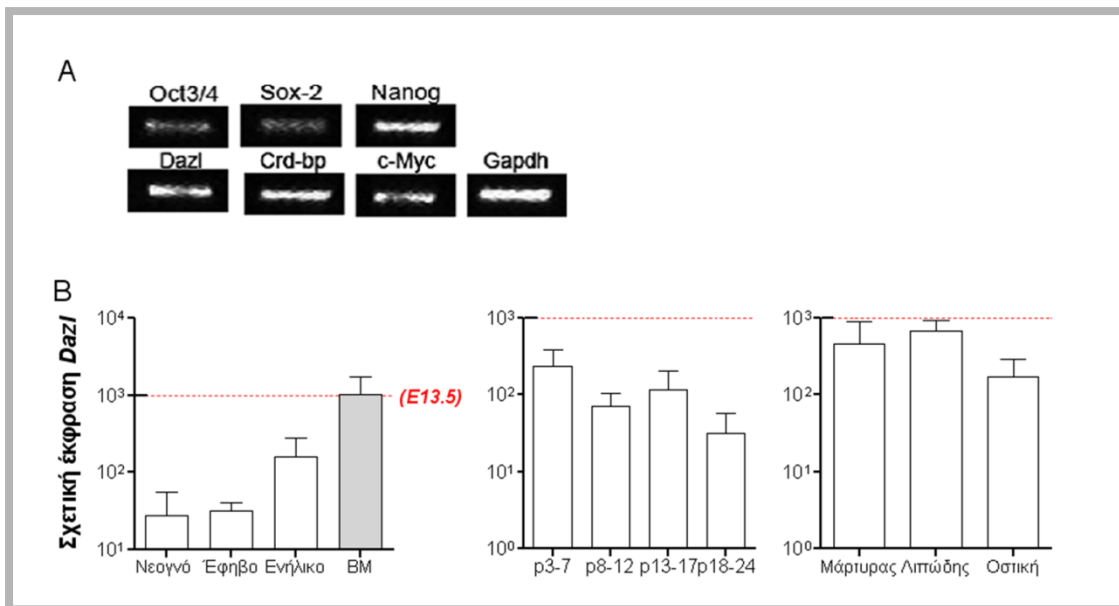
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ



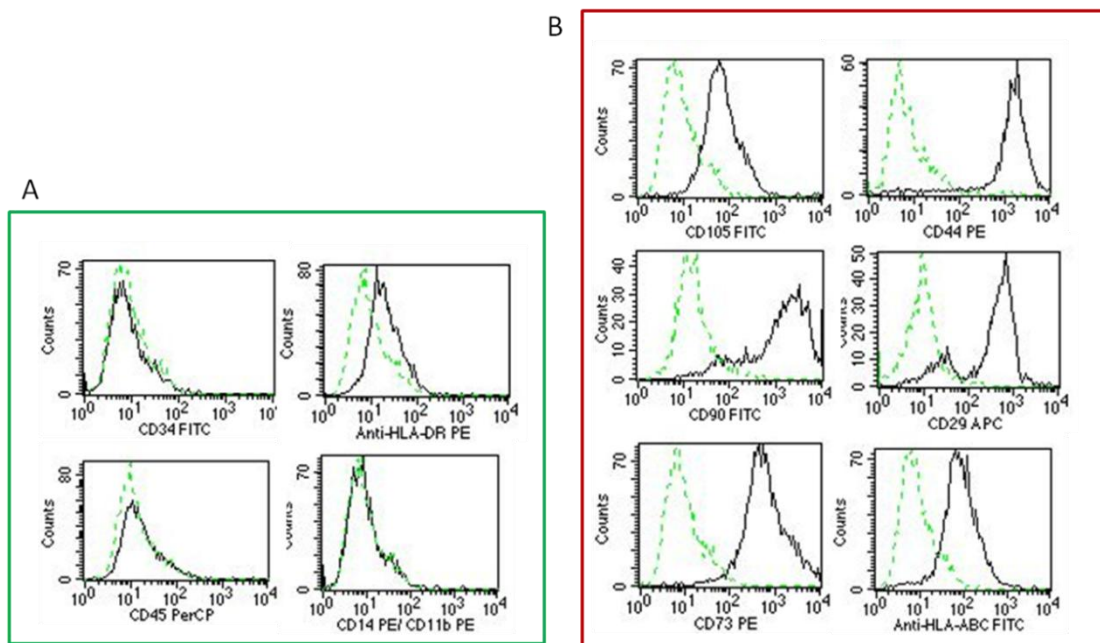
Συμπληρωματικό Σχήμα 1. Φαινότυπος των BM-MSC για τα CD29, CD44 και Sca-1 σε σχέση με την ηλικία.



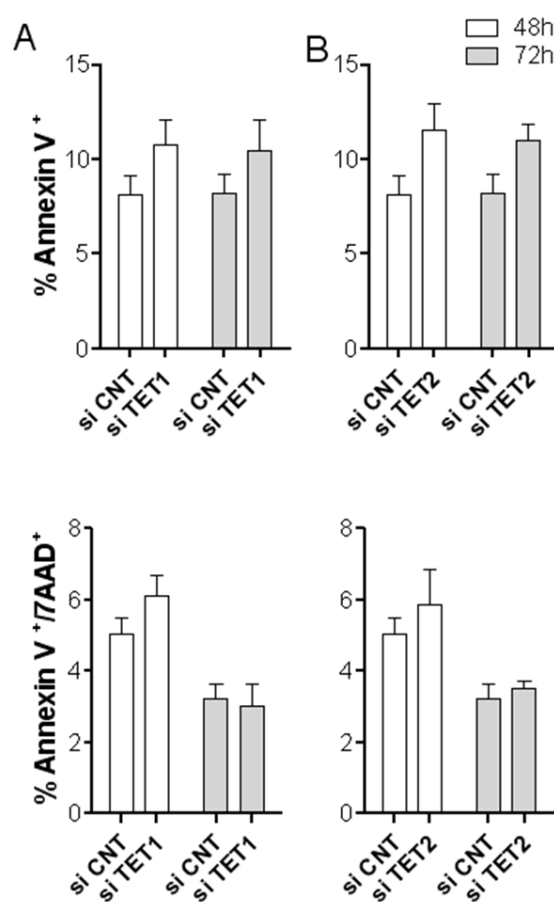
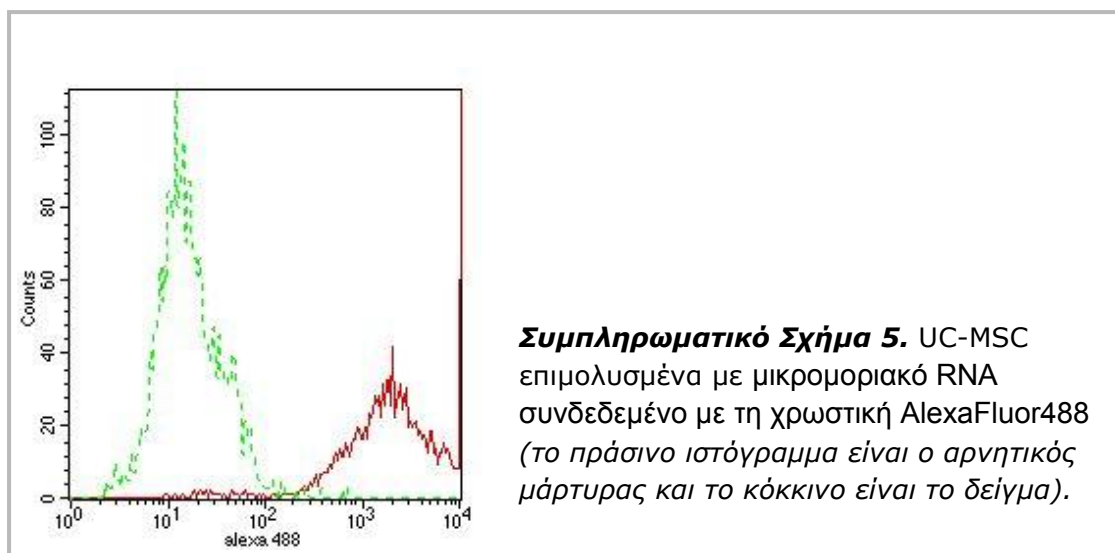
Συμπληρωματικό Σχήμα 2. Φαινότυπος των BM-MSC για τα CD29 και CD73 σε σχέση με την διάρκεια της in vitro καλλιέργειας.



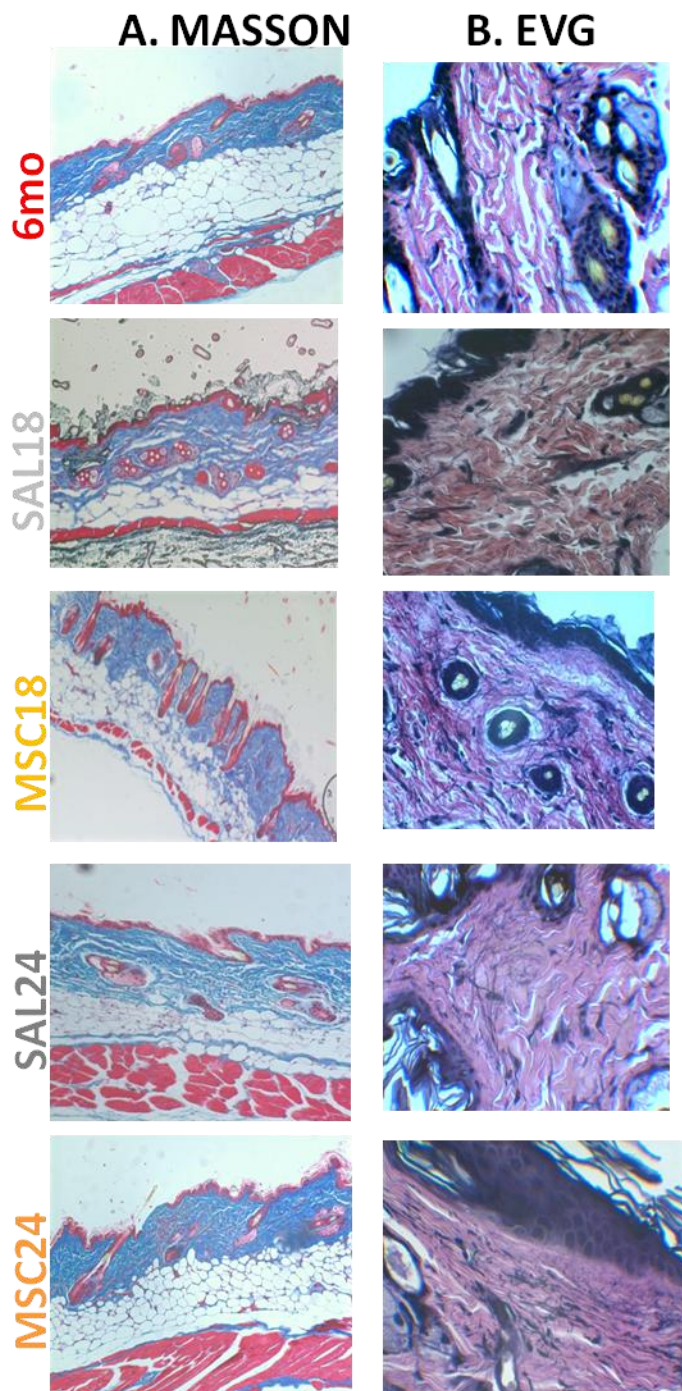
Συμπληρωματικό Σχήμα 3. (Α) Προϊόντα των γονιδίων που εξετάστηκαν στα *mBM-MS* **(Β)** Έκφραση του *Dazl* στα *mBM-MS* σε σχέση με την ηλικία του δότη, την διάρκεια της καλλιέργειας και της διαφοροποίησης.



