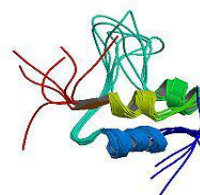
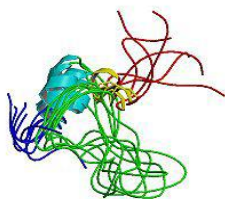




ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Π.Μ.Σ. ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΕΙΔΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ IGF I ΚΑΙ IGF II ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΠΟΝΤΙΚΩΝ**

ΤΣΟΥΤΣΗ ΛΑΜΠΡΙΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

**ΦΩΤΕΙΝΗ ΣΤΥΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΛΙΝΑΚΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Β', ΙΙΒΕΑΑ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΠΟΛΙΤΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ', ΙΙΒΕΑΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Μοριακή Ιατρική (κατεύθυνση Λειτουργική Γονιδιωματική και Πρωτεωμική) της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Κέντρου Βασικής Έρευνας ΙΙ του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2013-Οκτωβρίου 2014 υπό την επίβλεψη του Δρ. Α. Κλινάκη.

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής που επωμίστηκαν την αξιολόγηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

Δρ. Φωτεινή Στυλιανοπούλου (Καθηγήτρια Βιολογίας, τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών)

Δρ. Απόστολος Κλινάκης (Ερευνητής Β΄, ΙΙΒΕΑΑ)

Δρ. Παναγιώτης Πολίτης (Ερευνητής Γ΄, ΙΙΒΕΑΑ)

Αφιερώνω τη διπλωματική μου εργασία στον Δρ. Δημήτρη Στέλλα και τον ευχαριστώ για τη συνεχή του καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια του στον σχεδιασμό των πειραμάτων μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά

Το Δρ. Απόστολο Κλινάκη για την ευκαιρία που μου παρείχε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του, την πολύτιμη καθοδήγηση, τις συμβουλές και την συνεχή υποστήριξή του.

Τη Δρ. Φωτεινή Στυλιανοπούλου και το Δρ. Παναγιώτη Πολίτη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Επιτροπή και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και υποδείξεις τους.

Το Δρ. Ηλία Στρατικόπουλο, για την ευγενική χορηγία των ποντικών, που δημιούργησε στο εργαστήριο του Δρ.Ευστρατιάδη που χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Το Δρ. Αργύρη Ευστρατιάδη για την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Το Δρ. Δημήτρη Στέλλα για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη, την υπομονή, τη βοήθεια και την υποστήριξή του στα εύκολα και στα δύσκολα.

Τα μέλη του εργαστηρίου Θεόδωρο Ράμπια, Γιώργο Παπαφωτίου, Έλια Χαβδούλα, Ανδριάννα Παπαδημητροπούλου, Κωνσταντίνο Φαιδωνίδη, Ελένη Βασιλάκη, Βούλα Βγενοπούλου, Βαρβάρα Παρασκευοπούλου, Νεκταρία Λέλη, Ζωή Κανάκη και Λαμπρινή Τζιόγκα για την πολύτιμη βοήθειά τους, το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου.

Την οικογένεια μου και τους φίλους μου εντός και εκτός του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών για τη συμπαράσταση, τη βοήθεια και την κατανόησή τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1Αυξητικοί παράγοντες	11
1.1.2.Ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες IGFs (insulin-like growth factors).	11
1.3.IGFI.....	15
Δομή και έκφραση του γονιδίου του IGF1	15
1.4.IGFII.....	18
Δομή και έκφραση του γονιδίου του IGFII	18
Επιγενετική ρύθμιση του <i>IgfII</i>	19
1.5.Υποδοχείς των ινσουλινοειδικών αυξητικών παραγόντων-(IGFIR, IGFIIR)	22
1.6. Πρωτεΐνες δέσμευσης των ινσουλινοειδικών αυξητικών παραγόντων IGF (IGFBPs).	25
1.7. Βιολογικές δράσεις των IGFs	26
1.8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ	29
1.8.1. Ο ρόλος των IGFs στην εμβρυική ανάπτυξη.....	30
2.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	36
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
3.1.ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	38
3.2.ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	39
3.2.1. Μονιμοποίηση ιστού.....	39
3.2.2. Κρυτομέζ.....	39
3.2.3. Ανοσοφθορισμός	39
3.3Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	41
3.3.1.Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	42

3.4. Απομόνωση πρωτεϊνών.....	43
3.4.1.Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	44
3.5 Απομόνωση RNA	47
3.5.1.Υπολογισμός της απόδοσης απομόνωσης και της καθαρότητας του RNA.....	48
3.5.2. DNase treatment.....	48
3.5.3.Παρασκευή cDNA από το RNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης	48
3.5.4.Πρωτόκολλο παρασκευής cDNA(First-Strand cDNA) από το RNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (SuperScript TM II RT)	49
3.5.5. Αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	50
(RT-PCR).....	50
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
4.1. Δημιουργία IGF1-YFP LPL (lox-puro-lox) ποντικού	54
4.2. Δημιουργία IGFII-mCHERRY LNL (lox-neo-lox) ποντικίου	55
4.3. Ενδεικτικοί φαινότυποι που προκύπτουν από τη διασταύρωση αρσενικών.....	57
<i>IgfII_mCherry</i> × <i>IgfI_Yfp</i> θηλυκών ποντικών	57
4.4. Ταυτοποίηση των γονοτύπων των <i>Yfp/mCherry</i> ποντικών.....	57
4.5. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε <i>yfp</i> ποντίκι.....	59
4.6. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε <i>mcherry</i> ποντίκια	61
4.7. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε <i>yfp/mcherry</i> ποντίκια	62
4.8.Έκφραση των γονιδίων <i>yfp</i> και <i>mcherry</i> την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18	64
4.9. Χρήση δεικτών κυτταρικής διαφοροποίησης με στόχο τη ταυτοποίηση κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν <i>yfp</i> και <i>mcherry</i>	68
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
6.BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες IGFI(insulin-like growth factor I) και IGFI(II)(insulin-like growth-factor II), είναι μικρά μιτογόνα πολυπεπτίδια, δομικά ομόλογα με την προινσουλίνη, παράγονται από πολλούς ιστούς και παρουσιάζουν αυτοκρινή/παρακρινή δράση. Αποτελούν μέρος της ευρύτερης οικογένειας των IGFs, που αποτελούνται από τους μεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης IgfIR , IgfIIR (insulin-like growth factor receptor). Κατά την κυκλοφορία τους στο πλάσμα του αίματος, προσδένονται με έξι πρωτεΐνες υψηλής συγγένειας, τις IGFBPs1-6, (insulin growth factor binding proteins), λειτουργούν ως ορμόνες και εκκρίνονται στον ενδοκυττάριο χώρο. Οι IGFs είναι καθοριστικοί για την ανάπτυξη και το μέγεθος στα θηλαστικά και παράγονται στο ήπαρ, και κυρίως από την επίδραση της αυξητικής ορμόνης (GH-growth hormone). Παράγονται όμως και σε άλλους ιστούς, όπως στους νεφρούς, στους μύς, στους χόνδρους και στα οστά..

Ο IGFI είναι σημαντικός σε όλη την διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού. Σχεδόν όλα τα μόρια του IGFI είναι προσδεδεμένα σε μια πρωτεΐνη IGFBP, που εμποδίζει την βιολογική του δράση. Η ενεργοποίηση του γίνεται με την πρόσδεσή του στον υποδοχέα IGFIIR και με χαμηλή συγγένεια στον υποδοχέα της ινσουλίνης (IR). Ο IGFI(II) , είναι απαραίτητος κυρίως για την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου, στην ενδομήτρια ζωή, ενώ τα επίπεδα έκφρασής του, πέφτουν κατακόρυφα μετά την γέννα. Προσδένεται τόσο στον IGFIIR και στον IR υποδοχέα, όσο και στον IGFIIR υποδοχέα, όπου δρα ανταγωνιστικά στην ενεργοποίησή του. Ο IGFI(II) ακολουθεί το πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης (parental imprinting). Συγκεκριμένα, το μητρικής προέλευσης γονίδιο *IgfII* εντυπώνεται, δηλαδή, το μητρικό αλληλόμορφο έχει αποσιωπηθεί, λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων και δεν επιδρά στην ανάπτυξη των εμβρύων σημαντικά . Έτσι στους απογόνους που προκύπτουν, τα μόνα αλληλόμορφα που είναι ενεργά είναι αυτά της πατρικής προέλευσης.

Σε μελέτες που έχουν γίνει με πειράματα σε knock-out ποντίκια, στα γονίδια που κωδικοποιούν τον IGFI και τον IGFI(II) αντίστοιχα, προκύπτουν διαφορετικοί φαινότυποι. Συγκεκριμένα, απουσία του γονιδίου του *Igf1*, ο φαινότυπος που προκύπτει είναι περίπου 60% σε σχέση με το φυσιολογικό μέγεθος του νεογέννητου κατά τη γέννηση και εμφανίζουν ένα είδος νανισμού, ενώ το ίδιο συμβαίνει όσον αφορά και το γονίδιο του *IgfII*. Απουσία και των δύο παραγόντων, οι φαινότυποι που προκύπτουν είναι περίπου στο 30% σε σχέση με το φυσιολογικό μέγεθος.

Για την μελέτη αυτή, σχεδιάστηκαν δύο knock-in διαγονιδιακά ποντίκια, για τον εντοπισμό των παραγόντων αυτών με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν χίμαιρες που εκφράζουν την πρωτεΐνη YFP(yellow fluorescent protein), στη θέση του IGFI κάτω από τον ενδογενή υποκινητή του IGFI, και την πρωτεΐνη CHERRY, στη θέση του IGFI(II), κάτω από τον

υποκινητή του IGFII. Μετά την διασταύρωση αρσενικών ποντικών που εκφράζουν IGFII/cherry με θηλυκά που εκφράζουν IGFII/YFP και έπειτα από χρονικά σχεδιασμένες εγκυμοσύνες (εμβρυική ημέρα E15, E18), έγινε συλλογή εμβρύων με διαφορετικό γονότυπο σε διαφορετικά χρονικά στάδια ανάπτυξης για τον έλεγχο της έκφρασης και των δυο γονιδίων αντίστοιχα. Παράλληλα, διεξήχθησαν πειράματα με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη παραγόντων σε διαφορετικούς ιστούς και τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με ανοσοαποτύπωμα κατά western.

ABSTRACT

Insulin like growth factors IGFI (insulin-like growth factor 1) and IGFII (insulin-like growth-factor II), are small mitogenic polypeptides with structural homology to proinsulin, produced by many tissues and exhibit autocrine / paracrine action. They are part of the wider family of IGFs, which comprise the membrane tyrosine kinase receptors (IGFIR,IGFIIR). During their circulation into the blood plasma, they could bind to six proteins with high affinity, IGFBPs1-6, (insulin growth factor binding proteins), and function as hormones secreted to the intracellular space. IGFs are crucial for the growth of mammals, and are produced in the liver, especially under the signaling of growth hormone (GH-growth hormone). It is also known that IGFs are produced and by other tissues such as the brain, the kidneys, the muscles, the cartilages and the bones.

IGFI action is very important throughout development of the organism. Almost all molecules of IGFI are bound to an IGFBP protein, preventing their biological activity. Their activation is induced upon binding of the IGFI receptor with less affinity to the insulin receptor (IR). IGFII, is necessary mainly for the normal development of the fetus *in utero*, whereas the levels of expression, plummet after birth. IGFII could bind to both *Igf1r* and IR receptor, and also to a specific IgfIIr receptor,. The *IgfII* gene follows parental imprinting. Specifically ,in the maternal *IgfII* imprinted gene, the maternal allele is silenced due to epigenetic changes. So in all offsprings , the only alleles that are active are those of paternal origin. In studies, using knock-out mice, whose genes encode *IgfI* and *IgfII* respectively , different phenotypes are observed. Specifically, in absence of *Igf1*, mice are approximately 60% smaller, in comparison to the wild type siblings (dwarfism), the same applies to *IgfII*. In the absence of both agents, mice are around 30% smaller in comparison to their wild type siblings.

To study the expression of IGFI and IGFII in the development of mouse embryos we generated two knock-in transgenic mice, in order to be able to distinguish the two molecules using simple imaging techniques such as confocal microscopy. We therefore have generated two different chimeric mice expressing fluorescent proteins under the endogenous promoters of IFGI and IGFII respectively. We chose the Yellow Fluorescent Protein (YFP) to be expressed under the endogenous IGFI promoter and the Cherry Fluorescent Protein to be expressed under the endogenous IGFII promoter. After the establishment of the two different chimeric mice and the successful breeding of male mice expressing IGFII/CHERRY with females expressing IGFI/YFP, and time-scheduled pregnancies we collected several mouse embryos with different genotype at various developmental time points in order to check the expression of both genes via confocal microscopy. The expression of these molecules was also analyzed using out real time PCR experiments. Moreover the

expression of both IGFs in various tissues of the developing embryos was verified with the western blots.



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αυξητικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι μέρος μιας μεγάλης ομάδας πολυπεπτιδίων που μεταδίδουν σήματα στο εσωτερικό των κυττάρων και επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία. Οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν διάφορα γονίδια που εμπλέκονται κυρίως σε μηχανισμούς κυτταρικής διαίρεσης, διαφοροποίησης και μετανάστευσης. Συγκεκριμένα, κατά την διάπλαση του οργανισμού διεγείρουν τους διάφορους κυτταρικούς τύπους ώστε να πολλαπλασιαστούν, να διαφοροποιηθούν και να οργανωθούν σε ομάδες κυττάρων ειδικές για κάθε ιστό. Ανάλογα με τη συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, μπορεί να ρυθμίζουν αρνητικά ή θετικά τη σύνθεση υποδοχέων. Συνήθως οι αυξητικοί παράγοντες βρίσκονται στο κύτταρο ως πρόδρομα ανενεργά μόρια και μπορούν να ενεργοποιηθούν με πρωτεόλυση ή μετά από πρόσδεση σε μόρια της εξωκυττάριας ουσίας.

Ανάλογα με την απόσταση της θέσης σύνθεσης και της θέσης δράσης τους, οι αυξητικοί παράγοντες χωρίζονται σε ενδοκρινείς, παρακρινείς και αυτοκρινείς. Έχουν περιγραφεί εκατοντάδες αυξητικοί παράγοντες, μέχρι σήμερα, και έχουν ομαδοποιηθεί σε τουλάχιστον είκοσι οικογένειες βάσει δομικών ομοιοτήτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι παρακάτω αυξητικοί παράγοντες : FGFs(Fibroblast growth factors), EGFs (epithelial growth factors), IGFs (insulin-like growth factors), PDGFs (platelet derived growth factors), VEGF (vascular epithelial growth factors), NGF (nerve growth factors).

1.1.2. Ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες IGFs (insulin-like growth factors)

Οι ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες (IGF) είναι μια οικογένεια πεπτιδίων που παράγονται κυρίως στο συκώτι και έχουν ενδοκρινή, παρακρινή και αυτοκρινή δράση. Κυκλοφορούν στο αίμα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση και την ανάπτυξη των θηλαστικών (Daughaday, Parker, Borowsky, Trivedi, & Kapadia, 1982; Froesch & Zapf, 1985), ιδιαίτερα στην εμβρυική ανάπτυξη, στη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής. Αποτελούνται από τρεις προσδέτες (ινσουλίνη, IGFI, IGFI) και τους αντίστοιχους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, τους IGFI, IGFI υποδοχείς και τον ινσουλινικό υποδοχέα (IR), όπως και μια οικογένεια IGFBP

πρωτεϊνών δέσμευσης (Clemmons, 1997). Οι πρωτεΐνες αυτές επηρεάζουν την ημιζωή και τη βιοδιαθεσιμότητα των IGFs στην κυκλοφορία και στο εξωκυττάριο υγρό. Μέχρι στιγμής, η οικογένεια των IGF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και εμπλέκεται σε ποικίλες αρρώστιες, όπως ο διαβήτης και ο καρκίνος (Monzavi & Cohen, 2002).