Συμπληρωματικό Σχήμα 4. Αντιπροσωπευτικός φαινότυπος ενός δείγματος ανθρώπινων UC-MS. **(Α)** Αρνητικοί δείκτες και **(Β)** θετικοί δείκτες (το πράσινο ιστόγραμμα είναι ο αρνητικός μάρτυρας και το μαύρο είναι το δείγμα).

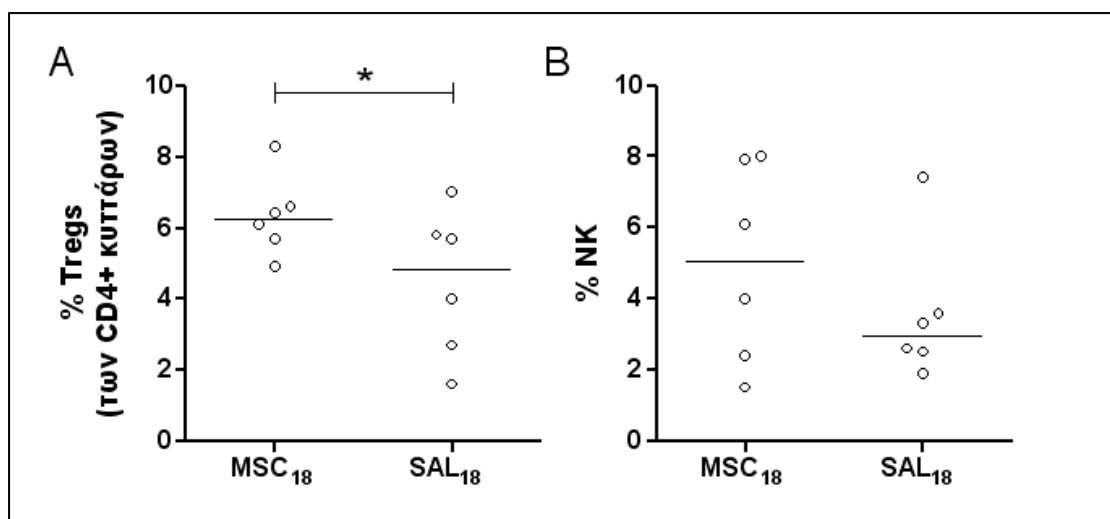


Συμπληρωματικό Σχήμα 6. Ποσοστά AnnexinV/7AAD θετικών κυττάρων μετά από την επιλεκτική παρεμπόδιση του TET1 **(A)** ή του TET2 **(B)**.



**Συμπληρωματικό
Σχήμα 7.**

Περιεκτικότητα σε
κολλαγόνο και
ελαστίνη στο χόριο
αντιπροσωπευτικών
ιστολογικών των
πειραματοζώων κάθε
ομάδας μετά από
χρώση Masson-
τριχρωμική (**A**) και
Verhoeff-van Gieson
(**B**) (Μεγέθυνση 40x).



Συμπληρωματικό Σχήμα 8. Ποσοστά **(A)** Tregs και **(B)** NK στο σπλήνα ποντικών που έλαβαν έγχυση MSC (MSC18) και των μαρτύρων (SAL18).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Effects of Donor Age, Gender, and In Vitro Cellular Aging on the Phenotypic, Functional, and Molecular Characteristics of Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

Olga Katsara,¹ Louisa G. Mahaira,¹ Eleni G. Iliopoulou,¹ Ardiana Moustaki,¹ Aristidis Antsaklis,² Dimitrios Loutradis,² Konstantinos Stefanidis,² Constantin N. Baxevanis,¹ Michael Papamichail,¹ and Sonia A. Perez¹

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a very important adult stem cell population with a multitude of potential applications in regenerative medicine. The thorough characterization of the bone marrow MSC (BM-MSC) population derived from the BALB/c species was essential, considering the significance of the murine model amongst animal models. In the present study, we examined the effect of gender, age, and in vitro culture on the basic properties (proliferation, differentiation, and immunosuppressive potential) of BM-MSCs. We found a decline in the progenitor frequencies from the BM of adult mice, lower MSC frequencies in all female donors, and an increase in the BM-MSC proliferation rate upon in vitro propagation. We also examined BM-MSCs for the expression of the 3 major embryonic stem cell transcription factors, Oct3/4, Sox-2, and Nanog, as well as 2 mRNA binding proteins, coding region determinant binding protein/insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (*Crd-bp/Imp1*) and Deleted in azoospermia-like (*Dazl*), which are expressed in primitive stem cells, umbilical cord blood-hematopoietic stem cells and amniotic fluid stem cells, respectively. Further, it has been reported that these 2 genes are critical for embryonic development. In this study, therefore, we report, for the first time, the expression of *Crd-bp/Imp1* and *Dazl* in BM-MSCs. *Dazl*, *Oct3/4*, and *Sox2* were detected in relatively low levels in contrast to *Crd-bp/Imp1*, its major target *c-Myc*, as well as *Nanog*, which were expressed redundantly, irrespective of sex, donor age, or in vitro passaging. These findings could further support the extrinsic theory of aging of the MSC population and the potential implication of embryonic genes in adult stem cell physiology.

Introduction

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) are the second most investigated adult stem cell (ASC) population, after hematopoietic stem cells (HSCs). ASCs are involved in the continuous maintenance and repair of most tissue types. MSCs have been successfully isolated from different species including humans (hMSCs) and mice (mMSCs) [1,2]. The major source of MSCs is the bone marrow (BM), but, in the last decade, MSCs have been isolated from many different sources (adipose tissue, umbilical cord blood, umbilical cord, etc.) [3]. MSCs have the capacity to give rise to osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes as well as to neuronal progenitors and cardiomyocytes; they are also potent immunosuppressors [2,4–6]. All the above make them a valuable cellular source for clinical applications in regenerative medicine, and they are already in use in clinical trials [7].

MSCs are self-renewing entities while generating multipotential progeny. Hence, this class of cells is of paramount importance for an organism during infancy and adolescence as well as for cellular homeostasis during adulthood [8]. However, controversy exists on whether these cells are either subject to, or causes of aging. Studies regarding hMSCs suggest that their frequency in the BM either declines with age progression or remains constant. Reports also state that there is an age-related deterioration of MSC physiology [9–11]. A few sporadic, similar studies exist for mMSCs, and thus, a more thorough investigation of their properties is needed [12–14].

So far, a single universal stem/progenitor marker to define MSCs does not exist; hence, a combination of characteristics, phenotypic and functional, is used to describe them [15]. In an effort to more precisely portray MSCs, the expression of various embryonic markers has been investigated. Recently,

¹Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece.

²First Department of Obstetrics and Gynecology, University of Athens, Athens, Greece.

hMSCs were found to express embryonic stem cell (ESC) markers such as OCT3/4, NANOG, SOX-2, alkaline phosphatase, and stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA-4) [16]. In the mouse BM, ESC markers were found to be expressed only by more primitive mMSCs such as multipotent adult progenitor cells, very small embryonic-like cells, and non-hematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ cells [15,17–19]. At present, the role of ESC markers in ASCs has not been clarified, and sometimes, controversial results are reported, for example, for Oct3/4. Lengner et al. recently rendered *Oct3/4* dispensable for both self-renewal and maintenance of somatic stem cells in the ASC compartments of several tissues, including the intestinal epithelium, BM (hematopoietic and mesenchymal lineages), hair follicle, brain, and liver [20]. Undoubtedly, additional studies must be conducted to further confirm the role of ESC markers in ASC.

A protein expressed during mouse embryogenesis [21], in ESC and other stem cell types such as amniotic fluid stem cells, as previously described by Stefanidis et al., is Deleted azoospermia-like gene (*Dazl*) [21,22]. The exact role of *Dazl* has not been completely deciphered, but it is an important transcriptional regulator in germ cell development and could possibly play a role in pluripotency [23,24].

Our group has previously detected the expression of an embryonic protein, the insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (CRD-BP/IMP-1), in umbilical cord blood (UCB) HSCs, but not in BM or mobilized blood CD34⁺ HSCs [25]. In the embryo, *Crd-bp/Imp1* plays an important role—as exhibited by high perinatal mortality of knockout mice—particularly in intestinal morphogenesis via regulation of extracellular matrix formation [26]. Moreover, CRD-BP/IMP-1 expression in primitive HSCs suggests a normal role in the biology of stem cells with high renewal capacity. The major identified targets of *Crd-bp/Imp1* are *c-Myc*, *Igf1l*, *h19*, and *tau* mRNA, all known to be implicated in developmental processes [27].

Mice are very often used as model organisms in preclinical studies to test putative human therapeutic treatments. In this context, molecular and cellular changes, which alter MSC properties with age, are of particular interest in translational research, especially when elderly patients are the target group for such cell-based therapies. Therefore, in this study, we sought to evaluate the effects of both in vivo age and in vitro cellular aging on mMSCs initially with regard to their major phenotypic and functional properties and, second, on the expression of genes with an embryonic pattern of expression (*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *Dazl*, and *Crd-bp/Imp1*). Although these genes have been detected in more primitive stem cell types, their expression in mMSCs would be of great interest as it could unravel new aspects of MSC biology.

Materials and Methods

Cell isolation

mMSC cultures were established from the BM of male and female BALB/c mice of different ages, according to a modified protocol of Peister et al. [28]. In this study, 1 mouse represents 1 MSC culture; at least 3 cultures were established for each experimental group. In total, 20 MSC cultures were used in the analysis of these results. In brief, mice were sacrificed and the BM of each tibia and femur was flushed

using RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Biosera), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen), and 0.08 mg/mL gentamicin sulfate (Schering-Plough). Cells were plated at a concentration of 10⁵ per cm² in RPMI with 20% fetal bovine serum (FBS) and nonattached cells were removed 24 h later. From passage 1 to 7, α-MEM (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Biosera), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen), and 0.08 mg/mL gentamicin sulfate (Schering-Plough) was used. From passage 8 onward, FBS content was reduced to 10%. All cultures after passage 1 were seeded at 10³ cells/cm².

hMSCs, isolated from the BM of healthy individuals, were cultured and characterized as previously described [29]. Passages 3–5 of hMSCs were used in gene expression studies.

Cell proliferation assays

Colony forming units-fibroblast assay. This assay was utilized at 2 different stages of mMSC culture: first, in freshly isolated BM mononuclear cells (BMMNCs), to determine MSC frequency. At this point, 10⁵ BMMNCs/cm² were seeded onto a 6-well plate (surface area: 10 cm²/well) and cultures were maintained as described earlier. Second, to confirm the self-renewing capacity of mMSCs during culture, 10 cells of mMSCs per cm² were seeded at different passages onto 6-well plates in complete medium. At day 14, in both experimental settings, the medium was removed; the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with 0.5% Crystal Violet (Merck & Co.) in methanol. Colonies larger than 50 cells were counted under a stereoscopic microscope. All experiments were performed in triplicates.

Calculation of cumulative growth index. The growth index (GI) was calculated using the following equation: $GI = N_t/N_0$, where N_0 is the inoculum cell number and N_t is the cell harvest number. The cumulative GI (cGI) was calculated using the following equation: $cGI = GI_n \times GI_{(n-1)}$, where n is the passage number.

Calculation of doubling time. The population doubling time (T_D) was calculated using the following equation: $T_D = \ln 2 \times \Delta t / (\ln N_t - \ln N_0)$, where Δt is the time for which the culture was allowed to grow [30].

Population doubling. The population doubling (PD) was calculated according to Cristofalo et al. by the following equation: $PD = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$ [31].

Surface staining

Upon trypsinization, MSCs were washed in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (PBS, 2% FCS, 0.1% NaN₃) and stained as previously described [29] for 15 min at room temperature. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde (PFA). Flow cytometric analysis was performed on an FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences) using CellQuest software. The anti-mouse antibodies used were CD29-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD73-PE (phycoerythrin), Sca-1 PE, H-2D^d-PE, I-A/I-E-PE, CD45-PerCP (peridinin chlorophyll- α protein), CD11b-APC (allophycocyanin), and CD44-APC (all from BD Biosciences) and CD105-PE (R&D Systems).

In vitro differentiation

In vitro adipogenesis assays were conducted according to Meirelles Lda and Nardi [32] and osteogenesis according to Peister et al. [28,32]. In brief, mMSCs were plated to confluence in 10% a-MEM and the following day the medium was replaced with an equal volume of differentiation or control medium. Cells underwent differentiation for 2 weeks. Media were replaced twice a week. To confirm their differentiation status, cells were stained with Oil Red O and Alizarin Red S, respectively, and 5 random areas were selected for observation under an inverted microscope. Quantification of differentiation specific genes was also performed as described later on.

Oil Red O staining. Oil Red O staining was used to evaluate lipid vacuole accumulation during adipogenic differentiation. Briefly, cells were fixed for 1 h with 10% natural formalin buffer, washed with 60% isopropanol, allowed to dry completely, and stained for 10 min with 0.18% Oil Red O solution in isopropanol. Lipid vacuoles were stained red.

Alizarin Red S staining. Alizarin Red S staining was used to evaluate Ca^{2+} deposition during osteogenic differentiation. Briefly, cells were washed twice with PBS, fixed with 10% natural formalin buffer, washed with ddH_2O , and stained for 15 min with 2% Alizarin Red S (pH 4.1). Ca^{+2} -rich extracellular matrix was stained red. All chemicals used in both staining were purchased from Sigma-Aldrich Co.

Immunosuppression

mMSCs were irradiated (30 Gy) and plated out in serial dilutions onto a flat-bottom 96-well plate (Corning). Splenocytes from BALB/c mice were isolated by mechanical dissociation through a 70- μm nylon cell strainer (BD Biosciences). Red blood cells (RBCs) were lysed by incubation for 5 min on ice with NH_4Cl (0.15 M). Upon adherence of the irradiated mMSCs, 10^5 splenocytes and anti-mouse CD3 ϵ antibody (BD Biosciences; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to each well. After 48 h of incubation, cells were pulsed with [methyl- ^3H]thymidine (Amersham; specific activity: 53.0 Ci/mmol, 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) for

an additional 18 h, harvested, and counted on a liquid scintillation counter (Wallace Trilux, no. 1450 Microbeta; PerkinElmer Life Sciences).

RNA isolation and quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis

Total RNA was extracted from mouse and hMSCs using either the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) or Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. rDNase treatment was performed to remove any residual genomic DNA. Total RNA (1.5 μg) was reverse transcribed using ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) and random hexamer oligonucleotides (Invitrogen). Quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed on a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). PCR conditions were 95°C for 10 min, with 35 cycles of 95°C for 20 s, 58–63°C for 20 s, depending on primer pair, and 72°C for 30 s. cDNA solution (150 ng), Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG reaction buffer (Invitrogen), and 100 nM of primers were used in a 25 μL reaction mixture of PCR. Primer pairs used are shown in Table 1.

All mMSC gene expression levels tested in this study were normalized to Theiler Stage 13 (E8.5). Theiler Stage 13 is one of the most primitive stages of the developing embryo that we could isolate. All genes tested are expressed at this stage as reported by Davis et al. [33] and in the Mouse Development handbook [34]. In particular, regarding *Dazl*, similar levels of expression were found in both mice spermatozoa and E8.5 tissues (data not shown). Human *CRD-BP/IMP-1* levels were normalized to K562, a leukemic cell line overexpressing *CRD-BP/IMP-1*, and human *DAZL* was normalized to human sperm tissue; human and mouse *GAPDH* mRNA levels were used, respectively, for internal normalization. The $\Delta\Delta C_t$ method was used for data analysis of gene expression levels.

Regarding lipoprotein lipase (*Lpl*) and osteocalcin, also known as bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (*Bglap*), adipogenic and osteogenic differentiation specific genes, respectively, samples were tested at the time of

TABLE 1. SEQUENCES OF PRIMERS AND PREDICTED PRODUCT SIZES FOR REVERSE TRANSCRIPTASE–POLYMERASE CHAIN REACTION ANALYSIS

Gene symbol	Forward	Reverse	Annealing T (°C)	Product size (bp)
Mouse genes				
<i>Gapdh</i>	GTGTTCTACCCCCAATGTG	GTCATTGAGAGCAATGCCAG	60	214
<i>Oct3/4</i>	CCAATCAGCTTGGGCTAGAG	CCTGGGAAAGGTGTCCCTGTA	60	130
<i>Sox2</i>	GCTGGGAGAAAGAAGAGGAG	ATCTGGCGGAGAATAGTTGG	60	180
<i>Nanog</i>	GAGTGTGGGTCTTCCTGGTC	GAGGCAGGTCTTCAGAGGAA	60	180
<i>Crdbp</i>	GGCTGCTCCCTATAGCTCCT	CTGGTGGTGCAATCTTGATG	60	160
<i>c-Myc</i>	AGCGACTCTGAAGAAGAGCAA	GTTGTGCTGGTGAGTGGAGA	61	176
<i>Igf2</i>	CTGGACATTAGCTTCTCCTG	CAAACTGAAGCGTGTCACAA	58	224
<i>h19</i>	AGAGCTGGAGGAGAGTCGTG	TCCTCTCCAACCCTAGCTCA	63	160
<i>Dazl</i>	CCTCCAACCATGATGAATCC	CATAACTCCTCTGCTCTCCA	60	150
<i>Lpl</i>	GACACAGCTGAGGACACTTG	GACACTGGATAATGTTGCTGG	62	230
<i>Bglap</i>	ACCCTGGCTGCGCTCTGTCTCT	GGTTAAGCTCACACTGCTCC	62	184
Human genes				
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTC	60	224
<i>CRD-BP</i>	GACCCAGTCCAAGATAGACG	GTGTCCTTAGCCTCTTTATGC	60	140
<i>DAZL</i>	GGAGCTATGTTGTACCTCC	CCATGTAAGTACATAAGCCAG	58	312

initiation (D0) of the differentiation assay and on the termination day (D14). Gene expression levels of D14 were normalized versus D0. Expression at D0 was arbitrarily defined as 100. Adipose and bone tissue were utilized as positive controls in this assay.

Statistics

The Student's *t*-test with a 95% confidence interval was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software (www.graphpad.com). The level of significance was set at 0.05. Paired analyses were performed for passage progression and differentiation.

Results

Proliferative and self-renewal potential

In the present study, the BALB/c strain was used for the isolation and expansion of mMSCs. BALB/c is a well-known inbred mouse strain and among the most widely used in animal experimentation [35]. Initially, we determined the clonal capacity, growth potential, and proliferation rate of mMSCs. All parameters tested in this report were analyzed according to donor age, sex, and passage. Hence, BM samples were divided, as reported recently [36], into 3 categories according to their developmental stage in the postnatal organism: in infants (<4-week-old mice), adolescent (5–12-week-old mice), and adult (13–34-week-old mice). Moreover, cultured cells were categorized, arbitrarily, into 4 different groups according to the number of passages: (a) 3–7, (b) 8–12, (c) 13–17, and (d) 18–24. It should be noted here that mMSC properties were not studied in later passages because of a recent publication that deemed MSCs to be tumorigenic, upon spontaneous malignant transformation with long in vitro culture [37]. Further, we tested whether the gender of the mice affects the properties of MSCs as more studies either use female mice or do not take sex into account [2,28].