1.2. Ιστορική αναδρομή

Η αναγνώριση και ταυτοποίησή τους ξεκινάει το 1957, όταν οι Salmon και Daughaday αναγνώρισαν κάποιους παράγοντες που είχαν την ικανότητα να ενσωματώνουν θειικό άλας στον χόνδρο του ποντικού, και για αυτό τον λόγο ορίστηκαν ως "παράγοντες θείωσης" (sulphation factor), (Daughaday et al., 1972; Salmon & Daughaday, 1957). Ο Froesch και οι συνάδελφοι του περιέγραψαν την ινσουλινόμορφη δραστηριότητα, μη επιδεκτικής καταστολής, (non-suppressible insulin-like activity, NSILA) δύο διαλυτών συστατικών του ορού (NSILA I, NSILA II), που προωθούν την πρόσληψη γλυκόζης από τον λιπώδη ιστό και το διάφραγμα *in vitro*. Το 1972, οι όροι "sulphation factor" και NSILA αντικαταστάθηκαν από τον όρο "σωματομεδίνη", δηλώνοντας ουσία που βρίσκεται κάτω από έλεγχο και η οποία μεσολαβεί για τις δράσεις της (Daughaday et al., 1972). Η δράση της ρυθμίζεται από τα επίπεδα έκφρασης της αυξητικής ορμόνης Growth hormone (GH), με βάση την αρχική υπόθεση της σωματομεδίνης (*original somatomedin hypothesis*), η οποία, διατυπώθηκε στις πρώιμες προσπάθειες κατανόησης του πώς η σωματική ανάπτυξη ρυθμίζεται από παράγοντες που εκκρίνονται από την υπόφυση. Κατά βάση, τα αποτελέσματα από αυτά τα πειράματα, πρότειναν ότι η GH, εκκρινόμενη από την υπόφυση, δεν δρούσε άμεσα στους ιστούς-στόχους για να προάγει την αύξηση (Le Roith, Bondy, Yakar, Liu, & Butler, 2001). Το 1976, ο Rinderknecht και ο Humbel απομόνωσαν δύο δραστικές ουσίες από τον ανθρώπινο ορό, οι οποίες εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας με την προΐνσουλίνη μετονομάστηκαν ως "ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες I και II (insulin-like growth factor I, II, IGFI, II), (Laron, 2001; Rinderknecht & Humbel, 1976).

Παρόλο που η δομική ομοιότητα μεταξύ ινсуλίνης και IGFI, πρότεινε μεταβολική λειτουργία, ωστόσο κυριαρχούσε η άποψη ότι ο αρχικός λειτουργικός ρόλος των IGFs ήταν η δράση τους ως αυξητικοί παράγοντες. Η αρχική υπόθεση της σωματομεδίνης διατύπωνε ότι η ανάπτυξη καθορίζεται από την GH, δρώντας αρχικά στο ήπαρ, όπου διεγείρει την σύνθεση και απελευθέρωση του IGFI. Ο IGFI κατόπιν κυκλοφορεί στα κύρια όργανα στόχους, όπως χόνδρο και οστά, δρώντας συνεπώς με ενδοκρινή τρόπο (Le Roith et al., 2001).

Η πρώτη σημαντική πρόκληση στην αρχική υπόθεση της σωματομεδίνης έγινε με την διαπίστωση ότι οι IGFs παράγονταν στους περισσότερους, αν όχι σε όλους τους

ιστούς, και επίσης είχαν αυτοκρινή/παρακρινή δράση. Επιπρόσθετα έγινε εμφανές ότι η GH δρούσε άμεσα, χωρίς την συμμετοχή του IGF1 (D'Ercole, Applewhite, & Underwood, 1980).

"Dual effector theory": Μελετώντας το 1985 τις επιδράσεις της GH και του IGF1 στα 3T3 προ-λιποκύτταρα, ο Green και οι συνάδελφοι του, έκαναν την παρατήρηση ότι η GH και ο IGF1 δρουν στα κύτταρα σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης (Green, Morikawa, & Nixon, 1985). Η GH βρέθηκε ότι διεγείρει τα νέα προλιποκύτταρα, ενώ ο IGF-I διεγείρει κύτταρα σε μεταγενέστερο στάδιο της ανάπτυξης. Η υπόθεση ότι η GH δρα σε προγονικά κύτταρα και ότι ο τοπικά παραγόμενος IGF1, μετά από επαγωγή με GH, διεγείρει με αυτοκρινή/παρακρινή τρόπο την επακόλουθη κλωνική επέκταση, ονομάστηκε *"dual effector theory"*. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα αμφισβητούν την *"dual effector theory"* και είναι εμφανές ότι η GH έχει άμεσες δράσεις σε κύτταρα *in vivo* και *in vitro*, μη μεσολαβούμενες ή εξαρτώμενες από τον IGF1. Ωστόσο, η φυσιολογική σημασία αυτών των ευρημάτων παραμένει ασαφής. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποφέρει δεδομένα που δεν είναι σύμφωνα με αυτή την υπόθεση. Η GH είναι ξεκάθαρα όχι απαραίτητη για την διαφοροποίηση κυττάρων, όπως λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, καθώς αυτοί οι διαφοροποιούμενοι κυτταρικοί τύποι είναι άφθονοι σε μύες και ανθρώπους με ανεπάρκεια GH και GHR (growth hormone receptor). Πράγματι, η παχυσαρκία είναι υπέρμετρη σε καταστάσεις ανεπάρκειας GH, και θεραπεία με GH μειώνει σημαντικά την αφθονία του λιπώδους ιστού, προτείνοντας ότι οι λιπολυτικές δράσεις της GH είναι ακόμη πιο σημαντικές σε σχέση με την οποιαδήποτε δράση μπορεί να έχουν στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (Daughaday & Rotwein, 1989).

Επιπρόσθετα, τα χονδροκύτταρα του επιφυσιακού δίσκου πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά σε πλήρη απουσία του IGF1, και συνεπώς ο IGF1 δεν φαίνεται να είναι απαραίτητος για την κλωνική επέκταση. Για τον λόγο αυτό, παρόλο που η GH και ο IGF1, και πιθανόν ο IGFII έχουν συμπληρωματικούς ρόλους στην προαγωγή της γραμμικής ανάπτυξης των οστών, δεν γίνεται ακριβώς όπως είχε προταθεί στην αρχική *"dual effector theory"* (Green et al., 1985).

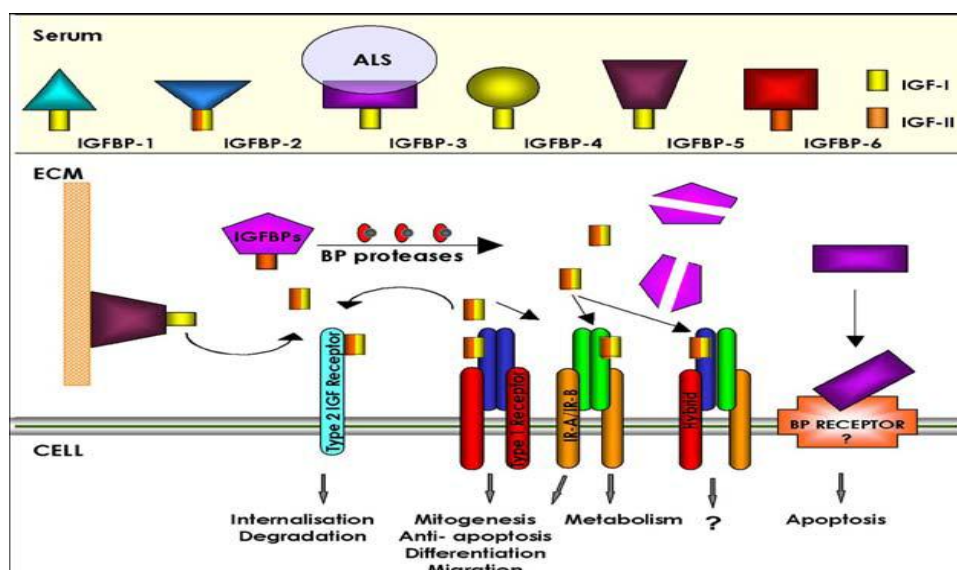
Μέχρι τώρα, η άποψη που επικρατεί για την ρύθμιση της μεταγεννητικής σωματικής ανάπτυξης είναι ότι η GH επιδρά στα επίπεδα του προερχόμενου από το ήπαρ IGF-I, καθώς επίσης και στην σταθερότητα του IGF1 της κυκλοφορίας, μέσω διέγερσης σχηματισμού του τριμερούς συμπλέγματος, IGF1/IGFBP3/ALS (acid-labile subunit) συμπλέγματος. Επιπρόσθετα η GH είναι ικανή να επηρεάζει την τοπική ιστική παραγωγή του IGF1, διατηρώντας κατά συνέπεια τον συνολικό έλεγχο της μεταγεννητικής ανάπτυξης. Οι παραπάνω μελέτες δηλώνουν ότι η GH έχει άμεσες και έμμεσες (μέσω IGF1) δράσεις στην ανάπτυξη του οργανισμού και ο IGF1, έντονη τοπική αυτοκρινή/παρακρινή δράση. Τέλος, μελέτες σε ποντίκια με ανενεργό IGF1, έδειξαν σημαντική επιβράδυνση ανάπτυξης στην γέννηση και στειρότητα και στα δύο φύλα. Φαίνεται δε, ότι ο IGF1 έχει σημαντικές GH-ανεξάρτητες δράσεις στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, καθώς

αυτές οι επιπτώσεις δεν παρατηρούνται σε ζώα με ανεπάρκεια GH ή GHR(growth hormone receptor).(Le Roith et al., 2001).

Η δράση των IGFs έχει επίσης μελετηθεί στην αναγέννηση ιστών και οργάνων, όπως, στο νεφρό(Moran, Brown, Kim, & Klein, 1991; Mulroney, Lumpkin, & Haramati, 1991), στο πάγκρεας (Falconer, Davies, Zhang, & Smith, 1991; Smith, Wise, Berkowitz, Wan, & Rubin, 1988), στο μυ (Edwall, Schalling, Jennische, & Norstedt, 1989; Levinovitz, Jennische, Oldfors, Edwall, & Norstedt, 1992), στο σχηματισμό λιπιδίων και στη διάλυσή τους (Lewis, Molan, Bass, & Gluckman, 1988) (Smith et al., 1988), στην εννεύρωση του σκελετικού μυ (Caroni & Grandes, 1990), στην ερυθροποίηση (Kurtz et al., 1988), και σε μερικές περιπτώσεις στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Baxter et al., 1998; Binz et al., 1990) και φαίνεται ότι οι IGFs συμμετέχουν σε όλα τα παραπάνω συστήματα.

Οι IGFs συντίθενται τοπικά, στο ήπαρ κυρίως και εμφανίζουν παρακρινή, αυτοκρινή και ενδοκρινή δράση και σε άλλους ιστούς. Σε κάποιους ιστούς, που εντοπίζεται ο *Igf1*, όπως η επιφυσιική πλάκα, οι ωοθήκες και το νεφρό, η σύνθεση του *Igf1* ρυθμίζεται από την GH, οπότε η υπόθεση της σωματομεδίνης επιβεβαιώνεται, σε παρακρινή, αυτοκρινή και ενδοκρινή επίπεδα.(Le Roith et al., 2001; Roberts et al., 1986)

Εικόνα1.1 Σχηματική απεικόνιση του IGF συστήματος.



Το IGF σύστημα συνίσταται από τους υποδοχείς (IGF-IR, δύο IR ισομορφές, IGF-IR:IR υβρίδια και IGF-IIR), τα πεπτίδια (IGF-I, IGF-II και ινσουλίνη) και έξι αυξημένης συγγένειας IGFBPs. Οι IGFs κυκλοφορούν κυρίως ως IGF:IGFBP-3:ALS σύμπλεγμα. Η απελευθέρωση των IGFs από τις IGFBPs συμβαίνουν μετά από IGFBP πρωτεόλυση ή πρόσδεση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Οι IGFBPs μπορούν επίσης να δρουν ανεξάρτητα του IGF εισερχόμενες στο κύτταρο μέσω απροσδιόριστων ακόμη υποδοχέων. Ο IGF-IIR ρυθμίζει την βιοδιαθεσιμότητα του IGF-II(Denley, Cosgrove, Booker, Wallace, & Forbes, 2005) .

1.3. IGF1

Δομή και έκφραση του γονιδίου του IGF1

Ο αυξητικός παράγοντας-1 (IGF1) είναι πεπτίδιο 7,5 kD με δομική ομολογία με την προϊνσουλίνη. Εκφράζεται σε πολλούς, αν όχι σε όλους τους ιστούς, του εγκεφάλου. Πρόκειται για ένα πεπτίδιο 70 αμινοξέων που δρα ως κύριος μεσολαβητής της δράσης της αυξητικής ορμόνης στη μεταγεννητική ζωή (Daughaday, 1982; Froesch & Zapf, 1985; Schoenle, Zapf, Humbel, & Froesch, 1982). Ανήκει στην ίδια οικογένεια με τις δομικά ομόλογες πρωτεΐνες, την ινσουλίνη και τον IGF-II.

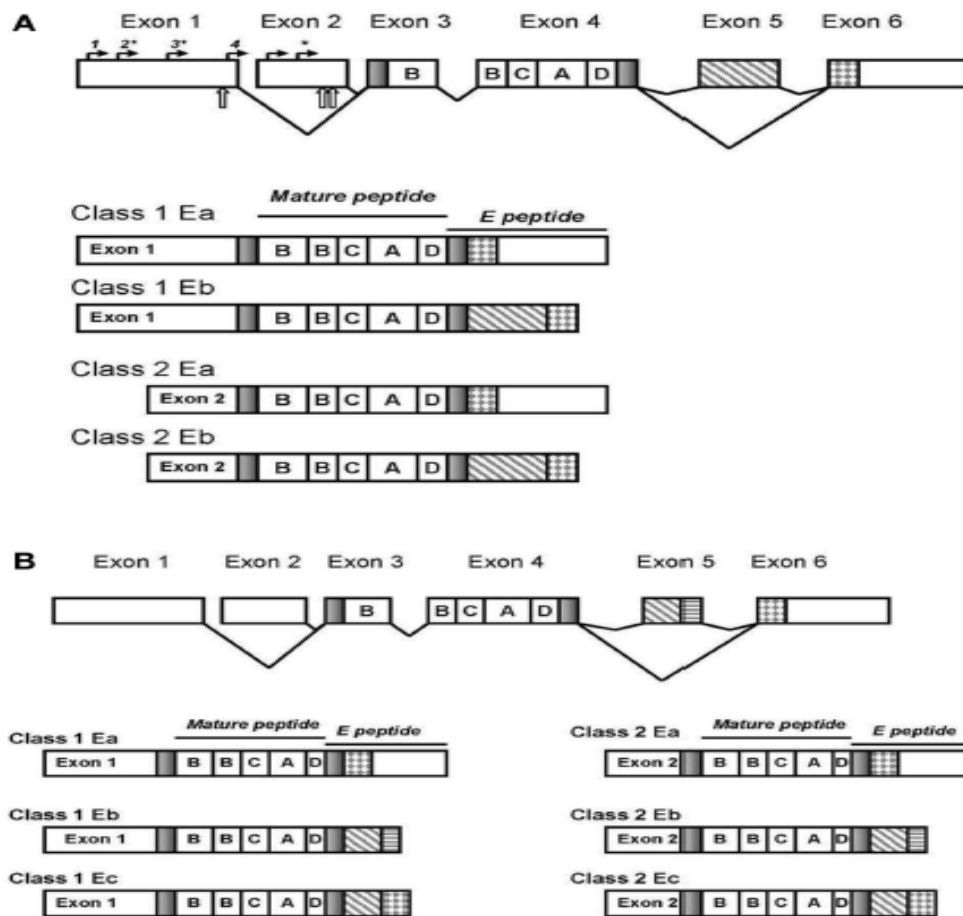
Το γονίδιο του *IGF1* εκτείνεται περίπου 95Kb στο ανθρώπινο γενωμικό DNA και περιλαμβάνει έξι εξόνια. Τα εξόνια 1 και 2 κωδικοποιούν εναλλακτικά σηματοδοτικά πεπτίδια ξεκινώντας από αρκετές θέσεις έναρξης μεταγραφής. Τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν το υπόλοιπο του σηματοδοτικού πεπτιδίου (signal peptide), το υπόλοιπο του ώριμου IGF1 μορίου και μέρος του ουραίου πεπτιδίου (trailer peptide). Τα εξόνια 5 και 6 κωδικοποιούν εναλλακτικά μέρη του ουραίου πεπτιδίου (με αποτέλεσμα τις IGF1A και IGF1B μορφές), καθώς και 3' αμετάφραστες αλληλουχίες με πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Το γονίδιο του IGF1 στον άνθρωπο χαρτογραφείται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 (12q22-23), ενώ στο γονιδίωμα του ποντικού στο χρωμόσωμα 7 (7q12-q13) (Shavhlakadze, Winn, Rosenthal, & Grounds, 2005; Yang, Alnaqeeb, Simpson, & Goldspink, 1996).

Οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ του mRNA του ανθρώπου και του ποντικού, εντοπίζονται στα 5' και 3' άκρα της κωδικής αλληλουχίας (Daughaday & Rotwein, 1989), τα οποία κωδικοποιούν το ίδιο ώριμο πρωτεϊνικό μόριο, (Simmons, Flozak, & Ogata, 1993), ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος RNA (splicing) και ποικίλης πολυαδενυλίωσης (M. A. Bach, Roberts, Smith, & LeRoith, 1990), (Simmons et al., 1993). Η ποικιλομορφία στο 3' άκρο του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή mRNA που ποικίλουν σε μέγεθος (διαφορετικό μήκος της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής, 3'UTR) και κωδικοποιούν διαφορετικές καρβοξυτελικές περιοχές Ε των πρόδρομων πεπτιδίων (Daughaday & Rotwein, 1989). Η ετερογένεια στο 5' άκρο οδηγεί στην παραγωγή πολλαπλών mRNA (κλάση 1 και 2) ανάλογα με τη συρραφή των εξονίων (Rotwein, 1986), από τα οποία προκύπτουν πρόδρομα μόρια IGF1 με διαφορετικές αμινο-τελικές αλληλουχίες (Simmons et al., 1993). Το προφίλ έκφρασης των mRNA διαφοροποιείται, πιθανώς λόγω διαφορετικών υποκινητών ή ρυθμιστικών στοιχείων (Adamo, Shemer, Roberts, & LeRoith, 1993; Simmons et al., 1993), ανάλογα με τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο (Adamo, Ben-Hur, LeRoith, & Roberts, 1991). Τα πολλαπλά είδη mRNA για τον IGF-1, δηλώνουν αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου, καθιστώντας δυνατή την ιστοειδική έκφραση συγκεκριμένων μεταγράφων καθώς επίσης και ορμονική ρύθμιση. Τα επίπεδα του IGF1 ποικίλλουν δραματικά

στους ιστούς και στον ορό και ρυθμίζονται οντογενετικά όπως επίσης από πολλαπλές ορμόνες και θρεπτικούς παράγοντες. Η GH (growth hormone), είναι προεξέχων μεταγεννητικό ερέθισμα για την παραγωγή του IGFI (Cohen, 2006).

Ο IGFI συντίθεται ως μεγάλο πρόδρομο μόριο που υφίστανται εκτεταμένη επεξεργασία στο αμινο-τελικό (πεπτίδιο σήματος) και στο καρβοξυτελικό άκρο του (Jansen et al., 1983, Rotwein, 1986). Η ώριμη μορφή του πεπτιδίου αποτελείται από τέσσερις περιοχές (domains), τις B, C, A και D. Η δομή της πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Η 5'UTR περιοχή είναι η πιο συντηρημένη περιοχή (περισσότερο από 90%) μεταξύ των γονιδίων του IGFI διαφόρων οργανισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι έξι από τις δεκατρείς διαφορές στη δομή των μορίων ανάμεσα στα διάφορα είδη εντοπίζονται στην περιοχή C (12 αμινοξέων) (Oberbauer, 2013). Τα αμινοξέα σ' αυτή την περιοχή μπορεί να είναι σημαντικά για τη λειτουργία του αυξητικού παράγοντα, αφού και η περιοχή C περιέχει δομικά στοιχεία που φαίνεται να ρυθμίζουν και να καθορίζουν τη δέσμευση του μορίου στον υποδοχέα του (Bayne et al., 1989). Επιπλέον, το 71% των αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου (περιοχή E) του πεπτιδίου είναι ταυτόσημα στο *Xenopus*, στο κοτόπουλο, στο ποντίκι και στον άνθρωπο. Αυτή η μεγάλου βαθμού ομοιότητα υποδηλώνει ότι η περιοχή E, είτε ως ξεχωριστό πεπτίδιο είτε ως τμήμα του μεγαλύτερου μορίου του IGFI, μπορεί να συμμετέχει σε κάποια βιολογική λειτουργία ιδιαίτερα συντηρημένη, αλλά ακόμα αχαρακτήριστη. Όσον αφορά το αμινο-τελικό άκρο του πεπτιδίου, είναι το λιγότερο συντηρημένο τμήμα του πρόδρομου IGFI, μόνο το 50% των αμινοξέων του τμήματος αυτού είναι όμοια στα διάφορα είδη (Kajimoto & Rotwein, 1990).

Εικόνα 1.2. (Α) Δομή του *Igf1* στο ποντίκι, (Β) Δομή του *IGF1* στον άνθρωπο



(Α) Δομή του *Igf1* στο ποντίκι, (Β) Δομή του *IGF1* στον άνθρωπο και οι ισομορφές τους, ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος. Η διαφορά τους εντοπίζεται στο γεγονός ότι στον άνθρωπο, το Eb πεπτίδιο αποτελείται μόνο από τα εξόνια 4 και 5 (Rotwein et al., 1986), ενώ το εναλλακτικό μετάγραφο, που αποτελείται από τα εξόνια 4,5,6, ονομάζεται Ec, ή διαφορετικά MCF (mechanogrowth factor) (Shavlakadze et al., 2005; Yang et al., 1996)

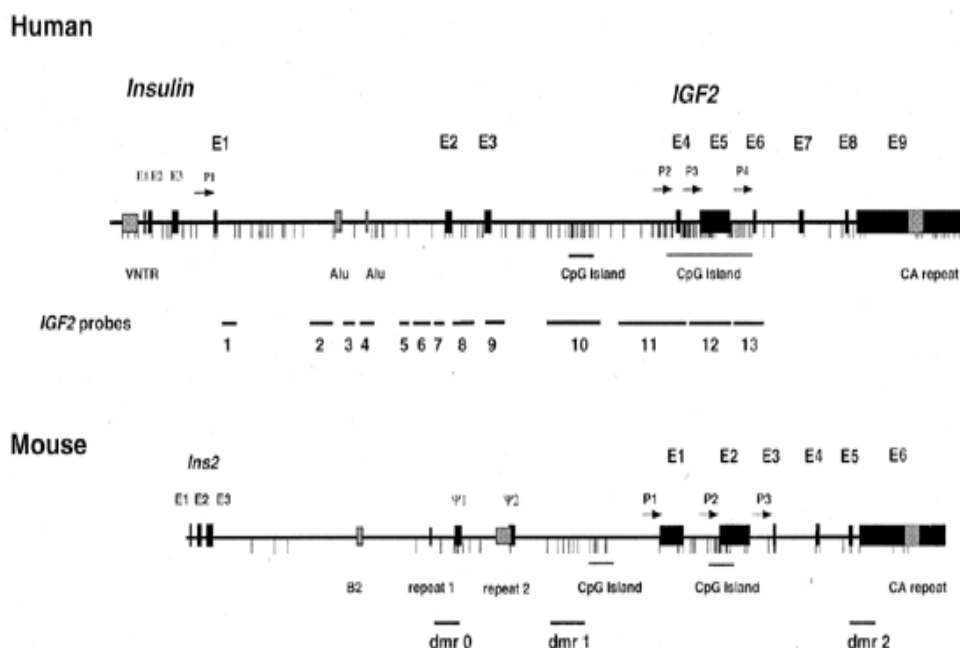
1.4. IGFII

Δομή και έκφραση του γονιδίου του IGFII

Ο IGFII συνίσταται από 67 αμινοξέα και η πρωταρχική αλληλουχία είναι υψηλά συντηρημένη. Χωρίζεται σε A, B, C, D περιοχές, όπου η C περιοχή είναι ανάλογη του συνδετικού πεπτιδίου της προΐνσουλίνης. Η αλληλούχιση του cDNA του IGFII δείχνει ότι το πρόδρομο μόριο του proIGFII (preproIGFII) συνίσταται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 24 καταλοίπων, 67 αμινοξέα που περιλαμβάνουν το ώριμο πεπτίδιο και 89 αμινοξέα της καρβοξυτελικής επέκτασης που ορίζεται ως E-πεπτίδιο (Εικόνα 1.3) (Daughaday & Rotwein, 1989). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον preproIGFII είναι στενά συνδεδεμένο με το γονίδιο της ινσουλίνης και μεταγράφεται στον ίδιο προσανατολισμό. Στον άνθρωπο, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 11(11p15), εκτείνεται 30kb στο χρωμοσωμικό DNA και συνίσταται από 9 εξόνια. Τα εξόνια 7-8 και 234 νουκλεοτίδια του εξονίου 9 παρέχουν την κωδικοποιούσα περιοχή για το ανθρώπινο preproIGF-II (Nielsen 1992). Στην ώριμη μορφή του πεπτιδίου, το 47% των αμινοξέων είναι όμοιο με την ινσουλίνη και έχουν όμοια 3D-δομή, λόγω των δισουλφιδικών δεσμών και καταλοίπων στον υδρόφοβο πυρήνα του στο καρβοξυτελικό του άκρο (Evans, DeChiara, & Efstratiadis, 1988; Nielsen, 1992; Soares et al., 1986).

Ο *IgfII*, στο ποντίκι, συνεντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 με το μη-κωδικοποιημένο γονίδιο *H19*, στο οποίο αντίθετα, ο εκκινητής του πατρικού χρωμοσώματος μεθυλιώνεται και το πατρικό αλληλόμορφο αποσιωπάται. Τα δύο αυτά γονίδια μοιράζονται ένα κοινό ζεύγος ενισχυτών, οι οποίοι δρουν σε κάθε γονίδιο, με βάση τη γονεϊκή τους προέλευση (DeChiara, Robertson, & Efstratiadis, 1991; Levinovitz et al., 1992).

Εικόνα1.3. Απεικόνιση της δομής του *IgfII* στον άνθρωπο και στο ποντίκι



Η δομή του *IgfII* στο ποντίκι αποτελείται από 3 εκκινητές (P1, P2, P3), οι οποίοι εντοπίζονται στο 5' άκρο στα εξόνια 1, 2, 3 αντίστοιχα. Επίσης εντοπίζονται 3 διαφορετικές περιοχές DNA μεθυλίωσης (dmr0, dmr1, dmr2). Εντοπίζονται επίσης 2 ψευδοεξόνια (ψ1, ψ2), ομόλογα με τα εξόνια 2, 3 στον άνθρωπο, όπως και οι επαναληπτικές αλληλουχίες 1,2 που δεν υπάρχουν στον άνθρωπο. (Sullivan, Taniguchi, Jhee, Kerr, & Reeve, 1999)

Επιγενετική ρύθμιση του *IgfII*

Ο *IgfII*, είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην εμβρυική ανάπτυξη και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του πλακούντα. Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα γονίδια, που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του πλακούντα (*Egfr*, *Mash2*), ο *IgfII* ακολουθεί το πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης (genomic imprinting). Πρόκειται για μια επιγενετική διαδικασία που περιλαμβάνει τη μεθυλίωση του DNA και τροποποίηση ιστονών. Αυτές οι επιγενετικές αλλαγές εντυπώνονται στη γενετική γραμμή των γονέων και διατηρούνται μέσω μιτωτικών κυτταρικών διαιρέσεων στα σωματικά κύτταρα του οργανισμού. Η γονιδιακή αποτύπωση ρυθμίζεται από τον επιγενετικό μηχανισμό μεθυλίωσης των βάσεων κυτοσίνης των CpG νησίδων του ενός εκ των δύο αλληλόμορφων του γονιδίου και την αναστολή έκφρασής του. Το αλληλόμορφο του γονιδίου που εκφράζει τη γενετική πληροφορία εξαρτάται από τη

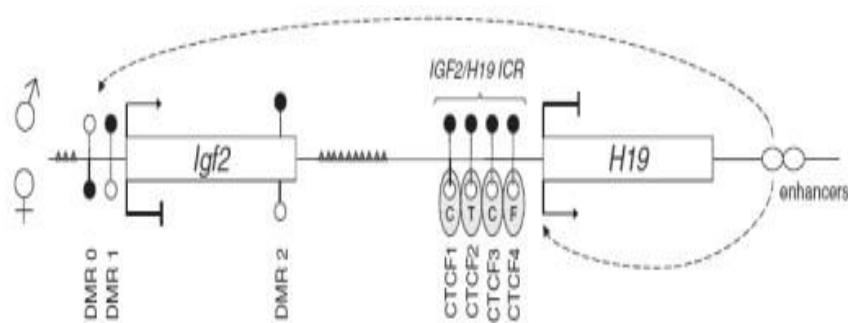
γονεϊκή του προέλευση. Ο μηχανισμός της γονιδιακής αποτύπωσης είναι αναστρέψιμος, έτσι ώστε διαγράφεται (απομεθυλίωση) και εγκαθίσταται εκ νέου (μεθυλίωση) κατά τη γαμετογένεση και διατηρείται κατά τον ίδιο τρόπο μετά τη γονιμοποίηση. Τα αποτυπωμένα γονίδια αντιπροσωπεύουν περίπου το 1% των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Συγκεντρώνονται κατά ομάδες σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές και η έκφρασή τους βρίσκεται υπό τον έλεγχο του κέντρου μεθυλίωσης (imprinting center, IC) (Pfeifer, 2000). Έχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση, ανάπτυξη και βιωσιμότητα του οργανισμού. Διαταραχές του μηχανισμού της γονιδιακής αποτύπωσης δεν ακολουθούν τη μενδέλεια κληρονομικότητα και σχετίζονται με αναπτυξιακές και νευροαναπτυξιακές διαταραχές, καθώς και με την καρκινογένεση. Τα πρώτα νοσήματα στα οποία παρατηρήθηκε διαταραχή του μηχανισμού της γονιδιακής αποτύπωσης στον άνθρωπο περιλαμβάνουν το σύνδρομο Prader-Willi και το σύνδρομο Angelman (DeChiara et al., 1991).