Initially, the MSC frequency in the BM was determined by the colony forming units-fibroblast assay. A decrease in the frequency of progenitors was observed as we moved from the infant to the adult group. The number of colonies obtained from 10^6 BMMNCs plated and expanded for 14 days was 61.83 ± 21.77 (1 per 16,173 nucleated cells) in infant donors and 17.7 ± 8.8 (1 per 56,947 nucleated cells) in adult donors. Therefore, the calculated frequency of MSCs in the BM of the adult organism was found to be reduced by approximately 3.5 times compared with that in early postnatal development. As demonstrated in Fig. 1A, this decrease was extremely significant in all groups. More importantly, MSC frequency was sex dependent, with female BM consisting of an extremely significant lower number of progenitor cells in all age groups (Fig. 1B).

Upon selection and in vitro expansion, all preparations, independent of the age and sex of the donor, showed a similar proliferation capacity as demonstrated by the calculated cumulative GI (Fig. 1C). Further, mMSCs seemed to be able to proliferate “indefinitely”—for more than 70 PDs—showing a tendency for increased proliferation rate with passage as determined by population T_D (Fig. 1D). The increase in proliferation rates was further confirmed with the colony forming units-fibroblast assay. In vitro propagation resulted in an increased number of colonies (Fig. 1E).

Phenotypic characterization

In vitro expansion of mMSCs caused a notable reduction of cell size values and complexity (granularity) as depicted by the cell distribution of the same BM preparation at passages 3 and 19 according to forward and side scatter values (Fig. 2A, B). mMSCs of different preparations were analyzed by FACS and their forward and side scatter values were plotted against passage. Statistically significant differences were observed in both parameters (Fig. 2C, D). It is important to note that statistical significance could not be reached at passages 18–24 because of the small sample number analyzed ($n = 4$). On the other hand, the size and complexity of the cells did not differ significantly with donor age (data not shown).

As a single antigen to directly define mMSCs does not exist, a panel of surface antigens is commonly used to characterize this population [38]. We adapted our analysis from previous studies by Anjos-Afonso et al. [15], who examined different types of cell surface antigens such as hematopoietic antigens, adhesion molecules, integrins, etc., and determined a more precise immunophenotype of mMSCs. In our experimental setup, selection of the mMSC population ($CD45^-$ and $CD11b^-$) was achieved by short trypsinization from passages 0 to 2 as recommended by Peister et al. [28]. We started our analysis of the mMSC phenotype at passage 3 onwards. A representative experiment of FACS analysis is depicted in Fig. 3A. MSCs were stained negative for CD45, CD11b (not shown), and MHC class II molecules. CD105 expression was at low/negative levels, whereas Sca-1, CD29, CD44, and MHC class I molecule expression was scored positive. CD73 expression ranged from 0% to 88%. In contrast to CD73 and Sca-1, CD29 and CD44 expression was independent of donor age and in vitro culture (Fig. 3B, C). A statistically significantly higher percentage of the mMSC population stained positive for CD73 during adolescence and adulthood in comparison to mMSCs isolated from infant mice; no changes in the fluorescence intensity of the positive fraction of mMSCs were observed. In contrast, Sca-1 levels demonstrated a decline in extreme passages. Its high expression ($91.77\% \pm 3.6\%$) detected up to passage 12 was significantly reduced ($52.93\% \pm 13.45\%$) at late (18–24) passages. The decrease in the percentage of expression was also accompanied by a decrease in its density on the cell surface as this was detected by a decrease in the fluorescence intensity of the positively staining population.

Functional characterization

There is currently little consensus, and in many cases, conflicting reports regarding the effect of donor age and passage progression on MSC function exist. A number of studies have previously shown no age-related differences in in vitro differentiation using hMSCs [39]. Similar results were obtained in our experimental setup, by optical evaluation of the number of differentiated cells. mMSCs independent of gender, age, or passage differentiate into both adipocytes and osteocytes (Fig. 4A), although differences in the percentage of differentiating cells were observed among all groups, ranging from 40% to 100%. As this technique would only reveal gross variations, we decided to examine the expression levels of 2 established differentiation markers, *Lpl* and *Bglap*, by qRT-PCR. *Lpl* is an enzyme that

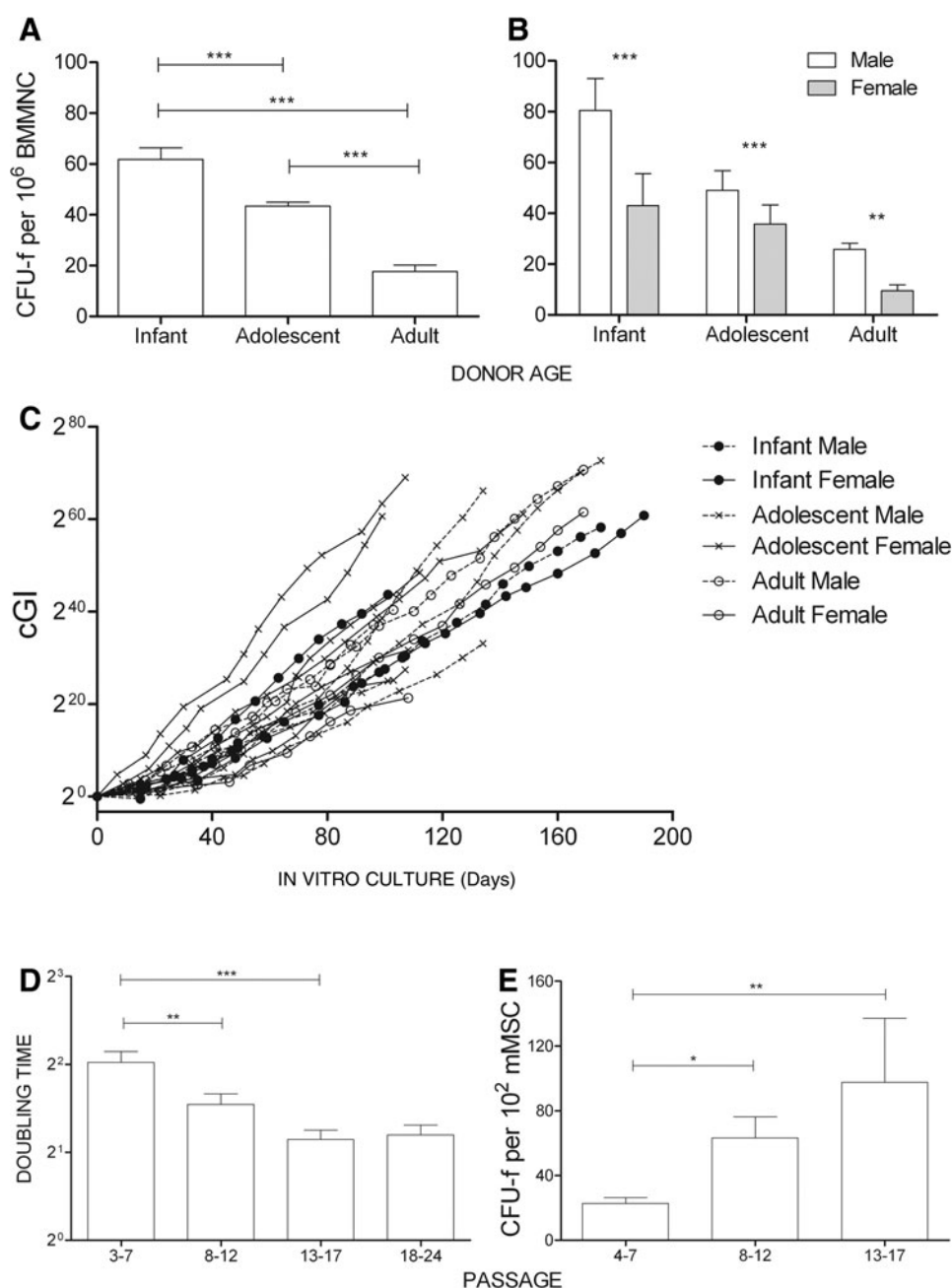
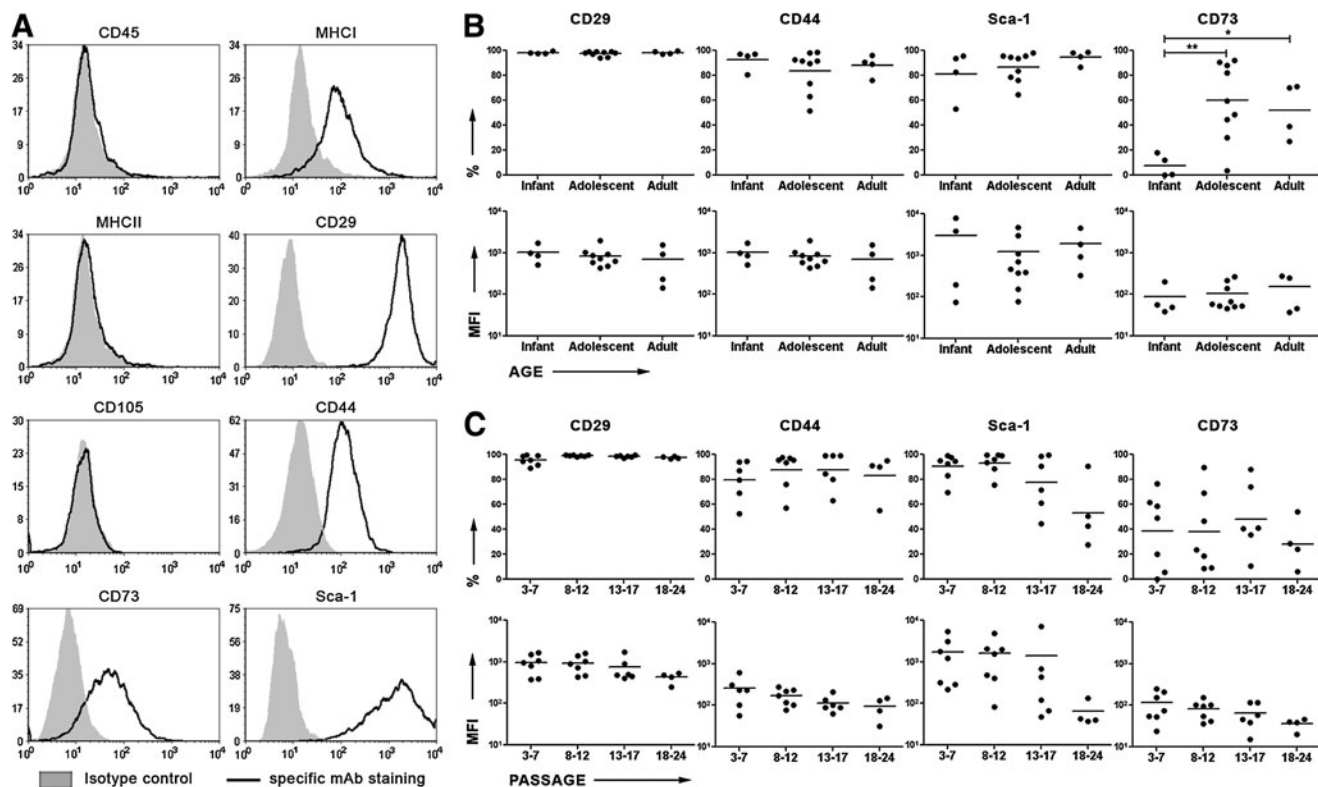
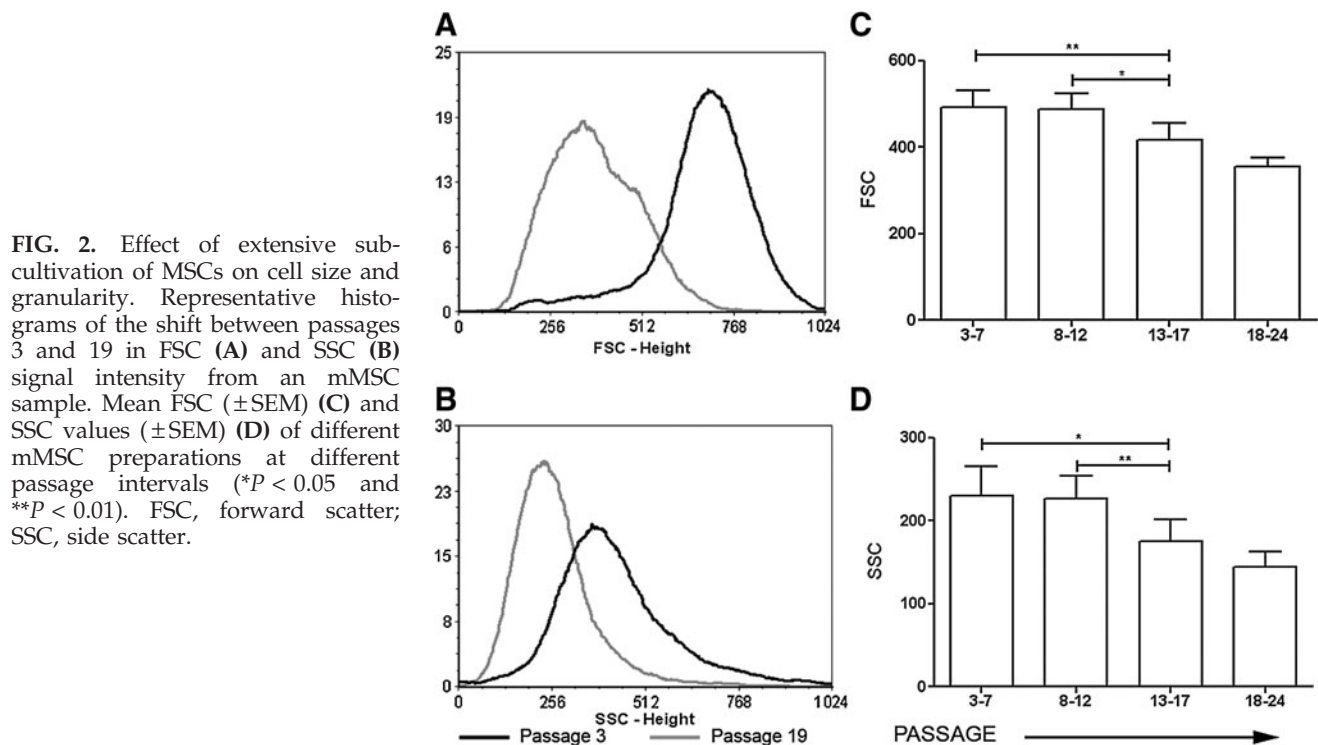


FIG. 1. Growth potential of BM-derived mMSCs. Differential mMSC frequency in the BM according to age (**A**) and gender (**B**). Values represent the mean number ($\pm$ SEM) of CFU-f per 10^6 BMMNCs. (**C**) cGI of BMMSCs isolated from infant ($\bullet$), adolescent ($\times$), and adult ($\circ$) male (dashed lines) or female (solid lines) cultured up to passage 24. Effect of in vitro culture on the self-renewal potential of different mMSC preparations as depicted by the mean doubling time ($\pm$ SEM) (**D**) and by the mean number ($\pm$ SEM) of CFU-f per 100 cells (**E**) observed at different passage intervals (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$). BM, bone marrow; mMSCs, mouse mesenchymal stem cells; CFU-f, colony forming unit-fibroblasts; BMMNCs, BM mononuclear cells; SEM, standard error of the mean; cGI, cumulative growth index.

hydrolyzes lipids in lipoproteins [40]. On the other hand, *Bglap* is a noncollagenous protein found in bone and dentin. It is secreted solely by osteoblasts and is implicated in bone mineralization and calcium ion homeostasis [41]. Thus, mMSCs isolated from male subjects express higher levels of both markers (Fig. 4Bi, 4Ci). In addition, the levels of expression of *Lpl* seem to be independent of donor age in contrast to *Bglap* levels, which show a tendency to decrease with age progression (Fig. 4Bii, 4Cii). Moreover, *Lpl* expression tends to decrease with in vitro culture progression in contrast to *Bglap* levels, which significantly increase upon in vitro expansion (Fig. 4Biii, 4Ciii).

MSC-mediated inhibition of T-cell proliferation was utilized throughout our experiments as a standard assay char-

acterizing a functionally intact MSC population. T cells were activated by CD3e crosslinking at coculture, set up at different MSC-to-spleen cell (SC) ratios, and it was found that mMSCs were immunosuppressive even at a very low cellular MSC-to-SC ratio (1:80) (Fig. 4D). Because all samples exhibited $\geq 95\%$ suppression at high MSC-to-SC ratios (1:5 and 1:10), we chose to use suboptimal conditions (1:20 MSC-to-SC ratio) to unravel any possible differences among the various tested parameters. Percentage of suppression of mMSCs at 1:20 MSC-to-SC ratios ranged from 60% to 100%. Slight variations were detected, but with no statistical significance between male and female donors (Fig. 4E), among the different age groups examined (Fig. 4F), as well as in relation to passage progression (Fig. 4G).



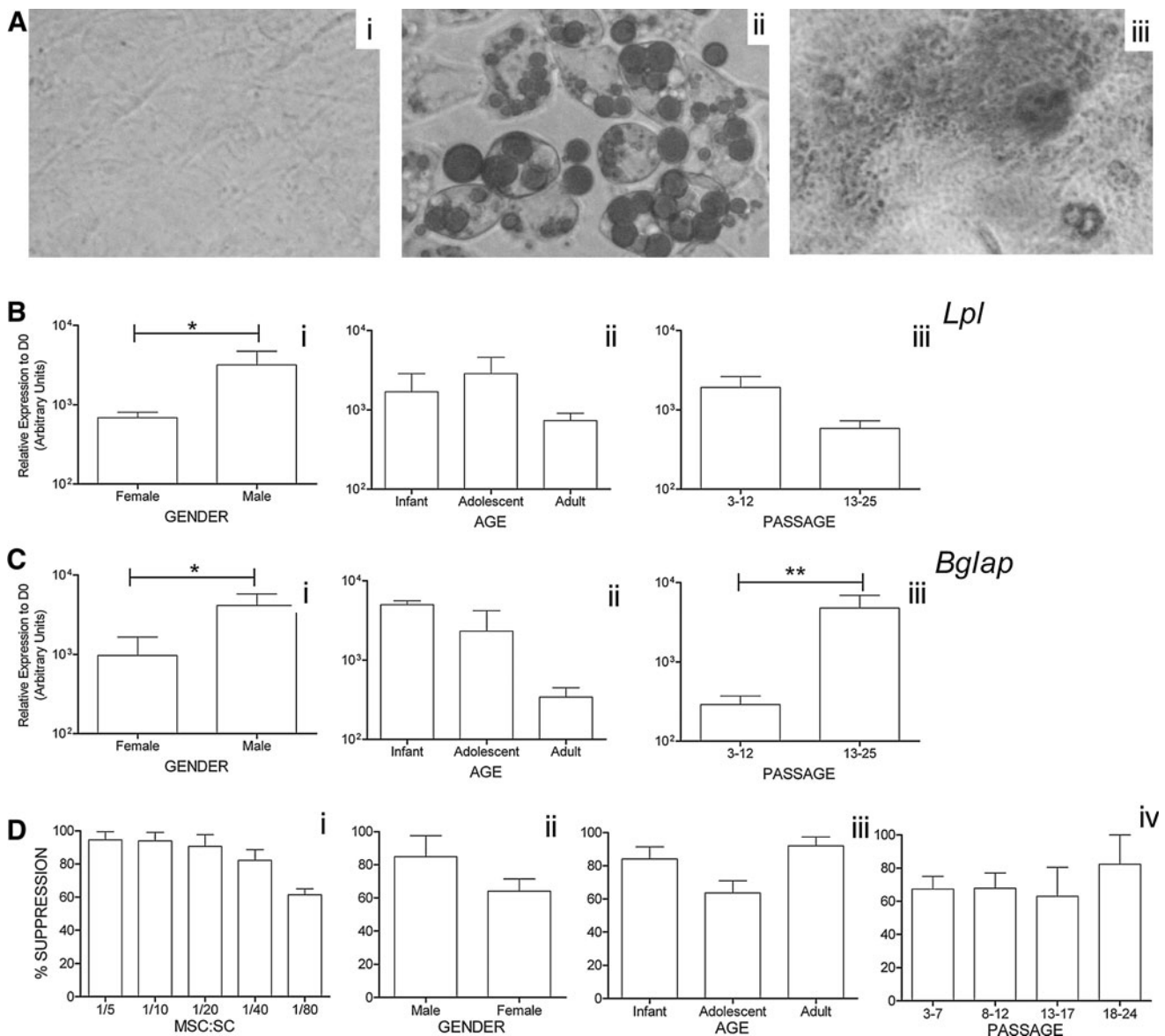


FIG. 4. Functional properties of in vitro cultured mMSCs. **(A)** Macroscopic observation of their differentiation potential. (i) Cells cultured under normal conditions. Differentiative ability of mMSCs toward adipogenic (ii) and osteogenic (iii) lineages as demonstrated by accumulation of lipid-rich vesicles, which stain with Oil Red O, and calcium deposits, which interact with Alizarin Red, respectively. Magnification: $\times 40$. Quantitative analysis of expression levels of the differentiation markers **(B)** *Lpl* and **(C)** *Bglap*, according to gender (i), donor age (ii), and passage (iii). **(D)** MSCs' immunosuppressive capacity. Suppression of the proliferation of anti-CD3-primed mouse splenocytes at different MSC/SC ratios (i). Effect of gender (ii), donor age (iii), and passage (iv) on the immunosuppressive ability of in vitro cultured MSCs at 1:20 MSC-to-SC ratio. *Lpl*, lipoprotein lipase; *Bglap*, osteocalcin; SC, spleen cell. (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

Molecular characterization

hMSCs have been found to express several embryonic markers [16]. They share a multitude of characteristics with their mouse counterparts but also retain important species-specific differences [9,42]. Further, model organisms such as mice are frequently used to decipher various biological phenomena. In this context, we proceeded to determine whether mMSCs have a similar molecular profile to hMSCs. Three important ESC markers (*Oct3/4*, *Sox2*, and *Nanog*) were examined, as well as 2 other developmentally important genes

(*DazL* and *Crd-bp/Imp-1*), not previously investigated in these populations.