Στην περίπτωση του IGFII, το μητρικής προέλευσης γονίδιο *IgfII* εντυπώνεται, δηλαδή, το μητρικό αλληλόμορφο έχει αποσιωπηθεί, λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων και δεν επιδρά στην ανάπτυξη των εμβρύων σημαντικά, έτσι στους απογόνους που προκύπτουν τα μόνα αλληλόμορφα που είναι ενεργά είναι αυτά της πατρικής προέλευσης, ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης του μειώνονται δραματικά μετά τη γέννηση. Σε ενήλικα ποντίκια, *IgfII* μετάγραφα είναι ανιχνεύσιμα μόνο στον εγκέφαλο, συγκεκριμένα στο χοριακό πλέγμα και στη λεπτή μήνιγγα, όπου η έκφραση του εξαρτάται από τη μεταγραφή και την ενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων του (Stylianopoulou, Herbert, Soares, & Efstratiadis, 1988), (Stylianopoulou, Efstratiadis, Herbert, & Pintar, 1988). Στον άνθρωπο, ο *IgfII* εντυπώνεται, αλλά η έκφρασή του είναι διααλληλική και στο χοριακό πλέγμα και στη λεπτή μήνιγγα αλλά και στον αμφιβληστροειδή. Εκφράζεται φυσιολογικά στους ενήλικες και τα μετάγραφα του προκύπτουν από ένα ενήλικο-ειδικό εκκινητή (adult specific promoter), η αντίστοιχη περιοχή στο ποντίκι, αποτελείται από δύο ψευδοεξόνια, ως κατάλοιπα του συγκεκριμένου εκκινητή, δίνοντας μια εξήγηση για τη κατακόρυφη μείωση των επιπέδων έκφρασης του *IgfII*, μετά τη γέννηση στα ποντίκια, αλλά όχι στον άνθρωπο (Hynes, Brooks, Van Wyk, & Lund, 1988).

Όσον αφορά την αποσιωποποίηση του *IgfII*, ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για αυτή, οφείλεται στην περιοχή του κέντρου μεθυλίωσης (ICR), η οποία βρίσκεται κοντά στον εκκινητή του *H19* και ονομάζεται και DMR (differentially methylated region), πρόκειται για αλληλουχίες DNA πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη, με τα μόρια της κυτοσίνης μεθυλιωμένα στο ένα από τα δύο αντίγραφα (Ohlsson, Hedborg, Holmgren, Walsh, & Ekstrom, 1994; Sasaki, Ishihara, & Kato, 2000). Η περιοχή αυτή, περιλαμβάνει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης δέσμευσης CTCF (CCCTC), μια πρωτεΐνη "μονωτής", η οποία οριοθετεί τις ενεργές και μη ενεργές περιοχές της χρωματίνης. Με τη μεθυλίωση των βάσεων κυτοσίνης των CpG νησίδων του ενός εκ των δύο αλληλόμορφων εμποδίζεται η πρόσδεση του CTCF παράγοντα. Ενώ στο πατρικό χρωμόσωμα, η περιοχή DMR/ICR μεθυλιώνεται, ο

παράγοντας CTCF αποκλείεται και οι ενισχυτές επιδρούν στον εκκινητή του *IgfII*. (Bell & Felsenfeld, 2000). Αντίθετα, στο μητρικό χρωμόσωμα ο παράγοντας CTCF, δημιουργεί ένα μονωτή της χρωματίνης και εμποδίζει την αλληλεπίδραση ενισχυτών και εκκινητών, απενεργοποιώντας τον *IgfII* και ενεργοποιώντας την έκφραση του *H19*. Όταν γίνεται στοχευμένη διαγραφή (knockout) του *IgfII* γονιδίου στο ενεργό πατρικό αλληλόμορφο, τα έμβρυα κληρονομούν μόνο το ανενεργό μητρικό αλληλόμορφο, με αποτέλεσμα να γεννιούνται καχεκτικά. (Constancia et al., 2002; DeChiara et al., 1991) Αντίθετα υπερέκφραση του IGFII, που επιτυγχάνεται με διαγραφή του *H19*, διαταραχή του ανασταλτικού *IgfIIr*, οδηγεί σε υπερανάπτυξη του εμβρύου και δυσμορφίες με χαρακτηριστικά που μοιάζουν με το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (BWS). (Sullivan et al., 1999)

Εικόνα 1.4. Σχηματική απεικόνιση της περιοχής *IgfII/H19*



Το πατρικό αλληλόμορφο βρίσκεται στην κορυφή, ενώ το μητρικό αλληλόμορφο κάτω. Τα κέντρα μεθυλίωσης απεικονίζονται με τους κύκλους. Ο μαύρος κύκλος απεικονίζει ένα μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, ενώ ο άσπρος, ένα τυπικό μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο (Ohlsson et al., 1994).

Η γονιδιακή αποτύπωση και η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, αποτελούν τους πιο καλά μελετημένους μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης. Η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, συμβαίνει τυχαία και οδηγεί στην αποσιώπηση του μητρικού ή του πατρικού X χρωμοσώματος. Το X χρωμόσωμα που αποσιωπάται κάθε φορά, εκφράζει ένα μη-κωδικοποιημένο *Xist* RNA, το οποίο καλύπτει το χρωμόσωμα και μεσολαβεί στην αποσιώπηση του. Όπως και στην περίπτωση του *IgfII/H19* ζεύγους, ο παράγοντας CTCF ελέγχει και την περιοχή *Xist/Tsix*, που ελέγχεται από την περιοχή του κέντρου αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος, σε συνδυασμό με τον YY1 (yin yang 1) μεταγραφικό παράγοντα, οι οποίοι εκφράζονται συνεχώς και ελέγχουν τη λειτουργία αυτών των μηχανισμών αυτών (Thorvaldsen, Verona, &

Bartolomei, 2006). Η αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος μπορεί να έχει και άλλες επιπτώσεις για τη ρύθμιση του IGFII / H19. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μη-κωδικά, αντι-νοηματικά RNA ρυθμίζουν την αλληλόμορφο-ειδική έκφραση του γονιδίου του *IgfII*. Πολλαπλά νοηματικά και αντινοηματικά μετάγραφα έχουν ανιχνευθεί στην 5' περιοχή του *IgfII*, και το κύριο αντινοηματικό μετάγραφο, IgfIIAS (antisense RNA), εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο. Ένα αντινοηματικό μήνυμα μεταγράφεται από μια ομόλογη περιοχή κοντά στον ανθρώπινο IGFII, κωδικοποιώντας μια υποθετική πρωτεΐνη 273 αμινοξέων αγνώστου λειτουργίας, έτσι παραμένει ασαφές αν ο IGFIIAS ρυθμίζει την αποτύπωση του IGFII ή H19 (J. T. Lee, Davidow, & Warshawsky, 1999). Παρ' όλα αυτά, μπορεί να έχει βιολογική σημασία. Στους όγκους Wilms, ο IGFIIAS εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και οδηγεί σε σποραδική απώλεια της αποτύπωσης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, διαταράσσεται η αποτύπωση του IGFII και εμπλέκεται σε έναν αριθμό ασθενειών και μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένη δοσολογία του γονιδίου και επακόλουθες αλλαγές της σηματοδότησης του IGFII (J. T. Lee et al., 1999).

Η εμβρυική ανάπτυξη ποντικών, όπως προαναφέρθηκε, διέπεται σε μεγάλο βαθμό από τον IGFII. Όταν μια στοχευμένη διαγραφή *IgfII* γίνεται στο ενεργό πατρικό αλληλόμορφο, τα έμβρυα του ποντικού κληρονομούν μόνο το ανενεργό μητρικό αλληλόμορφο και γεννιούνται καχεκτικά. Αντίθετα, υπερέκφραση του *IgfII*, επιτυγχάνεται με την διατάραξη του ανασταλτικού υποδοχέα *IgfIIr*, με τη διαγραφή του *H19*, ή με διαενεργοποίηση του *IgfII*, οδηγώντας σε υπερανάπτυξη του εμβρύου και δυσμορφίες με χαρακτηριστικά που μοιάζουν με το σύνδρομο Beckwith - Wiedemann (Baker, Liu, Robertson, & Efstratiadis, 1993), (J. T. Lee et al., 1999).

1.5.Υποδοχείς των ινσουλινοειδικών αυξητικών παραγόντων (IGFIR, IGFIIIR)

Η μιτωτική δραστηριότητα των IGF I και IGFII εξαρτάται από ειδικούς υποδοχείς που ονομάζονται IGF R. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από γλυκοπρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης των κυττάρων και μέλη της οικογένειας των τυροσίνη – κινάση υποδοχέων (Stull & Wood, 2003). Η μιτογόνο επίδραση του IGF I και του IGFII μεσολαβείται κατά κύριο λόγο μέσω πρόσδεσης στον IGF I υποδοχέα (IGF-IR), ενώ οι επιδράσεις της ινσουλίνης μετά από πρόσδεση με τον δικό της ειδικό υποδοχέα (IR-insulin receptor). Μεταξύ των δύο συστημάτων υπάρχει έντονη επικοινωνία, όχι μόνο λόγω της σημαντικής δομικής ομοιότητας μεταξύ των IGF μορίων και της ινσουλίνης αλλά και μεταξύ του IGFIR και του IR. Και οι δύο υποδοχείς IGFIR και IR είναι γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας και μέλη των υποδοχέων κινάσης- τυροσίνης (LeRoith, Werner, Beitner-Johnson, & Roberts, 1995; Nakae,

Kido, & Accili, 2001). Οι IGFs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον IR, με μικρότερη, ωστόσο, συγγένεια σε σχέση με την ινσουλίνη. Ο IGF-II δεσμεύεται στον IR με μεγαλύτερη συγγένεια σε σύγκριση με τον IGF-I, αλλά συνδέεται με τον IGF-IR με παρόμοια συγγένεια σε σχέση με τον IGF-I (Juul, 2003). Οι IGF-I, IGF-II και η ινσουλίνη μετά την πρόσδεση τους στον υποδοχέα IGF-IR, ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μεταγωγικά μονοπάτια που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την μετανάστευση και προστατεύουν από την απόπτωση. Αρχικοί στόχοι φωσφορυλίωσης του IGF-IR είναι οι IRS (insulin receptor substrate-1 πρωτεΐνες, ενώ προς τα κάτω σηματοδοτικά μόρια είναι τα μόρια Ras, Raf, η φωσφατιδυλοϊνositόλη 3-κινάση (PI3-kinase), AKT, TOR, S6 κινάση και η MAP κινάση (Denley et al., 2005). Η ενεργοποίηση της PI3-kinase, μπορεί να οδηγήσει σε αντι-αποπτωτικά σήματα και στοιχεία αυτού του μονοπατιού, τα οποία ενισχύονται ή μεταλλάσσονται στους διάφορους τύπους καρκίνου.

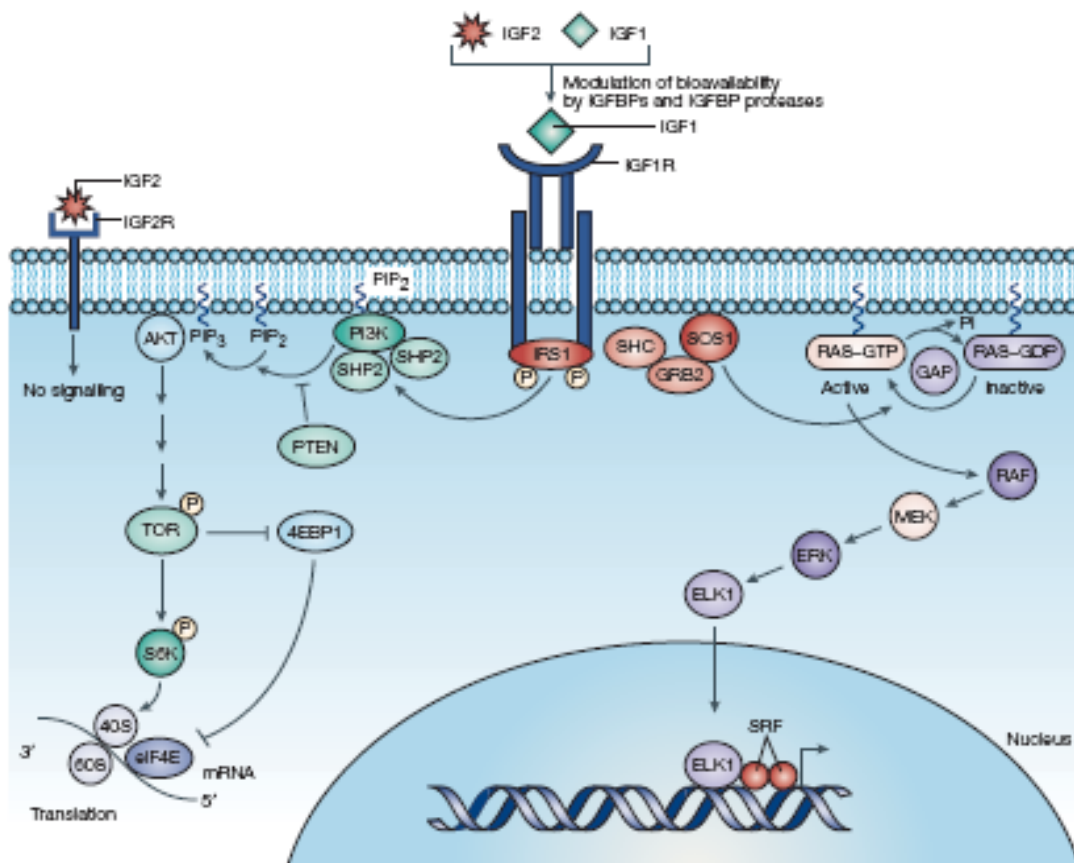
Ο IGFIR είναι μια ετεροτετραμερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από δύο α υπομονάδες που διαπερνούν την μεμβράνη και δύο ενδοκυττάρια β υπομονάδες. Οι α υπομονάδες περιέχουν τις θέσεις που προσδένεται ο IGF-I και συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι β υπομονάδες περιέχουν μια διαμεμβρανική περιοχή, μια θέση πρόσδεσης ATP και μια περιοχή με δράση κινάσης τυροσίνης, η οποία συνιστά τον μηχανισμό μετάδοσης σήματος για τον υποδοχέα (Cohen, 2006). Το IGF-1R γονίδιο χαρτογραφείται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 15.

Ο IGFII έχει τον δικό του ειδικό υποδοχέα, IGFIIR, που είναι μια μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία δεν έχει ενδογενή δραστηριότητα σηματοδότησης. Δρα ως αρνητικός ρυθμιστής αφού λειτουργεί ως παράγοντας κάθαρσης για τον IGF-II μέσω εσωτερίκευσης και αποικοδόμησης της κυτταρικής επιφάνειας που έχει συνδεθεί ο IGF-II. Δεν φέρει δομική ομολογία με τον IGF-IR και μπορεί να προσδεθεί ο IGF-II, και η 6-P μαννόζη καθώς επίσης και το ρετινοϊκό οξύ, ενώ ο IGF-I προσδένεται με σημαντικά χαμηλότερη συγγένεια και η ινσουλίνη δεν προσδένεται καθόλου (Nielsen, 1992).

Οι περισσότερες δράσεις των ινσουλινοειδών αυξητικών παραγόντων IGF-I και IGFII διεξάγονται μέσω του υποδοχέα IGF-1R. Σε υψηλές συγκεντρώσεις IGF διεγείρεται και ο υποδοχέας της ινσουλίνης. Υποδοχείς-υβρίδια ινσουλίνης/IGFIR σχηματίζονται σε κύτταρα που εκφράζουν και τα δύο αντίστοιχα γονίδια *in vitro*. Αυτοί οι υποδοχείς εμφανίζουν χαρακτηριστικά πρόσδεσης που προσεγγίζουν περισσότερο τον υποδοχέα IGFIR. Ο καταρράκτης των αντιδράσεων που ενεργοποιούνται λόγω φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης του υποδοχέα είναι παρόμοιος τόσο στην περίπτωση του υποδοχέα IGF-1R, όσο και στην περίπτωση του υποδοχέα της ινσουλίνης (IR) (Jones & Clemmons, 1995). Υπάρχουν δύο ισομορφές του IR: η κλασική ισομορφή (IR-B) που ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης, εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, μυϊκό και λιπώδη ιστό και έχει χαμηλή συγγένεια για τους IGFs, καθώς και η ισομορφή B του υποδοχέα, που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 11, εκφράζεται στους εμβρυϊκούς ιστούς και σε κάποιους όγκους και στον οποίο προσδένεται ο IGF-II με αυξημένη συγγένεια για να προάγει τον

πολλαπλασιασμό και για να παρέχει προστασία από την απόπτωση (Riedemann & Macaulay, 2006) .