Initially, various randomly selected samples from different passages of mMSCs were tested for the expression of *Oct3/4*, *Sox2*, and *Nanog* (Fig. 5A). All samples were found positive for *Nanog*, whereas *Oct3/4* and *Sox2* mRNAs were infrequent. Additionally, the levels of expression of these 3 genes were determined by qRT-PCR, in relation to donor age, passage progression, and lineage commitment.

Nanog was expressed redundantly in all samples tested, with levels of expression almost uniformly higher to those in

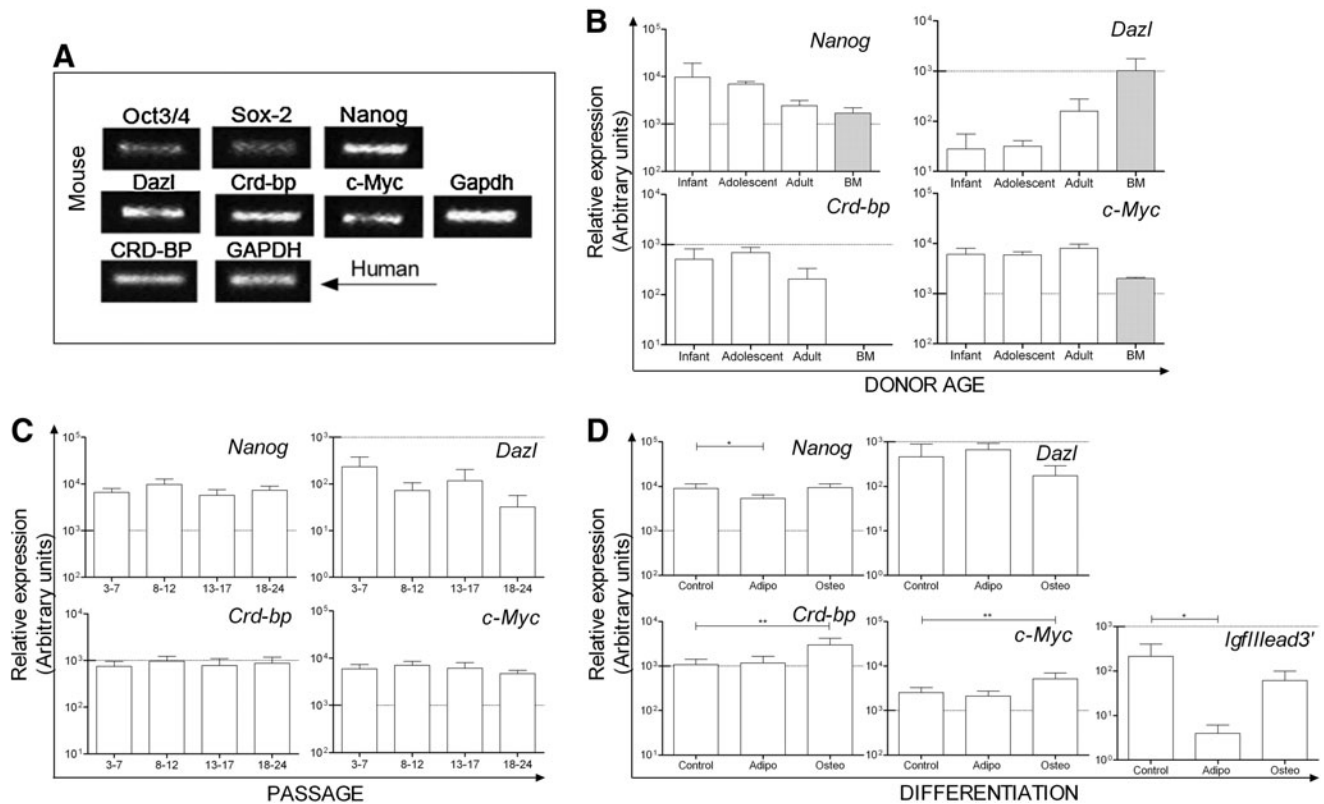


FIG. 5. Gene expression profile. **(A)** Agarose gel electrophoresis of embryonic markers expressed on representative mouse and human MSC samples. Human MSCs were tested only for the newly described genes, CRD-BP and DAZL. Mean values ($\pm$ SEM) of *Nanog*, *Dazl*, *Crd-bp*, *c-Myc*, and *Igf2leader3'* gene expression for mMSCs were determined **(B)** during different developmental stages in the postnatal organism, **(C)** according to passage, or **(D)** upon differentiation. Quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis via the $\Delta\Delta C_t$ method was used to determine the levels of expression. All samples were normalized to E8.5 (horizontal dotted line). The housekeeping gene *Gapdh* was used for internal normalization. Filled bar represents mRNA expression in total BM cells (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

the developing embryo E8.5 as well as to those in the total BM cell population. It should be noted that *Nanog* levels seemed to gradually decline in relation to donor age, reaching statistical significance between the adolescent and adult population. Statistical significant differences between the infant and adult groups could not be detected, possibly because of the low sample number in the infant group ($n = 4$) (Fig. 5B). However, “in vitro cellular aging” (passage progression) did not affect *Nanog* expression levels. Additionally, a statistically significant decrease was observed during adipogenesis but not during osteogenesis (Fig. 5D). We could barely detect any *Oct3/4* and *Sox2* mRNA expression in the majority of the tested samples. Donor age, passage progression, and lineage commitment did not affect their levels of expression (data not shown).

In the course of our studies, we also investigated the expression of 2 developmentally important genes in mMSCs: *Dazl* and *Crd-bp/Imp-1* (Fig. 5A). As it was the first time that these genes were investigated in the MSC population, we also examined their expression in hMSCs. *Dazl* was detected in mMSCs, although in relatively low levels and always lower than that in the total BM cells tested. As shown in Fig. 5B–D, no significant alterations in gene expression were observed with donor age, with passage progression, or

during MSC differentiation. In contrast, overall *Crd-bp/Imp-1* levels of expression in mMSCs were rather high and almost always similar to the embryo E8.5 levels (Fig. 5B–D). It is worth noting that *Crd-bp/Imp-1* levels tend to decrease in adult-derived mMSCs, whereas total BM cells were found to be negative. In addition, the levels of *Crd-bp/Imp-1* remained high throughout in vitro expansion. There was a statistically significant increase in the expression levels between early passages (3–7) and passages 18–24 (Fig. 5C). Moreover, *Crd-bp/Imp-1* levels increased significantly when mMSCs were triggered to differentiate toward the osteogenic lineage but remained unaffected during adipogenesis (Fig. 5D).

The high expression levels of *Crd-bp/Imp-1* prompted us to investigate 3 of its major targets—*c-Myc*, insulin-like growth factor 2 transcript 3 (*Igf1l-leader3'*), and *h19*. *c-Myc* exhibited a constant, high expression level among all ages and in vitro passage. The *c-Myc* levels were similar or higher than those detected in the E8.5 and total BM. In addition, *c-Myc* followed a pattern similar to *Crd-bp/Imp-1* upon osteogenic differentiation, with statistically significantly increased levels of expression (Fig. 5D). In contrast, *Igf1l-leader3'* and *h19* levels were very low or even undetectable, similar to those in total BM cells. No alterations in the expression of these genes

were detected, with the exception of *Igf1l-leader3'* levels, which were further significantly reduced during adipogenic commitment (Fig. 5D). As far as hMSCs are concerned, *DAZL* could not be detected in any sample isolated from the BM, in contrast to *CRD-BP/IMP-1*, which was expressed in relatively high levels, similar to those of its mouse counterpart (Fig. 5A).

Discussion

The characterization of the MSC population has been the focus of numerous studies in the past decades. In this report, we thoroughly investigated the properties of mMSCs in relation to donor age and in vitro expansion as well as the expression pattern of well-established embryonic markers.

In our experimental setup, mMSCs were isolated from both genders of BALB/c mice during different developmental stages of postnatal life. Our finding that female BM, from infancy to adulthood, contained significantly lower MSC numbers—in comparison to the corresponding male—is in accordance with that by Strube et al., who conducted their experiments on Sprague–Dawley rats and observed a sex-specific compromised bone healing in female rats due to a decrease in MSC quantity [43]. These observations could possibly propose a reason why women are more prone to osteoporosis, as one of the mechanisms involved in its development is the inadequate formation of new bone during remodeling.

Further, the intrinsic growth potential of explanted MSCs diminished with age progression. However, MSCs showed similar proliferation capacities in vitro, independent of age or sex, and—upon overcoming the resting state and, subsequently, the low turnover exhibited within the BM—retained their proliferative capacity for up to 5 months in culture, that is, for more than 70 PDs. Similar observations have been previously reported in various studies [32,44,45]. In these studies, extended in vitro expansion of mBM-MSCs for up to 1 year has been documented. This could not be attributed to strain specificity or methodology variations, because both BALB/c- and C57BL/6-derived BM-MSCs behaved similarly as the isolation–expansion methodologies used do not significantly differ from the ones presented herein. This proliferative capacity exhibited in vitro does not necessarily represent the in vivo potential of MSCs but confirms that the cells possess the ability to proliferate indefinitely if the necessary signals are provided. Therefore, these findings could possibly support the extrinsic theory of aging—which states that cells are driven into proliferative silence by changes within the surrounding tissue [9].