Εικόνα 1.5. Επισκόπηση της ενεργοποίησης του IGF1-R και της ενδοκυττάριας μετάδοσης σήματος

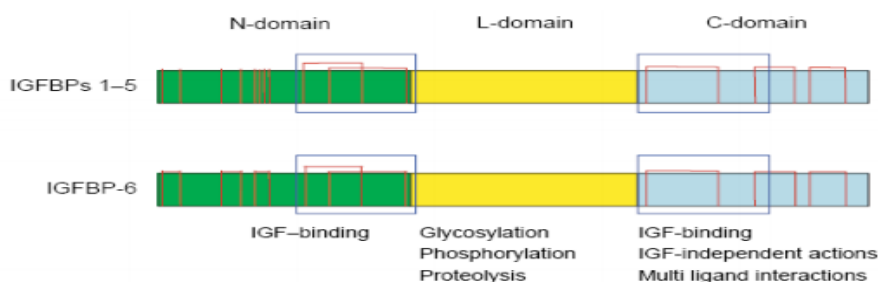


Ο IGFIR είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης που δεσμεύει είτε τον IGF1 είτε τον IGFII. Ο IGFII προσδένεται στον IGFIR, ο οποίος δεν έχει δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης και εμφανίζεται να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού, μειώνοντας το ποσό του IGFII που είναι διαθέσιμο για δέσμευση στον IGFIR. Κατόπιν σύνδεσης του προσδέτη στον IGFIR, ενεργοποιείται η δραστηριότητα της κινάσης της τυροσίνης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυττάριας μετάδοσης σήματος μέσω ενδοκυττάρων δικτύων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση. Κύρια ενδοκυττάρια δίκτυα είναι το PI3K-AKT-TOR και το RAF-MAPK σύστημα. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση (M. Pollak, 2007; M. N. Pollak, 2004).

1.6. Πρωτεΐνες δέσμευσης των ινσουλινοειδικών αυξητικών παραγόντων IGF (IGFBPs)

Η οικογένεια των πρωτεϊνών δέσμευσης IGFBP, αποτελείται από δέκα μέλη IGFBP1-10 και μπορεί να διαιρεθεί σε δύο τουλάχιστον υποομάδες: τις πρωτεΐνες υψηλής συγγένειας IGFBP1-6 και τις πρωτεΐνες χαμηλής συγγένειας IGFBP8-10. Η αλληλεπίδραση των IGF μορίων (IGFI και IGFIΙ) με την οικογένεια των IGF υποδοχέων μπορεί να ρυθμίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά από αυξημένης συγγένειας πρόσδεση στο εξωκυττάριο υγρό με μια οικογένεια έξι ειδικών IGFBPs (IGFBP1- 6) , που έχουν διαφορετική συγγένεια για τον IGFI και IGFIΙ (Denley et al., 2005). Στους ενήλικες, το 90% των IGF μορίων, προσδένονται στις IGFBP-3 πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση του IGF-II στο πλάσμα είναι 10-100 φορές μεγαλύτερη, λόγω της αυξημένης συγγένειας πρόσδεσης με τις IGFBP1-6 πρωτεΐνες. Κάθε IGFBP περιλαμβάνει 216-289 αμινοξέα που οργανώνονται σε τρία τμήματα με περίπου ίσο μέγεθος, με τις αμινοτελικές (N-) και καρβοξυτελικές (C-) περιοχές να είναι συνδεδεμένες με έναν «συνδέτη» L-τμήμα (L. A. Bach, Headey, & Norton, 2005). Οι IGFBP1- 6 έχουν μεγάλη ομοιότητα στην πρωτοταγή τους δομή (ομοιότητα περίπου 30 έως 40%), με τον μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης στην αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή. Συντηρημένο δομικό χαρακτηριστικό και των έξι IGFBPs είναι ο αυξημένος αριθμός κυστεϊνών (16-20 κυστεΐνες), συγκεντρωμένες στο αμινοτελικό άκρο και σε μικρότερη έκταση στο καρβοξυτελικό άκρο (Baxter et al., 1998).

Εικόνα 1.6. Δομική οργάνωση των IGFBPs



Οι IGFBPs έχουν τρεις περιοχές, κάθε μία από τις οποίες συνεισφέρει στις ιδιότητες τους. Οι κυστεΐνες σημειώνονται ως κόκκινες κάθετες γραμμές, ενώ οι δισουλφιδικοί δεσμοί ως κόκκινες οριζόντιες γραμμές. Οι περιοχές των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τμημάτων που συμμετέχουν στην πρόσδεση των IGFs εσωκλείονται σε μπλε κουτιά. (L. A. Bach et al., 2005).

Έχουν προταθεί τέσσερις βασικές λειτουργίες των IGFBPs, βασικές για τη ρύθμιση των βιολογικών δράσεων των IGF: δρουν ως πρωτεΐνες-μεταφορείς των IGF στο πλάσμα και ελέγχουν την έξοδό τους από τα αγγεία, παρατείνουν τον χρόνο ημιζωής των μορίων και ρυθμίζουν τον μεταβολισμό τους, εξασφαλίζουν την ιστοειδική εντόπιση των IGF. Επιπλέον ρυθμίζουν, διαμορφώνουν και συντονίζουν τις αλληλεπιδράσεις των IGF με τους υποδοχείς τους, ελέγχοντας έμμεσα τις βιολογικές τους δράσεις. Η αποδόμησή τους γίνεται μέσω συγκεκριμένων πρωτεασών.

Οι IGFBPs αναστέλλουν τις δράσεις των IGF *in vivo* και *in vitro* αποτρέποντας την δέσμευση των IGF στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, αλλά κάποιες επίσης ενισχύουν τις δράσεις των IGF σε ορισμένες καταστάσεις. Παρόλο που οι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, διάφοροι παράγοντες, όπως διαφορική εντόπιση των πρωτεϊνών δέσμευσης (π.χ. σύνδεση με την κυτταρική επιφάνεια ή την εξωκυττάρια ουσία) ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ. φωσφορυλίωση), μεταβάλλουν τη συγγένεια των IGFBP για τα αντίστοιχα μόρια IGF και κατά συνέπεια, μπορούν να διαφοροποιούν τις βιολογικές δράσεις των IGF (Clemmons, 1997).

1.7. Βιολογικές δράσεις των IGFs

Ο IGF-I διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, αλλά ασκεί κι άλλες δράσεις που δε σχετίζονται άμεσα με την κυτταρική αύξηση (Allen & Boxhorn, 1989; Froesch & Zapf, 1985; Kurtz et al., 1988; Zapf & Froesch, 1986). Ο IGF-II επιδρά σημαντικά στον εμβρυικό αναβολισμό, εξαρτώμενος από τη διαθεσιμότητα ινσουλίνης και θρεπτικών. Η δράση του επάγεται από την κορτικοτροπίνη-αυξητική ορμόνη του πλακούντα και από τις υψηλές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου και του mRNA του *in utero*. Οι βιολογικές δράσεις των πεπτιδίων πραγματοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασης των μορίων με τον IGF1R υποδοχέα, της κυτταρικής μεμβράνης που δρα ως κινάση της τυροσίνης και εμφανίζει δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με τον υποδοχέα της ινσουλίνης (Ullrich et al., 1986).

In vitro δράσεις: Οι υποδοχείς IGF-1R εντοπίζονται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και μέσω αυτών ασκούνται οι περισσότερες δράσεις των IGF-1 και IGF-II *in vitro*, καθώς και της ινσουλίνης, όταν αυτή βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε γενικές γραμμές, οι ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες εμπλέκονται στις λειτουργίες του μεταβολισμού (των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων), του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (Cohick & Clemmons, 1993) (Sara & Hall, 1990).

1. Επιδράσεις στην πορεία του κυτταρικού κύκλου. Μελέτες έχουν δείξει την επίδραση των μορίων των IGF στη σύνθεση DNA (αντιγραφή). Έχει διαπιστωθεί ότι ο IGFΙ συμβάλλει στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου εισέρχονται στη φάση G1 υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων PDGF (Platelet-derived growth factor) και του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών FGFII (Fibroblast growth factor-II). Η κατεργασία των κυττάρων με IGFΙ και έναν από τους παραπάνω παράγοντες επιτρέπει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα τη σύνθεση DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο κυτταρικός μηχανισμός μετάδοσης σήματος που ενεργοποιείται παρουσία του IGF-1 περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Ras (Lu & Campisi, 1992).
2. Επιδράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο IGFΙ δρα ως μιτογόνος παράγοντας διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών τύπων, όπως ινοβλαστών, χονδροκυττάρων, οστεοβλαστών, κυττάρων του νευρικού συστήματος, λείων και σκελετικών μυϊκών κυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων, ωοκυττάρων και άλλων, καθώς και αρκετών καρκινικών κυτταρικών σειρών (Cohick and Clemmons, 1993; Sara and Hall, 1990).
3. Επιδράσεις στον κυτταρικό θάνατο. Συμπληρωματική της δράσης των IGF στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι η ικανότητά τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, όσο και σε καταστάσεις στρες ή ασθενειών (Vincent & Feldman, 2002). Η λειτουργία των IGF ως αναστολείς του κυτταρικού θανάτου έχει καλά μελετηθεί σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Στα κύτταρα αυτά ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής τους υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων (Williams et al., 1990). Στα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς του ανθρώπινου οργανισμού η διανουκλεοσωμική διάσπαση του DNA (χαρακτηριστικό του μηχανισμού της απόπτωσης), λόγω απουσίας ορού από το θρεπτικό μέσο, καταστέλλεται από τον IGFΙ (Muta and Krantz, 1993). Παρ' όλα αυτά, δεν είναι γνωστό αν οι αντιαποπτωτικές δράσεις του IGFΙ πραγματοποιούνται μόνο μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα IGFIR, αφού οι συγκεντρώσεις του IGFΙ που χορηγούνται δεν αποκλείουν και την ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης. Η κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών μέσω των οποίων ο IGFΙ ενισχύει την κυτταρική επιβίωση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων στην κλινική ιατρική.
4. Επιδράσεις στην κυτταρική διαφοροποίηση. Οι ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες IGFΙ και IGFII προάγουν τη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων, όπως μυοβλαστών (Florini & Magri, 1989), οστεοκλαστών (Mochizuki, Sakai, & Iwashita, 2006), (Mochizuki et al., 1992), χονδροκυττάρων (Geduspan, Padanilam, & Solursh, 1993), κυττάρων του νευρικού συστήματος (Pahlman, Meyerson, Lindgren, Schalling, & Johansson, 1991) και άλλων (Sara & Hall, 1990).

5. Επιδράσεις στην κυτταρική λειτουργία. Σε πολλούς ιστούς (ωοθήκες, κύτταρα Leydig, θύμος αδένας, κ.ά.) η ορμονική έκκριση ρυθμίζεται από τους ινσουλινοειδείς αυξητικούς παράγοντες IGF. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Αξίζει να σημειωθεί η συμμετοχή των IGF στον κυτταρικό μεταβολισμό και κυρίως στις αναβολικές διαδικασίες. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται στις μεταβολικές δράσεις των IGF μπορεί να διαφέρουν απ' αυτούς που λαμβάνουν χώρα στις περιπτώσεις που οι IGF δρουν ως μιτογόνοι παράγοντες (McClain, 1990). Στα περισσότερα κύτταρα με λειτουργικούς υποδοχείς IGFIR, οι IGFs διεγείρουν την πρόσληψη αμινοξέων και γλυκόζης και τη σύνθεση πρωτεϊνών. Στα χονδροκύτταρα, στους οστεοβλάστες, στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο IGF-1 ενισχύει τη σύνθεση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, κυρίως κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών (Hill & Logan, 1992; Trippel et al., 1989).

6. In vivo δράσεις: Οι IGF παράγοντες συντίθενται στους περισσότερους ιστούς, δρουν με παρακρινή και αυτοκρινή τρόπο και ρυθμίζονται από ποικίλους τοπικούς και ενδοκρινείς παράγοντες (Fernandez et al., 2001). Όσον αφορά τον IGF1, η έκφρασή του είναι είτε εξαρτώμενη από την ορμόνη ανάπτυξης GH (Growth hormone) είτε ανεξάρτητη, π.χ. στη μήτρα, τα οιστρογόνα φαίνεται να ελέγχουν τη σύνθεση του πεπτιδίου (Baker et al., 1993), (Murphy et al., 1987). Η ρύθμιση της έκφρασης του IGFII είναι βασικά ανεξάρτητη της GH. Τόσο ο IGF1 όσο και ο IGFII εκφράζονται κυρίως από κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης στους περισσότερους ιστούς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Han, Lund, Lee, & D'Ercole, 1988), περίοδο κατά την οποία η έκφρασή τους είναι ανεξάρτητη της GH. Τα επίπεδα των ινσουλινοειδικών αυξητικών παραγόντων στον ορό κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι πολύ χαμηλότερα απ' ότι στη μεταγεννητική ζωή (Daughaday & Rotwein, 1989), οπότε η συγκέντρωση του IGF1 εξαρτάται πλέον από την GH. Έχουν μελετηθεί επιδράσεις της χορήγησης του IGF1 σε ζώα και στον άνθρωπο, επιδράσεις της υπερέκφρασης του IGF1 σε διαγονιδιακά ζώα, καθώς και επιδράσεις μηδενικών (null) μεταλλάξεων των IGF και των υποδοχέων τους (Jones & Clemmons, 1995). Η πιο καλά μελετημένη λειτουργία των IGF αφορά την ικανότητά τους να διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συμπληρωματική της λειτουργίας αυτής, είναι η δράση των IGF ως αναστολείς του κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, οι παράγοντες IGF προάγουν τη διαφοροποίηση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (Yao et al., 2008). Η εμβρυϊκή ανάπτυξη ποντικών, καθορίζεται κυρίως από την παρουσία του IGFII.

1.8. ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η ανάπτυξη ορίζεται ως η αύξηση στο μέγεθος. Αναφερόμαστε σε ένα κύτταρο ή σε έναν πληθυσμό κυττάρων (πολυκυτταρικός οργανισμός ή μια καλλιέργεια κυττάρων). Ωστόσο, από την άποψη ενός μόνο κυττάρου, η ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός είναι αντίθετες έννοιες. Ένα κύτταρο αναπτύσσεται πρώτα (διπλασιάζεται σε μέγεθος, με το διπλασιασμό των συστατικών του) και στη συνέχεια χωρίζεται σε δύο θυγατρικά κύτταρα που ακολουθούν τα ίδια βήματα. Ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις υπάρχουν και σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα μπορούν επίσης να αναπτυχθούν χωρίς διαίρεση (υπερτροφία), από την άποψη ολόκληρου του οργανισμού (Snow, 1981a). Από την άλλη πλευρά, η αύξηση επιτυγχάνεται κυρίως από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αν και δευτερογενή εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και υπερτροφία των συγκεκριμένων ιστών σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο είναι σημαντική (Snow, 1981b). Παρατηρείται επίσης, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων χωρίς ανάπτυξη, κυρίως στα στάδια διάσπασης της πρώιμης εμβρυογένεσης. Είναι ίσως σημαντικό να τονιστεί ότι οι πολύ μικρές αυξήσεις ή μειώσεις στο χρονοδιάγραμμα των κυτταρικών διαιρέσεων έχουν μεγάλες επιπτώσεις στην ανάπτυξη. Η σημασία της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου γίνεται αμέσως προφανής από έναν απλό υπολογισμό (Snow & Bennett, 1978). Υποθέτοντας ότι παρατηρείται μόνο μια 10 % διαφορά στο διπλασιασμό του χρόνου ανάμεσα σε δύο καλλιέργειες κυττάρων που πολλαπλασιάζονται με γεωμετρική πρόοδο, αντιλαμβανόμαστε ότι, μετά από μόλις επτά μιτωτικές διαιρέσεις, θα υπάρχει μια διαφορά δυο φορές σε κυτταρικούς αριθμούς.

Η ανάπτυξη των θηλαστικών, επηρεάζεται κυρίως από γεγονότα πολλαπλασιασμού, προκαλώντας όχι μόνο αύξηση στο συνολικό αριθμό των κυττάρων, που οδηγεί σε κυτταρική υπερτροφία και υπερτερεί της απόπτωσης αλλά και εναπόθεση επιπλέον εξωκυττάριας στρώματος. Κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ποντικού, η ανάπτυξη ξεκινάει κατά την εμβρυογένεση (στο στάδιο της βλαστοκύστης) και διαρκεί μέχρι να φτάσει στους 4-5 μήνες ζωής, (το στάδιο μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης), όπου το μέγεθος του είναι περίπου 30 γραμμάρια. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διάρκεια ζωής ενός ποντικού είναι 2-3 χρόνια.

Οπότε, αν και το έμβρυο ποντικού αυξάνεται με υψηλότερο ρυθμό από ό,τι το ανθρώπινο έμβρυο και φθάνει, για παράδειγμα, σε βάρος 1 g τρεις φορές πιο γρήγορα (17,5 έναντι 55 ημέρες, (Adolph, 1970)), το ανθρώπινο νεογέννητο είναι πολύ μεγαλύτερο λόγω της σημαντικά μεγαλύτερης περιόδου της ενδομήτριας ζωής (280 έναντι 19 ημερών). Εκτός από το πρότυπο ανάπτυξης, εντοπίζονται και άλλες διαφορές μεταξύ αυτών των δύο ειδών: Η σειρά εμφάνισης ισοδύναμων σταδίων των διαφόρων εμβρυϊκών δομών δεν είναι αυστηρά αντίστοιχη, και δεν υπάρχει απλή αναλογία ως προς το ρυθμό ανάπτυξης. Στην πραγματικότητα, στη σύγκριση μεταξύ εμβρύων ποντικού και ανθρώπου, φαίνεται ότι οι ηλικίες της αναπτυξιακής ισοδυναμίας δεν μπορούν να συσχετιστούν με την εκατοστιαία αναλογία του χρόνου

κύησης (Otis & Brent, 1954). Αυτό αντικατοπτρίζεται στον βαθμό ωριμότητας ,που έχει αποκτήσει το έμβρυο κατά τη στιγμή της γέννησης . Μια σύγκριση των δεικτών δείχνει ότι , τα ποντίκια γεννήθηκαν κατ'ουσίαν σε μια «εμβρυϊκή» κατάσταση με τα παρακάτω χαρακτηριστικά (έλλειψη της γούνας, χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια του σώματος, συντηγμένα βλέφαρα, κ.λ.π.), ενώ τα ανθρώπινα νεογέννητα είναι περισσότερο ώριμα. Φυσικά, οι διαφορές στα πρότυπα της ανάπτυξης και ωρίμανσης εξακολουθούν να υφίστανται και μετά τη γέννηση.

1.8.1. Ο ρόλος των IGFs στην εμβρυϊκή ανάπτυξη

Ενώ οι αυξητικοί παράγοντες παράγονται από πολλούς ιστούς και ασκούν τοπική (αυτοκρινή / παρακρινή) δράση, οι ορμόνες αποτελούν μεγάλης εμβέλειας σήματα που δρουν μακριά από τις περιοχές παραγωγής τους. Η διάκριση αυτή ωστόσο, φαίνεται να είναι τεχνητή σε κάποιο βαθμό, δεδομένου ότι οι αυξητικοί παράγοντες είναι επίσης παρόντες στην κυκλοφορία και μπορούν να παίζουν ρόλους ανάλογους με εκείνους των κλασσικών ορμονών. Παρ'όλα αυτά, υπάρχει μια ενδιαφέρουσα διαφορά μεταξύ της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής ανάπτυξης ως προς το βαθμό της εμπλοκής αυτών των δύο τύπων σημάτων. Η μεταγεννητική ανάπτυξη ελέγχεται από ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες. Από την άλλη πλευρά, οι αυξητικοί παράγοντες είναι σίγουρα οι κυρίαρχοι παράγοντες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Για παράδειγμα, η απουσία των IGFs θέτει σε κίνδυνο την εμβρυϊκή ανάπτυξη τόσο σε ανθρώπους όσο και ποντίκια. Αντίθετα, η απουσία της δράσης της αυξητικής ορμόνης σε μεταλλαγμένα ζώα ή η πειραματική εκτομή της υπόφυσης δεν εμποδίζει την κανονική προγεννητική ανάπτυξη. Το ίδιο ισχύει και για τους ανθρώπους (σε έμβρυο, στο οποίο λείπει μια υπόφυση, έχει το σύνηθες βάρος γέννησης) (Efstratiadis, 1998).

Υπάρχουν διαφορές , ωστόσο , μεταξύ ανθρώπου και ποντικού σε άλλες ορμονικές επιρροές, και η υπόθεση της ινσουλίνης αποτελεί σημαντικό παράδειγμα. Ανενεργή δράση της ινσουλίνης, είτε λόγω απουσίας ινσουλίνης, είτε λόγω έλλειψης του λειτουργικού υποδοχέα ινσουλίνης (IR) κατά τη διάρκεια ανθρώπινης εμβρυϊκής ανάπτυξης οδηγεί σε σοβαρή έλλειψη ανάπτυξης, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρείται σε ποντικούς (Louvi et al.,1997).

Σε πολλά είδη, τα γονίδια του *Igf1* και του *IgfII* εκφράζονται σε εμβρυϊκούς ιστούς από το αρχικό στάδιο ανάπτυξης, την προ-εμφύτευση ως στην τελική φάση της ωρίμανσης του ιστού, ακριβώς πριν τη γέννηση. (Watson et al., 1994;, (Hill, Petrik, & Arany, 1998) Fowden, Li and Forhead, 1998). Κατά τη διάρκεια, έως τα τέλη της

κύησης, η έκφραση του γονιδίου του *IgfII* είναι άφθονη στους ιστούς του εμβρύου σε σχέση με το γονίδιο *IgfI* στο ποντίκι και στον άνθρωπο (Hill, 1990; Delhanty and Han, 1993). Και οι δύο IGFs ανιχνεύονται στην κυκλοφορία του εμβρύου από την αρχή της κύησης, αλλά οι συγκεντρώσεις του IGF-II στο πλάσμα είναι 3-10 φορές υψηλότερες από ό,τι εκείνες του IGF-I κατά το τέλος της κύησης, σε όλες τις μελέτες μέχρι στιγμής. Στους ιστούς και στο πλάσμα ο IGF-II είναι επίσης μεγαλύτερος στα έμβρυα σε σχέση με τα νεογέννητα ή ενήλικα ζώα στα περισσότερα είδη (DeChiara et al., 1991; Gluckman, Johnson-Barrett, Butler, Edgar, & Gunn, 1983; Mesiano et al., 1987). Στο ποντίκι, η έκφραση του IGFII ελαττώνεται σημαντικά στους περισσότερους ιστούς, κυρίως σε ορισμένους περιφερικούς ιστούς, όπως αυτούς των σκελετικών μυών εκτός από τον εγκέφαλο (χοριακό πλέγμα, λεπτομήνιγγα) μετά τη γέννηση και κυρίως κατά τη διάρκεια του απογαλακτισμού, με συνέπεια ο IGF -II να είναι σχεδόν ανιχνεύσιμος στο πλάσμα ενηλίκων σε σχέση με το έμβρυο (J. E. Lee, Pintar, & Efstratiadis, 1990), (Singh, Rall, & Styne, 1991), (Mesiano et al., 1987). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του IGF1 στους ιστούς και στο πλάσμα του είναι χαμηλά *in utero*, σε σύγκριση με την έκφραση του μετά τον τοκετό (Gluckman et al., 1983), (Mesiano et al., 1987; Singh et al., 1991). Τα επίπεδα του IGF1 στο πλάσμα αυξάνονται ραγδαία μετά γέννηση, κυρίως ως αποτέλεσμα της έναρξης της αυξητικής ορμόνης (GH) που διεγείρεται από την παραγωγή του IGF1 από το ήπαρ (Gluckman et al., 1983), (Gluckman, 1995, Li et al, 1999). Επομένως, η επικράτηση του IGF-II πριν από τη γέννηση και η επικράτηση του IGF1 μετά τη γέννηση, έχει οδηγήσει στην άποψη ότι ο IGFII είναι πρωτίστως υπεύθυνος για την ανάπτυξη του εμβρύου (Gluckman et al., 1983), (Clemmons et al., 1995).

Οι *in vivo* αλληλεπιδράσεις συνδέτη / υποδοχέα IGF και ο ρόλος των IGFs στη σηματοδότηση στην εμβρυϊκή και μεταγεννητική ανάπτυξη, μελετώνται κυρίως με τη τεχνική knock-out των γονιδίων τους και την ανάλυση του φαινοτύπου των εμβρύων που προκύπτει από τις μεταλλάξεις αυτές (DeChiara et al., 1990,1991; Baker et al., 1993,1996; Liu et al.,1993; Ludwig et al., 1996; Eggenschwiler et al., 1997; Louvi et al.,1997).

Απουσία του IGF1, παρατηρείται κάποια καθυστέρηση στην ανάπτυξη των οστών και το βάρος γέννησης, το οποίο κυμαίνεται ~ 60% του φυσιολογικού. Μερικά από αυτά τα νεογνά πεθαίνουν μέσα σε 6 ώρες μετά τη γέννηση για άγνωστους λόγους, αλλά και κάποια, επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωσή τους, ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο. Ωστόσο, η διαφορά στο βάρος τους μειώνεται στο 30% στην ηλικία των δύο μηνών. Τα θηλυκά δεν έχουν ωορρηξία, ενώ τα αρσενικά έχουν χαμηλή τεστοστερόνη και μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων, αν και το σπέρμα τους είναι ικανό να γονιμοποιήσει ένα άγριου τύπου ωάριο *in vitro*.

Ο IGF1 είναι εξίσου σημαντικός για την εμβρυϊκή ανάπτυξη στον άνθρωπο, όπως τεκμηριώνεται από την περιγραφή ενός ασθενή ηλικίας 15 ετών που φέρει μια ομόζυγη μετάλλαξη (εξόνια 4 και 5) του γονιδίου *IGFI* (Neuenschwander et al., 1996). Η μετάλλαξη αυτή εκδηλώνεται με σοβαρή καθυστερημένη εμβρυϊκή και μεταγεννητική ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης και της καθυστερημένης ανάπτυξης

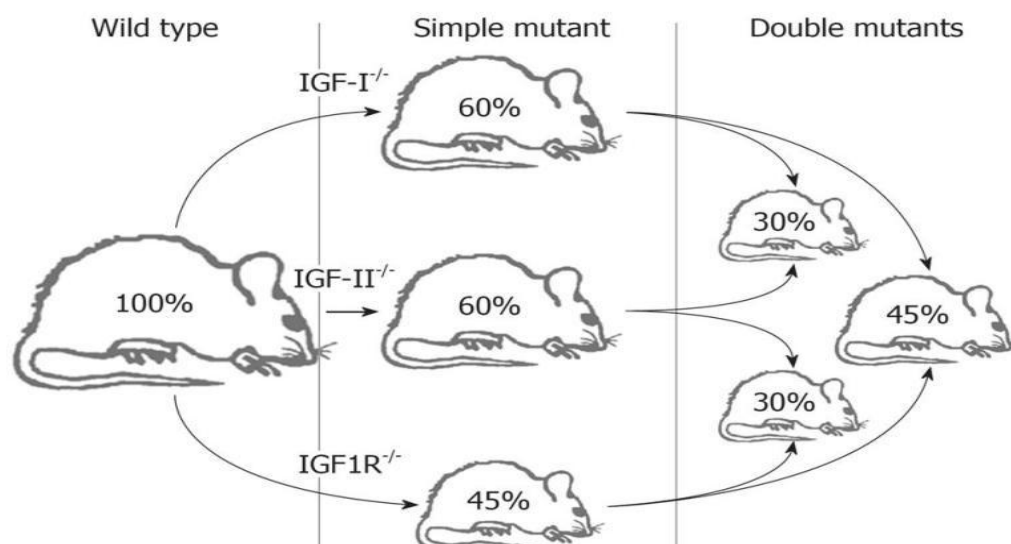
των οστών. Παρά το γεγονός ότι η απουσία του IGF1 κατά την ανάπτυξη του ασθενή (~ 40% βάρος γέννησης σε σχέση με το φυσιολογικό) ήταν σχετικά πιο σοβαρή από ότι των ποντικών με αδρανοποίηση του γονιδίου του *IgfI* (60%), ο συνολικός φαινότυπος είναι χαρακτηριστικά εντυπωσιακά παρόμοιος, εκτός του ότι η ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος προφανώς δεν επηρεάζεται (Neuenschwander et al., 1996), σε αντίθεση με τα μεταλλαγμένα ποντίκια (Baker et al., 1996).

Όσον αφορά τον IGFII, τα ετερόζυγα ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις προερχόμενες από τον πατέρα για το γονίδιο του *IgfII* [*IgfII* (+ / p)] και τα ομόζυγα ποντίκια *IgfII* (- / -) είναι φαινοτυπικά δυσδιάκριτα. Είναι βιώσιμα με ποσοστό ~ 60% του κανονικού σωματικού βάρους κατά τη γέννηση και εκτός από μια μικρή καθυστέρηση στην ανάπτυξη των οστών, δεν παρουσιάζουν αναπτυξιακές ανωμαλίες. Αντιθέτως, όταν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του *IgfII* κληρονομείται από τη μητέρα, ο απόγονος παρουσιάζει φυσιολογικό φαινότυπο, επειδή το μητρικό αλληλόμορφο είναι κανονικά αποσιωπημένο λόγω της γονιδιακής αποτύπωσης (DeChiara et al., 1991).

Κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, η ανάπτυξη του πλακούντα επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία του *IgfII*, αλλά όχι από τον *IgfI* και τον *Igf1R*. (DeChiara, Robertson and Efstratiadis, 1990). Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει την ύπαρξη ενός ακόμη άγνωστου υποδοχέα του πλακούντα. Συγκεκριμένα, απουσία του *IgfII*, παρατηρείται καθυστερημένη ανάπτυξη, περίπου 30-40% και παρουσιάζονται μορφολογικές ανωμαλίες, κυρίως στα β-κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία οδηγούνται σε απόπτωση και ανανεώνονται, μειώνοντας δραστικά τα επίπεδα έκφρασης του *IgfII* (Fowden & Hill, 2001). Αντίθετα, υπερανάπτυξη του πλακούντα, οφείλεται σε υπερέκφραση του *IgfII*, λόγω γονιδιακής αποτύπωσης (Gluckman et al., 1983)(Rossant and Cross, 2001;(Constancia et al., 2002).