In addition, we observed that mMSCs decrease their T_D with in vitro culture and diminish in cell size as well as in granularity. In contrast, hMSCs cease to proliferate within 20–50 PDs, and cells enlarge and become more granular. Ultimately, they stop cell division [46]. This significant difference between human and mouse BM-MSC could be attributed to either technical reasons (ie, in vitro conditions may affect them differently) or diversity between species, including lifespan, tissue renewal requirements due to environmental differences, etc.

Regarding the mMSC phenotype, neither donor age nor in vitro culture affect CD29 and CD44 expression, whereas CD73

expression is significantly increased in correlation to donor age. We report that mMSCs isolated from adolescent and adult mice express at least 5 times more CD73 than infant-isolated MSCs. The physiological role of CD73/ecto-5'-nucleotidase differs in various organisms and tissues and extends beyond its enzymatic activity. Resta et al. have stated that mature versus immature mouse T and B lymphocytes show a 10-fold greater activity of CD73, which is necessary for their adhesion and migratory capacity [47]. Nevertheless, its actual role in MSC populations needs to be further clarified. Further, Sca-1 cell surface expression declined with passage progression, although statistical significance was not reached. As mentioned earlier, passage progression correlated with decreased cell size and granularity. Our results are in accordance with Meirelles Lda and Nardi, who observed low Sca-1 expression in an MSC subpopulation with low cell size and complexity [32]. These observations support the notion that BM-MSCs are heterogeneous, including subpopulations of different proliferative capacities. It is conceivable that one of these subpopulations becomes predominant under long-term ex-vivo expansion conditions. It would be interesting to further study this possibility.

mMSCs exert a very strong suppressive activity in vitro even in very low numbers in contrast to hMSCs, which exert their in vitro immunosuppression at relatively high numbers. mMSCs' suppressive ability was tested throughout in vitro culture and in relation to sex and age and was not significantly affected by either of these parameters. Immunomodulation by MSCs is mostly exerted via soluble factors, including transforming growth factor- β , hepatocyte growth factor, and nitric oxide [48], which differentially affect each immune system compartment. Our study addressed only a part of the suppressive ability of MSCs—their effect on T cells—which remains unaltered by donor age and in vitro propagation. Although individual factors produced by MSCs may be affected during postnatal life and/or in vitro expansion, it is possible that the end effect (immunosuppression) remains unaltered, as MSC-mediated immune regulation is the result of the cumulative action displayed by several molecules [48].

As far as the differentiation ability of MSCs is concerned, multitudes of controversy exist about the effect of age and passage on their potential. Kretlow et al. [14] reported that the osteogenic and adipogenic differentiation potential of murine BM-MSCs decreased with donor age. Gou et al. have recently reported that long-term-cultured mBM-MSCs could differentiate into adipocytes only but not into osteocytes or chondrocytes [44]. In a review article, Sethe et al. [9] reported that the osteogenic potential of MSCs decreased with age in almost all the studies included, irrespective of species origin, which is in line with the data presented herein. Regarding the adipogenic properties of the cells, their potential was found either to remain unaltered or to increase with age [9]. The high heterogeneity of our data with respect to the adipogenic potential of mMSCs with age could not lead us to conclusive results, although a tendency toward reduced differentiation potential was also observed in older donors. This could possibly reflect the diminished regenerative potential with age [49]. In agreement with previously reported data [50,51], we show that the adipogenic potential of mMSCs tends to decrease with passaging in contrast to their

osteogenic potential, which is significantly increased in high passages. Notably, in our study, male MSCs exhibit stronger differentiation potential toward both the osteogenic and adipogenic lineages, which, to our knowledge, has never been previously reported. This observation should be further investigated under the prism of gender physiological differences.

Developmental alterations are guided by the orchestrated, differential expression of genes. ASCs should in some way retain a part of the ESC characteristics as descendants of those initial stem cells that create the fetus and in continuity the postnatal organism [52]. *Oct3/4*, *Sox2*, and *Nanog* are considered the key regulators of pluripotency in ESCs of both human and mouse origins [16,53–57]. As shown in the present study, *Nanog* is abundantly expressed in mMSCs, in accordance with previous studies on hMSCs of different origin [16] and unpublished observations (Mahaira et al., unpublished data). *Nanog* is a homeodomain protein whose intrinsic regulators of expression expand beyond its control by *Oct3/4* and *Sox2*. Specifically, *Nanog* is controlled by Forkhead box D3 and is a direct downstream effector of the leukemia inhibitory factor-signal transducer and activator of transcription-3 pathway in maintaining ESC pluripotency. In addition, stringent control of *Nanog* expression is necessary for guided differentiation toward a specific lineage. As demonstrated by Suzuki et al. [58], *t brachyury* (T) and signal transducer and activator of transcription-3 coordinately bind to a regulatory element in the mouse *Nanog* promoter, resulting in increased *Nanog* expression in early mesoderm-specified progenitors. MSCs could possibly retain the molecular signature of early mesoderm-specified progenitors, part of which is high *Nanog* expression levels. This hypothesis as well as *Nanog* downregulation during adipogenesis opens an interesting field of investigation. The role of the major ESC factors *Oct3/4* and *Sox2* remains an issue of debate. BM-derived hMSCs were found to be positive for *OCT3/4*, but *SOX-2* was not detected [16], whereas the expression of both was reported in a different study [59]. Little is known about the functional role of these pluripotency markers in ASCs [16]. All these controversial results may suggest that the major ESC factors exhibit a highly differential expression pattern, probably reflecting the significant divergence existing between embryonic and adult stem populations or stem populations of different origins.

Two novel genes (*Dazl* and *Crd-bp/Imp-1*) were explored in the MSC population. *Dazl* expression was recently reported in stem cells originated from amniotic fluid [60] and in ESCs [23]. We could not detect *DAZL* in hMSCs. On the contrary, mMSCs were positive for *Dazl*, although in low but constant levels of expression. It is important to report that we also detected *Dazl* in total murine BM cells in levels similar to embryonic and higher than those in mMSCs. Hua et al. reported that hMSCs from fetal lung can give rise to germ cells in vitro [61]. Additionally, Johnson et al. reported that a putative germ stem cell reservoir that supports oogenesis in adult female mice appears to reside in BM [62]. Nayernia et al. achieved the derivation of male germ cells from BM stem cells [63]. Thus, it remains to be clarified whether mMSCs are a potential germ cell source and what the implication of *Dazl* expression is.

Crd-bp/Imp-1 expression is documented here for the first time in both mouse and human MSCs. mMSCs isolated from the BM were found to express high levels of *Crd-bp/Imp-1*, independent of donor age or in vitro passage. This mRNA-binding protein has at least 4 identified targets: *c-Myc*, *IGFII*, *H19*, and *tau* mRNA (which is a neuron-specific gene). It has been postulated that CRD-BP/IMP1 affects the posttranscriptional fate of its targets by determining their subcellular localization, by modulating their half-life, or by affecting their translatability [27]. To elucidate the possible role of *Crd-bp/Imp-1* in MSC physiology, we examined the pattern of expression of its targets. Both *IgfII-leader3'* and *h19* mRNA levels were relatively low to undetectable. Nevertheless, a statistically significant reduction in *IgfII-leader3'* expression was detected during adipogenic commitment, which is in line with the finding by Jones et al. [64], who detected a reduction in *IgfII-leader3'* expression accompanied by increased fat deposition in adult mice fat pad.

A major target of *Crd-bp/Imp1* is *c-Myc*, a multifunctional, nuclear phosphoprotein involved in cell cycle progression, apoptosis, and activation of many ESC-specific genes with a role in metabolic regulation during the early steps of dedifferentiation [65]. In our study, *c-Myc* expression was detected in all samples tested, and its levels were significantly higher than in embryos. This high expression was influenced by neither donor age nor passage. Our data along with the well-established role of *c-Myc* in cell cycle progression may support the notion that *Crd-bp/Imp1* constant high expression leads to constant *c-Myc* levels required for cell population maintenance [66,67].

Additionally, both *Crd-bp/Imp1* and *c-Myc* expression followed the same pattern upon differentiation to the osteogenic lineage and a statistically significant induction of their expression was detected. This could be attributed to the fact that increased apoptosis is necessary to enhance the progress of bone formation, thus justifying the elevated expression of *c-Myc* during osteogenesis, as *c-Myc* is a major apoptosis inducer [68,69]. All the above suggest that *Crd-bp/Imp1* gene possesses a coordinative role in stem cell physiology.

In summary, the data presented herein show that mMSCs exhibit high similarity to their human counterparts in terms of in vitro and in vivo aging: their frequency in vivo declines significantly during postnatal life, but this population per se retains most of its functional and phenotypic properties when expanded in vitro. However, essential differences between mMSCs and hMSCs, such as their in vitro proliferative capacity, need to be taken into serious consideration when translating data from mouse models into humans. The great similarities, including *Nanog* and *CRD-BP/IMP1*, and discrepancies (eg, *Oct3/4* and *Sox2*) observed in the expression profile of important stemness regulatory genes could possibly unravel mechanisms underlying different cellular physiology and account for species variation.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Pereira RF, KW Halford, MD O'Hara, DB Leeper, BP Sokolov, MD Pollard, O Bagasra and DJ Prockop. (1995). Cultured

- adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4857–4861.
2. Phinney DG, G Kopen, RL Isaacson and DJ Prockop. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72:570–585.
 3. Kern S, H Eichler, J Stoeve, H Kluter and K Bieback. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294–1301.
 4. Bianco P, M Riminucci, S Gronthos and PG Robey. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180–192.
 5. Deans RJ and AB Moseley. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28:875–884.
 6. Greco SJ, C Zhou, JH Ye and P Rameshwar. (2008). A method to generate human mesenchymal stem cell-derived neurons which express and are excited by multiple neurotransmitters. *Biol Proced Online* 10:90–101.
 7. Kassem M. (2004). Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 6:369–374.
 8. Fehrer C, G Laschober and G Lepperdinger. (2006). Aging of murine mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 235–242.
 9. Sethe S, A Scutt and A Stolzing. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5:91–116.
 10. Stolzing A, E Jones, D McGonagle and A Scutt. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129:163–173.
 11. Mets T and G Verdonk. (1981). *In vitro* aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 16:81–89.
 12. Xu CX, JH Hendry, NG Testa and TD Allen. (1983). Stromal colonies from mouse marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radio-sensitivity. *J Cell Sci* 61:453–466.
 13. Brockbank KG and RE Ploemacher. (1983). Quantitation of stromal and hemopoietic progenitors in spleen and femoral marrow derived from Steel (Slj/+ and Sl/Sld) mice and their normal littermates. *Exp Hematol* 11:467–474.
 14. Kretlow JD, YQ Jin, W Liu, WJ Zhang, TH Hong, G Zhou, LS Baggett, AG Mikos and Y Cao. (2008). Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol* 9:60.
 15. Anjos-Afonso F, EK Siapati and D Bonnet. (2004). *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci* 117:5655–5664.
 16. Riekstina U, I Cakstina, V Parfejevs, M Hoogduijn, G Jankovskis, I Muiznieks, R Muceniece and J Ancans. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 5:378–386.
 17. Ulloa-Montoya F, BL Kidder, KA Pauwelyn, LG Chase, A Luttun, A Crabbe, M Geraerts, AA Sharov, Y Piao, MS Ko, WS Hu and CM Verfaillie. (2007). Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol* 8:R163.
 18. Kucia M, R Reca, FR Campbell, E Zuba-Surma, M Majka, J Ratajczak and MZ Ratajczak. (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20:857–869.
 19. Jiang Y, BN Jahagirdar, RL Reinhardt, RE Schwartz, CD Keene, XR Ortiz-Gonzalez, M Reyes, T Lenvik, T Lund, M Blackstad, J Du, S Aldrich, A Lisberg, WC Low, DA Largaespada and CM Verfaillie. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41–49.
 20. Lengner CJ, FD Camargo, K Hochedlinger, GG Welstead, S Zaidi, S Gokhale, HR Scholer, A Tomilin and R Jaenisch. (2007). Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1:403–415.
 21. Pan HA, RW Liao, CL Chung, YN Teng, YM Lin and PL Kuo. (2008). DAZL protein expression in mouse preimplantation embryo. *Fertil Steril* 89:1324–1327.
 22. Stefanidis K, D Loutradis, V Anastasiadou, P Beretsos, R Bletsas, V Dinopoulou, K Lekka, E Elenis, E Kiapekou, S Koussoulakos, A Fotinos and A Antsaklis. (2009). Embryoid bodies from mouse stem cells express oxytocin receptor, Oct-4 and DAZL. *Biosystems* 98:122–126.
 23. Haston KM, JY Tung and RA Reijo Pera. (2009). Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One* 4:e5654.
 24. Yu Z, P Ji, J Cao, S Zhu, Y Li, L Zheng, X Chen and L Feng. (2009). Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *J Mol Cell Biol* 1:93–103.
 25. Ioannidis P, LG Mahaira, SA Perez, AD Gritzapis, PA Sotiropoulou, GJ Kavalakis, AI Antsaklis, CN Baxevanis and M Papamichail. (2005). CRD-BP/IMP1 expression characterizes cord blood CD34+ stem cells and affects c-myc and IGF-II expression in MCF-7 cancer cells. *J Biol Chem* 280:20086–20093.
 26. Hansen TV, NA Hammer, J Nielsen, M Madsen, C Dalbaeck, UM Wewer, J Christiansen and FC Nielsen. (2004). Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24:4448–4464.
 27. Ioannidis P, L Mahaira, A Papadopoulou, MR Teixeira, S Heim, JA Andersen, E Evangelou, U Dafni, N Pandis and T Trangas. (2003). CRD-BP: a c-Myc mRNA stabilizing protein with an oncofetal pattern of expression. *Anticancer Res* 23:2179–2183.
 28. Peister A, JA Mellad, BL Larson, BM Hall, LF Gibson and DJ Prockop. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103:1662–1668.
 29. Sotiropoulou PA, SA Perez, M Salagianni, CN Baxevanis and M Papamichail. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:462–471.
 30. Kim DK. (1995). Estimating doubling time of cells *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:419–420.
 31. Cristofalo VJ, RG Allen, RJ Pignolo, BG Martin and JC Beck. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10614–10619.
 32. Meirelles Lda S and NB Nardi. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123:702–711.
 33. Davis AC, M Wims, GD Spotts, SR Hann and A Bradley. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5

- days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7:671–682.
34. Rossant J, ed. (2002). *Mouse Development*. Academic Press, San Diego, CA.
 35. Jackson L. Inbred Strains of Mice: BALB. www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BALB.shtml.
 36. Kevin Flurkey JMC and DE Harrison. (2007). Mouse models in aging research. In: *The Mouse in Biomedical Research, Vol III Normative Biology, Husbandry and Models*. MTD James G. Fox, Fred W. Quimby, Stephen W. Barthold, Christian E. Newcomer and Abigail L. Smith, eds. Academic Press, Elsevier, Oxford, pp 637–672.
 37. Tolar J, AJ Nauta, MJ Osborn, A Panoskaltis Mortari, RT McElmurry, S Bell, L Xia, N Zhou, M Riddle, TM Schroeder, JJ Westendorf, RS McIvor, PC Hogendoorn, K Szuhai, L Oseth, B Hirsch, SR Yant, MA Kay, A Peister, DJ Prockop, WE Fibbe and BR Blazar. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25:371–379.
 38. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F Marini, D Krause, R Deans, A Keating, D Prockop and E Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
 39. Scharstuhl A, B Schewe, K Benz, C Gaissmaier, HJ Buhring and R Stoop. (2007). Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells* 25:3244–3251.
 40. Rosen ED, CJ Walkey, P Puigserver and BM Spiegelman. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293–1307.
 41. Lee NK, H Sowa, E Hinoi, M Ferron, JD Ahn, C Confavreux, R Dacquin, PJ Mee, MD McKee, DY Jung, Z Zhang, JK Kim, F Mauvais-Jarvis, P Ducy and G Karsenty. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456–469.
 42. Kolf CM, E Cho and RS Tuan. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9:204.
 43. Strube P, M Mehta, A Baerenwaldt, J Trippens, CJ Wilson, A Ode, C Perka, GN Duda and G Kasper. (2009). Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone* 45:1065–1072.
 44. Gou S, C Wang, T Liu, H Wu, J Xiong, F Zhou and G Zhao. (2010). Spontaneous differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells into adipocytes without malignant transformation after long-term culture. *Cells Tissues Organs* 191:185–192.
 45. Miura M, Y Miura, HM Padilla-Nash, AA Molinolo, B Fu, V Patel, BM Seo, W Sonoyama, JJ Zheng, CC Baker, W Chen, T Ried and S Shi. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24:1095–1103.
 46. Wagner W, S Bork, P Horn, D Kronic, T Walenda, A Diehlmann, V Benes, J Blake, FX Huber, V Eckstein, P Boukamp and AD Ho. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 4:e5846.
 47. Resta R, SW Hooker, KR Hansen, AB Laurent, JL Park, MR Blackburn, TB Knudsen and LF Thompson. (1993). Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133:171–177.
 48. Ghannam S, C Bouffi, F Djouad, C Jorgensen and D Noel. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 1:2.
 49. Barnett YA, ed. *Aging- Methods and Protocols*. (2000). Humana Press Inc., Totowa, NJ.
 50. Sarugaser R, L Hanoun, A Keating, WL Stanford and JE Davies. (2009). Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One* 4:e6498.
 51. Muraglia A, R Cancedda and R Quarto. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7):1161–1166.
 52. Rossant J, ed. *Mouse Development*. (2002). Academic Press, San Diego, California.
 53. Takahashi K, K Tanabe, M Ohnuki, M Narita, T Ichisaka, K Tomoda and S Yamanaka. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
 54. Takahashi K and S Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
 55. Maherali N, R Sridharan, W Xie, J Utikal, S Eminli, K Arnold, M Stadtfeld, R Yachechko, J Tchieu, R Jaenisch, K Plath and K Hochedlinger. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1:55–70.
 56. Nakagawa M, M Koyanagi, K Tanabe, K Takahashi, T Ichisaka, T Aoi, K Okita, Y Mochiduki, N Takizawa and S Yamanaka. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26:101–106.
 57. Wernig M, A Meissner, R Foreman, T Brambrink, M Ku, K Hochedlinger, BE Bernstein and R Jaenisch. (2007). *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318–324.
 58. Suzuki A, A Raya, Y Kawakami, M Morita, T Matsui, K Nakashima, FH Gage, C Rodriguez-Esteban and JC Izpisua Belmonte. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10294–10299.
 59. Greco SJ, K Liu and P Rameshwar. (2007). Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:3143–3154.
 60. Stefanidis K, D Loutradis, L Koumbi, V Anastasiadou, V Dinopoulou, E Kiapekou, AA Lavdas, S Mesogitis and A Antsaklis. (2008). Deleted in Azoospermia-Like (DAZL) gene-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for germ cells research? *Fertil Steril* 90:798–804.
 61. Hua J, H Yu, W Dong, C Yang, Z Gao, A Lei, Y Sun, S Pan, Y Wu and Z Dou. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell* 41:448–455.
 62. Johnson J, J Bagley, M Skaznik-Wikiel, HJ Lee, GB Adams, Y Niiikura, KS Tschudy, JC Tilly, ML Cortes, R Forkert, T Spitzer, J Iacomini, DT Scadden and JL Tilly. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122:303–315.
 63. Nayernia K, JH Lee, N Drusenheimer, J Nolte, G Wulf, R Dressel, J Gromoll and W Engel. (2006). Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 86:654–663.
 64. Jones BK, J Levorse and SM Tilghman. (2001). Deletion of a nuclease-sensitive region between the Igf2 and H19 genes

- leads to Igf2 misregulation and increased adiposity. *Hum Mol Genet* 10:807–814.
65. Sridharan R, J Tchieu, MJ Mason, R Yachechko, E Kuoy, S Horvath, Q Zhou and K Plath. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136:364–377.
66. Pelengaris S, B Rudolph and T Littlewood. (2000). Action of Myc *in vivo* - proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 10:100–105.
67. Singh AM and S Dalton. (2009). The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell* 5:141–149.
68. Mansukhani A, P Bellosta, M Sahni and C Basilico. (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 149:1297–1308.
69. Prendergast GC. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18:2967–2987.

Address correspondence to:

Dr. Louisa G. Mahaira
Cancer Immunology and Immunotherapy Center
Saint Savas Cancer Hospital
171 Alexandras Avenue
Athens 11522
Greece

E-mail: mahaira@ciic.gr

Received for publication July 15, 2010

Accepted after revision January 4, 2011

Prepublished on Liebert Instant Online January 4, 2011