Απουσία του γονιδίου του *Igf1r* υποδοχέα εντοπίζεται καθυστερημένη ανάπτυξη και το βάρος των εμβρύων κατά τη γέννηση είναι ~ 45% ,σε σχέση με το φυσιολογικό. Ποντίκια με διπλές μεταλλάξεις, τόσο του *IgfI* όσο και του *Igf1r* δεν διαφέρουν σε φαινότυπο από τα ποντίκια με φαινότυπο *Igf1r* (- / -). Αυτό αποδεικνύει ότι ο IGF-I αλληλεπιδρά αποκλειστικά με τον IGF1R *in vivo*. Αντίθετα, σε διπλές μεταλλάξεις *IgfII*(+ / p-) / *Igf1R* (- / -) ,το βάρος των εμβρύων είναι ~ 30%. Αυτή ήταν η πρώτη γενετική απόδειξη που δείχνει ότι ο IGFII αλληλεπιδρά με τον IGF1R και επίσης με ένα πρόσθετο υποδοχέα, η οποία, όπως αποδεικνύει, είναι ο υποδοχέας της ινσουλίνης .Οι φαινότυποι που προκύπτουν από διπλές μεταλλάξεις (*IgfI* και *IgfII*) ή έλλειψη τόσο του *IgfII* και του *Igf1r* γονιδίου είναι δυσδιάκριτοι, οι επιδράσεις τους στην ανάπτυξη του εμβρύου είναι αθροιστικές και το βάρος τους είναι ~30% του κανονικού σωματικού βάρους (Baker et al., 1993; Liu, Baker, Perkins, Robertson, & Efstratiadis, 1993; Ludwig et al., 1996).

Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης κατά την εμβρυική ανάπτυξη στα ποντίκια, απουσία των παραγόντων του IGF συστήματος, σαν ποσοστό % σε σχέση με το φυσιολογικό βάρος. (Netchine, Azzi, Le Bouc, & Savage, 2011)



Ανάλυση των καμπυλών εμβρυικής ανάπτυξης, δείχνει ότι η ανάπτυξη δεν επηρεάζεται σε οποιοδήποτε μεταλλαγμένο στέλεχος μέχρι την 11η εμβρυϊκή ημέρα (E 11.0). Η απουσία του IGF -II προκαλεί μια ταχεία μείωση του σωματικού βάρους στο 70% σε σχέση με το κανονικό από την εμβρυϊκή ημέρα ανάπτυξης E11.0 - E11.5, στο 60 % του φυσιολογικού κατά τη γέννηση. Η απουσία του IGF-I δεν έχει καμία επίδραση αρχικά : μετά την εμβρυϊκή μέρα 13.5 και στη συνέχεια παρουσιάζεται σταθερή βαθμιαία μείωση στο 60% του κανονικού βάρους μέχρι τη γέννηση. Η προγεννητική έλλειψη ανάπτυξης των ποντικών με απουσία του IGF-I (ή απουσία του υποδοχέα τύπου I), εκτός από την απουσία του IGF-II ήταν πάντοτε περίπου το άθροισμα των ελλείψεων των ποντικών που στερούνται IGF -I και των ποντικών που στερούνται IGF -II. Ο IGF -II έχει δράση 2,5 ημέρες νωρίτερα από ό, τι ο IGF-I (Baker et al., 1993; Efstratiadis, 1998). Ωστόσο, οι επιδράσεις αυτές είναι εμφανείς πολύ αργότερα από το αναμενόμενο, με βάση τις μελέτες που αποδεικνύουν την έκφραση του IGF - II, κατά το στάδιο 2 κυττάρων, (2 cell mouse embryo stage) και την έκφραση του IGF - I την ημέρα E7.5. Η δυνατότητα αυτή δεν αποκλείει, ότι ο IGF -I ή ο IGF-II μπορεί να δρα πριν την έναρξη της σωματικής ανάπτυξης (Clemmons et al., 1995).

Εικόνα 1.8. Χαρακτηριστικά φαινότυπου knock-out ποντικών για τα γονίδια του IGF συστήματος. Απεικόνιση της εμβρυικής μέρας που γίνεται εμφανής ο μεταλλαγμένος φαινότυπος των εμβρύων.(Clemmons et al., 1995)

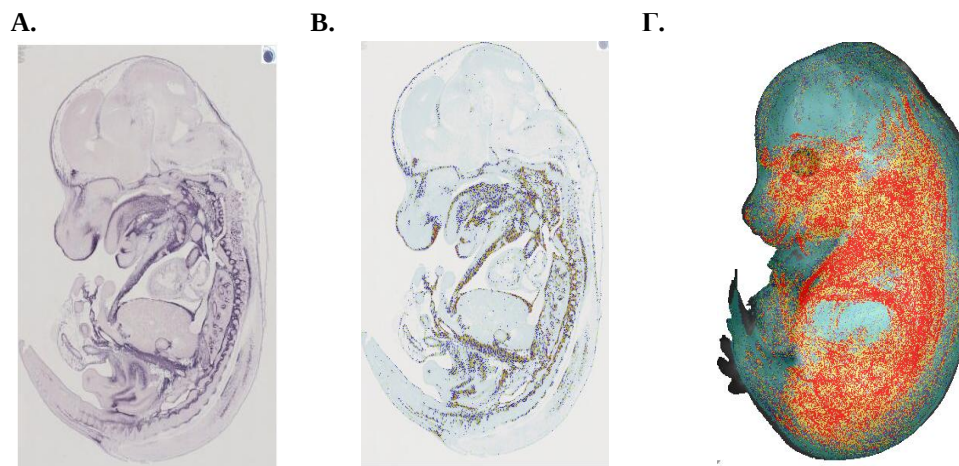
Gene(s) knocked out	Birth wt (% normal)	Onset of growth delay (embryonic day)	Phenotype at birth	Postnatal growth rate
IGF-I	60%	13.5	Small	Reduced, most die before adulthood
IGF-II	60%	11.0	Small, placental hypoplasia	Normal
IGF-I + IGF-II	30%	11.0	Postnatal death, no respirations, placental hypoplasia	
IGF-I receptor + IGF-II	30%	11.0	Postnatal death, no respirations, placental hypoplasia	
IGF-I receptor	45%	11.0	Postnatal death, no respirations	
IGF-I receptor + IGF-I	45%	11.0	Postnatal death, no respirations	
IGF-II receptor	<i>In utero death</i>			
IGF-II receptor + IGF-II	60%		Many survive to birth, one survived to reproductive age	

Στις μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι τώρα σε έμβρυα με μεταλλαγμένο φαινότυπο λόγω απουσίας των γονιδίων του IGF συστήματος, η μορφογένεση είναι φυσιολογική, και οι οργανισμοί που προκύπτουν είναι αναλογικά μικρότεροι (νανισμός). Ωστόσο δεν εντοπίζεται κάποια ανωμαλία μέχρι στιγμής στην κυτταρική διαφοροποίηση. Ιστολογικές ανωμαλίες, περιγράφονται μόνο σε ποντίκια στα οποία απουσιάζει ο IGF-I υποδοχέας και παρουσιάζεται κυτταρική υποπλασία, δηλαδή μείωση στον αριθμό των κυττάρων και όχι στο μέγεθος τους, κυρίως στο σκελετικό μυ και στα εσωτερικά όργανα, αλλά και δυσκολία στην αναπνοή.(Clemmons et al., 1995)

Μέχρι στιγμής δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως ποιοι ιστοί παράγουν τους IGFs, κατά τη διάρκεια της εμβρυικής τους ανάπτυξης και δεν έχει μελετηθεί σε ποια κύτταρα εντοπίζονται ακριβώς και αν τα κύτταρα αυτά συνομιλούν μεταξύ τους. Μόνο σε πειράματα *in situ* υβριδισμού, έχει μελετηθεί η ιστοειδική έκφραση των IGFs σε ποντίκια από την πρώτη μέρα εμβρυικής ανάπτυξης , μέχρι τη μέση της κύησης.

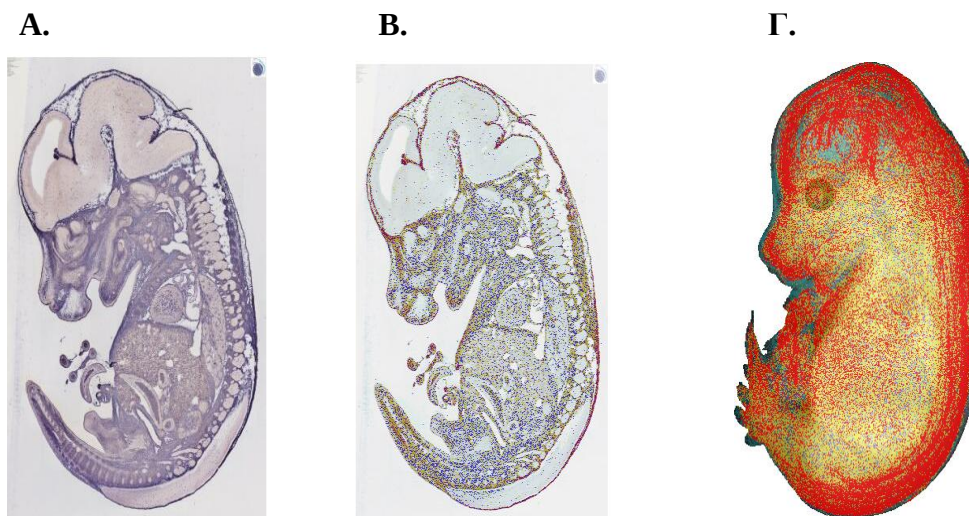
Συγκεκριμένα για τον IGF-I, έχει μελετηθεί η έκφραση του από την εμβρυική ημέρα E11.5 μέχρι την E14.5, όπου σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης υπερεκφράζεται στα περισσότερα όργανα. Ο IGF-II, έχει εξίσου μελετηθεί από την εμβρυική ημέρα E7.5 μέχρι την E14.5, όπου παρατηρείται η υπερέκφρασή του σε όλα τα όργανα και μετά πέφτει σιγά σιγά μέχρι τη στιγμή της γέννησης.

Εικόνα 1. 9. Έκφραση του IGF1 στην εμβρυική μέρα E14.5:



A. Απεικόνιση εμβρύου E14.5, στο πλάι με τη τεχνική του *in situ* υβριδισμού, B. Απεικόνιση της έκφρασης του IGF1, Γ. Απεικόνιση του εμβρύου, το κόκκινο δείχνει υπερέκφραση του IGF1, το κίτρινο μέτρια έκφραση, το πράσινο πιθανή έκφραση, το μπλε αδύναμη έκφραση και το σιελ, δείχνει περιοχές του εμβρύου που δεν έχουν ακόμα μελετηθεί.(emouse atlas.org)

Εικόνα 1.10. Έκφραση του IGFII την εμβρυική μέρα E14.5:



A. Απεικόνιση εμβρύου E14.5, στο πλάι με τη τεχνική του *in situ* υβριδισμού, B. Απεικόνιση της έκφρασης του IGF1, Γ. Απεικόνιση του εμβρύου, το κόκκινο δείχνει υπερέκφραση του IGFII, το κίτρινο μέτρια έκφραση, το πράσινο πιθανή έκφραση, το μπλε αδύναμη έκφραση και το σιελ, δείχνει περιοχές του εμβρύου που δεν έχουν ακόμα μελετηθεί.(www.emouse atlas.org)

Ωστόσο μέχρι στιγμής, δεν έχουν ταυτοποιηθεί οι κυτταρικοί πληθυσμοί, από τους οποίους παράγονται και εκφράζονται οι δύο αυξητικοί παράγοντες, στα συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης, και δε γνωρίζουμε εάν τα κύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν τον ένα παράγοντα μπορούν να παράγουν και να εκκρίνουν και τον άλλο.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Δεδομένου ότι η απουσία του IGF1 και του IGFII έχει αθροιστικό αποτέλεσμα στο φαινότυπο των ποντικών, μπορεί κανείς να υποθέσει, ότι οι δύο αυτοί πολύ σημαντικοί παράγοντες προέρχονται από διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων, τα οποία συνεργάζονται αρμονικά κατά την φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων IGF1 και IGFII κατά την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης ποντικών και η ταυτοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που τους εκφράζουν. Για την μελέτη αυτή, σχεδιάστηκαν δύο knock-in διαγονιδιακά ποντίκια, για τον εντοπισμό των παραγόντων αυτών με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν χίμαιρες που εκφράζουν την πρωτεΐνη YFP(yellow fluorescent protein), στη θέση του IGF1 κάτω από τον ενδογενή υποκινητή του IGF1, και την πρωτεΐνη CHERRY, στη θέση του IGFII, κάτω από τον υποκινητή του IGFII. Μετά την διασταύρωση αρσενικών ποντικών που εκφράζουν IGFII/CHERRY με θηλυκά που εκφράζουν IGF1/YFP και έπειτα από χρονικά σχεδιασμένες εγκυμοσύνες (εμβρυική ημέρα E15, E18), έγινε συλλογή εμβρύων με διαφορετικό γονότυπο σε διαφορετικά χρονικά στάδια ανάπτυξης για τον έλεγχο της έκφρασης και των δυο γονιδίων αντίστοιχα. Παράλληλα, διεξήχθησαν πειράματα με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης mRNA των υπό μελέτη παραγόντων σε διαφορετικούς ιστούς και τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με ανοσοστύπωμα κατά western.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Δημιουργήθηκαν χίμαιρες που εκφράζουν την πρωτεΐνη YFP (yellow fluorescent protein), στη θέση του IGF1 κάτω από τον ενδογενή υποκινητή του IGF1, και την πρωτεΐνη cherry, στη θέση του IGFII, κάτω από τον υποκινητή του IGFII. Έγινε διασταύρωση αρσενικών ποντικών που εκφράζουν IGFII/CHERRY με θηλυκά που εκφράζουν IGF1/YFP και έπειτα από χρονικά σχεδιασμένες εγκυμοσύνες, μελετήσαμε έμβρυα κατά την εμβρυική ημέρα E15, E18. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των παραπάνω διαγονιδιακών ποντικών με γονοτύπηση περιγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των διαγονιδιακών ποντικών με γονοτύπηση.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')	Προϊόν (bp)
Puro F	GAC CGA GTA CAA GCC CAC GGT GCG	150 bp
Puro R	CGC GAC CCA CAC CTT GCC GAT GTC	
Neo F	AGA GGC TAT TCG GCT ATG ACT	450 bp
NeoR	CCT GAT CGA CAA GAC CGG CTT	
Yfp F	CAT CTT CTT CAA GGA CGA CGG	150 bp
YfpR	TGATA TAG ACG TTG TGG CTG TTG	
CherryF	CGC CAT CAT CAA GGA CTT CAT	450 bp
CherryR	CTT GGC CTT GTA GGT GGT CTT	

Όλα τα πειραματόζωα στεγάστηκαν υπό στείρες συνθήκες (Specific Pathogen Free, SPF) σε αυτόνομα εξαεριζόμενα κλουβιά στη Μονάδα Ζωϊκών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος διατηρούνταν σταθερές και η εναλλαγή ημέρας και νύχτας ήταν προγραμματισμένη ανά 12 ώρες. Η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία για τη χρήση πειραματοζώων για ερευνητικούς σκοπούς.

3.2.ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

3.2.1. Μονιμοποίηση ιστού

Έπειτα από την απομόνωση ιστού από ένα πειραματόζωο, είναι απαραίτητη η μονιμοποίησή του. Για έγκλειση σε κρυοπροστατευτικό μέσο OCT (Optimal Cutting Temperature compound), ακολουθούμε διαφορετική διαδικασία: μονιμοποιούμε σε 4% παραφορμαλδεΰδη (Paraformaldehyde, PFA, Fischer Scientific) από 2 ώρες το ελάχιστο μέχρι ολονύκτια το μέγιστο, πραγματοποιούμε 4 εκπλύσεις των 15 λεπτών με PBS και αφήνουμε ολονύκτια σε σουκρόζη (Fischer Scientific).

PBS 10x

1,37 M NaCl (Sigma)

27 mM KCl (Mallinckrodt)

100 mM Na₂HPO₄ (AppliChem)

20 mM KH₂PO₄ (Fischer Scientific)

3.2.2. Κρυτομές

Μετά τη μονιμοποίηση, ο ιστός τοποθετείται σε εκμαγείο όπου καλύπτεται με μέσο έγκλεισης OCT (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura). Το OCT είναι ένας σχηματισμός υδατοδιαλυτών γλυκολών και ρητινών που παρέχει μία κατάλληλη μήτρα για τη λήψη κρυτομών σε θερμοκρασίες από -10 °C και κάτω. Το εκμαγείο τοποθετείται στους -80 °C. Όταν στερεοποιηθεί, μπορεί να πραγματοποιηθεί η λήψη τομών σε κρυτόμο στο επιθυμητό πάχος (5-10 μm). Χρησιμοποιούμε αντικειμενοφόρους πλάκες κατάλληλες για κρυτομές (Superfrost slides) και αποθηκεύουμε τα δείγματά μας στους -80 °C.

3.2.3. Ανοσοφθορισμός

Ένα τυπικό πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού έχει ως εξής:

1. Θερμαίνουμε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Εμποτίζουμε τις πλάκες σε PBS για 5 λεπτά για να ενυδατωθούν και να καθαριστούν από το OCT.
3. Επωάζουμε σε διάλυμα κάλυψης (blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε το πρωτοταγές αντίσωμα σε διάλυμα κάλυψης στην κατάλληλη αραιώση και επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4 °C. Οι συνθήκες επώασης εξαρτώνται από το εκάστοτε αντίσωμα (Πίνακας 1).
5. Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με PBS.
6. Προσθέτουμε το δευτεροταγές αντίσωμα (IgG έναντι του ζώου στο οποίο παράχθηκε το πρωτοταγές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα) σε

διάλυμα κάλυψης στην κατάλληλη αραιώση και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι (**Πίνακας 2**).

7. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με PBS.
8. Προσθέτουμε DAPI 1000x (σε PBS) [AppliChem] και επωάζουμε για 5 λεπτά στο σκοτάδι.
9. Εκπλένουμε σε PBS για 1 λεπτό.

Μονιμοποιούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα απλώνοντας με την καλυπτρίδα μία σταγόνα Vectashield (Vector) ή Mowiol. Η πλάκα είναι έτοιμη προς παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Πίνακας 1: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης	Κωδικός	Εταιρεία	Αραίωση
mCherry (mAb)	1392065A	Invitrogen	1:500
GFP (FL), polyclonal	E1413	Santa Cruz, Biotechnolofy	1:500
Anti-E Cadherin antibody (από τον Ηλία Στρατικόπουλο)	ab15148	Abcam	1:100

Πίνακας 2: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης	Κωδικός	Εταιρεία	Αραίωση
Alexa Fluor®488-conjugated donkey anti-rabbit IgG	711-546-152	Jackson ImmunoResearch	1: 500
Alexa Fluor®633-conjugated goat anti-rabbit IgG	A-21070	Molecular Probes	1: 1000
Alexa Fluor®594-conjugated donkey anti-rabbit IgG	A-23050	Molecular Probes	1:1000

Διάλυμα κάλυψης

PBS

1% BSA (Albumin Fraction V, AppliChem)

0,1% Triton X-100 (Fischer Scientific)

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται συνήθως για την αύξηση της ποσότητας DNA μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εναρκτήρια μόρια (εκκινητές) για μία σειρά από συνθετικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από μία DNA πολυμεράση, την Taq πολυμεράση, η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, επιτυγχάνεται η *de novo* σύνθεση της περιοχής του DNA που πλαισιώνεται από τους δύο εκκινητές.

Το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητής είναι συμπληρωματικό (i) με μία από τις δύο διαφορετικές αλυσίδες της μήτρας DNA και (ii) με τη γειτονική αλληλουχία του προς αύξηση τμήματος DNA. Αρχικά, πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία που επιτρέπει την αναδιάταξη των εναρκτήριων μορίων με τις συμπληρωματικές αλυσίδες και τέλος, πραγματοποιείται επιμήκυνση των αναδιαταγμένων εναρκτήριων μορίων με την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές (25-35 κύκλοι) και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Το διάλυμα της αντίδρασης στο τέλος n κύκλων είναι δυνατόν να περιέχει θεωρητικά 2^n μόρια DNA, τα οποία είναι αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στα εναρκτήρια μόρια.

Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις PCR που έγιναν, περιελάμβαναν τα εξής στάδια:

1. αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 94°C
2. υβριδισμός των εκκινητών στο DNA στους 58°C ή 60°C
3. επιμήκυνση του DNA από την Taq πολυμεράση στους 72°C

Συνήθως, εφαρμόζονταν 31 κύκλοι της διαδικασίας, με αποτέλεσμα την παραγωγή $100\text{ ng} - 1\text{ }\mu\text{g}$ DNA (της συγκεκριμένης ακολουθίας) από 50 ng DNA.

Η αποτελεσματικότητα μίας αντίδρασης PCR υπολογίζεται από την εξειδίκευση, την απόδοση και την ακρίβεια με την οποία πραγματοποιείται η αύξηση του DNA. Μία αντίδραση PCR υψηλής εξειδίκευσης ενισχύει μόνο ένα προϊόν, το επιθυμητό. Μία αντίδραση υψηλής απόδοσης οδηγεί σε υψηλό ποσό προϊόντος με σχετικά λίγους κύκλους. Παράλληλα, σε μία αντίδραση υψηλής ακρίβειας, τα λάθη που έχουν εισαχθεί από την πολυμεράση στο προϊόν της αντίδρασης είναι αμελητέα. Μία ιδανική αντίδραση PCR έχει υψηλή εξειδίκευση, απόδοση και ακρίβεια. Οι παράμετροι αυτοί εξαρτώνται από διάφορα στοιχεία, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, τη συγκέντρωση ιόντων Mg^{+2} , τη θερμοκρασία, τη διάρκεια των κύκλων, καθώς επίσης και την πολυμεράση.

3.3.1. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία κλασική τεχνική για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση του μεγέθους μορίων DNA και RNA. Μόρια DNA μεγέθους $0,05\text{--}20\text{ kb}$ μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε $0,7\text{--}2\%$ κ.ό. οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη είναι αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Το πήκτωμα περιέχει την επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης, $1\times\text{TBE}$ και βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε συγκέντρωση $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$. Για την παρασκευή του πηκτώματος, η αγαρόζη διαλύεται σε d.d. H_2O με βρασμό για 1-2 λεπτά. Το EtBr

προστίθεται μόλις η θερμοκρασία πέσει κάτω από τους 60°C. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1× TBE το οποίο περιέχει 0,5 µg/ml EtBr. Το EtBr ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και το σύμπλοκο αυτό γίνεται ορατό όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος, στα δείγματα προστίθεται ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου τους από ειδικό διάλυμα (σακχαρόζη 40% κ.ό., μπλε της βρωμοφαινόλης 0,25% κ.ό.) για την τοποθέτησή τους στο πήκτωμα. Η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης εξασφαλίζει την παραμονή του δείγματος στην ειδική υποδοχή του πηκτώματος και η χρωστική χρησιμεύει ως δείκτης μετανάστευσης, γιατί κάθε χρωστική μεταναστεύει με ορισμένη ταχύτητα που εξαρτάται από την περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αгарόζη. Η τοποθέτηση των δειγμάτων γίνεται στον αρνητικό πόλο, ώστε να μεταναστεύσουν με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προς τον θετικό πόλο, επειδή τα νουκλεϊκά οξέα λόγω των φωσφορικών ομάδων είναι φορτισμένα αρνητικά. Η μέγιστη τιμή της έντασης του ρεύματος που εφαρμόζεται είναι 120 mA, ώστε να μην υπερθερμανθεί το πήκτωμα. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302 nm, όπου τα μόρια DNA εμφανίζονται ως διακριτές ζώνες λόγω της ενσωμάτωσης του φθορίζοντος EtBr.

3.4. Απομόνωση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Ο ιστός εκπλένεται με PBS, και επωάζονται στον πάγο.
2. Ο ιστός αναδιαλύεται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay buffer), στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς φωσφατασών (NaF 10x, Na₃VO₄ 100x) και αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors cocktail, Roche diagnostics [1 ταμπλέτα/10 ml διαλύματος RIPA]) και επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο.
3. Στη συνέχεια, καταψύχεται στους -20 °C για 20 λεπτά.
4. Έπειτα, αφήνεται να ξεπαγώσει στον πάγο και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
5. Τέλος, κρατάμε το υπερκείμενο, το οποίο φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα RIPA

150 mM NaCl

50 mM Tris, pH 7,4 (Trizma base, Sigma)

1% NP-40 (AppliChem)

0,5% δεοξυχολικό νάτριο (Fischer Scientific)

0,1% SDS (AppliChem)

3.4.1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Πηκτώματα

Το πρώτο βήμα κατά την ανοσοαποτύπωση Western (Western blot) είναι η παρασκευή των πηκτωμάτων. Με τη χρήση συσκευής της Bio-rad, παρασκευάζουμε πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) ακρυλαμίδης (30% Acrylamide/Bis Solution, Bio-rad) κατάλληλης πυκνότητας, ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. Μόλις πήξει, προσθέτουμε το πήκτωμα επιστίβαξης και προσαρμόζουμε το χτένι 10 θέσεων για να σχηματιστούν τα φρεάτια. Παρακάτω αναγράφεται η συνταγή για την παρασκευή 2 μικρών πηκτωμάτων (Πίνακας 3, 4).

Πίνακας 3: Συνταγή για την παρασκευή δύο μικρών πηκτωμάτων διαχωρισμού 10% και 12% για Western blot

<u>Πήκτωμα διαχωρισμού</u>	10%	12%
H₂O	5,3 ml	4,0 ml
Μίγμα ακρυλαμίδης 30%	3,3 ml	3,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1% κ.ό.	0,1 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,008 ml	0,004 ml
Σύνολο	10 ml	10 ml

Πίνακας 4: Συνταγή για την παρασκευή δύο μικρών πηκτωμάτων επιστίβαξης 5% για Western blot

<u>Πήκτωμα επιστίβαξης</u>	5%
H₂O	3,4 ml
Μίγμα ακρυλαμίδης 30%	0,83 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,63 ml
10% SDS	0,05 ml
10% APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
Σύνολο	5 ml

Προετοιμασία δειγμάτων

Σε κατάλληλη ποσότητα από τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών που έχουμε απομονώσει, προσθέτουμε χρωστική Laemmli 3x και θερμαίνουμε στους 100 °C για 5 λεπτά

Χρωστική Laemmli 3x

0,0625 M Tris pH 6,8 2% SDS 10% γλυκερόλη
4% R-μερκαπτοαιθανόλη
0,01% μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma)

Ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης

Τα πηκτώματα τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και, αφού την έχουμε γεμίσει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer), απομακρύνουμε το χτένι και επιστιβάζουμε τα δείγματά μας, καθώς και έναν πρωτεϊνικό δείκτη με γνωστά μεγέθη. Η ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) λαμβάνει χώρα στα 100 V, 300 mA και 100 W για 1,5-2 ώρες.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

25 mM Tris pH 8,0

190 mM γλυκίνη (Sigma)

0,1% SDS

Μεταφορά

Σε ειδική συσκευή, τοποθετούμε ένα σφουγγαράκι, 3 φύλλα Whatman, το πηκτώμα, μία μεμβράνη PVDF (Immuno-Blot PVDF Membrane, Bio-rad), τρία φύλλα Whatman και ένα σφουγγαράκι, τα οποία έχουν εμποτιστεί σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer), και στη συνέχεια την τοποθετούμε στο δοχείο όπου θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά, το οποίο έχουμε γεμίσει με διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα στα 100 V, 300 mA και 100 W στους 4 °C για 1,5 ώρα.

Διάλυμα μεταφοράς

25 mM Tris pH 8,0

190 mM γλυκίνη

20% μεθανόλη (Lachner)

Κάλυψη

Η μεμβράνη τοποθετείται σε ένα δοχείο με διάλυμα κάλυψης (Blocking solution [5% άπαχο ξηρό γάλα σε TBS-T]) σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα, υπό ανακίνηση.

TBS

20 mM Tris pH 7,5

100 mM NaCl (Sigma)

TBS-T

20 mM Tris pH 7,5

100 mM NaCl

0,1% Tween-20 (Fischer Scientific)

Πρωτογενές αντίσωμα

Προσθέτουμε το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα κάλυψης και το επωάζουμε στους 4 °C για 18 ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες, ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες για κάθε αντίσωμα (**Πίνακας 5**). Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιούμε 3 εκπλύσεις των 15 λεπτών με TBS-T.

Πίνακας 5: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε Western blot

Αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης	Κωδικός	Εταιρεία	Ζώο στο οποίο παράχθηκε	Αραιώση
mCherry (mAb)	1392065A	Invitrogen	Rat	1/1000
GFP (FL), polyclonal	E1413	Santa Cruz, Biotechnolofy	rabbit	1/1000
IGFII	05-166	Millipore	rabbit	1/1000
IGFI(G-17)	Sc-1422	Santa Cruz, Biotechnology	rabbit	1/1000
Actin	Sc-1835	Santa Cruz, Biotechnology	rabbit	1/1000

Δευτερογενές αντίσωμα

Προσθέτουμε το δευτερογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα κάλυψης και το επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (**Πίνακας 5**). Στη συνέχεια, εκτελούμε 2 πλύσεις των 15 λεπτών με TBS-T και μία με TBS.

Πίνακας 6: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε Western blot

Αντίσωμα	Κωδικός	Εταιρεία	Αραίωση
Peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG	711-035-152	Jackson Immunoresearch	1/2000
Peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG	715-035-147	Jackson Immunoresearch	1/2000
Peroxidase-conjugated donkey anti- rat IgG	715-035-147	Jackson Immunoresearch	1/2000

Εμφάνιση

Αναμιγνύουμε 600 μl αντιδραστηρίου 1 (Detection Reagent 1, Peroxide) και 600 μl αντιδραστηρίου 2 (Detection Reagent 2, Luminol) ECL (Enhanced Chemiluminescence [Pierce ECL Western Blotting Substrate]), εντός των οποίων εμποτίζουμε τη μεμβράνη για 5 λεπτά. Τέλος, τη μεταφέρουμε σε κασετίνα και εμφανίζουμε σε σκοτεινό θάλαμο, χρησιμοποιώντας φιλμ FUJI.

3.5 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση RNA από ιστό, ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

1. Ξεπλένουμε τον ιστό με PBS
2. Αναδιαλύουμε τον ιστό στον κατάλληλο όγκο (1 ml/100gr) αντιδραστηρίου Trizol (Tri Reagent, MRC) και επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθέτουμε 0,2 ml χλωροφόρμιο (AppliChem)/1 ml Trizol και, έπειτα από έντονη ανάδευση των δειγμάτων και 2-3 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, τα φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8°C.
4. Μετά τη φυγοκέντρωση, το μίγμα διαχωρίζεται στην κάτω κόκκινη φάση φαινόλης-χλωροφορμίου, τη μεσόφαση και την πάνω άχρωμη υδατική φάση

- στην οποία βρίσκεται το RNA. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα eppendorf.
5. Προσθέτουμε 0,5 ml ισοπροπανόλης/1ml Trizol, αναδεύουμε ισχυρά, επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
 6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1 ml 75% αιθανόλης/1 ml Trizol και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
 7. Αφού το ίζημα αποξηρανθεί στον αέρα, το αναδιαλύουμε σε DEPC-νερό (QIAGEN).

3.5.1.Υπολογισμός της απόδοσης απομόνωσης και της καθαρότητας του RNA

Η απόδοση της απομόνωσης προσδιορίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm ($1 \text{ A}_{260} \text{ unit} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$). Το RNA προκειμένου να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις DNA ή πρωτεϊνών. Το καθαρό RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} = 2$. Όταν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1.7-2.0 τότε το RNA θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας

3.5.2. DNase treatment

Συνήθως το παρασκεύασμα του RNA περιέχει γονιδιακό DNA, και απαιτείται κατεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Στην παρούσα μελέτη για τον καθαρισμό του RNA από προσμίξεις DNA χρησιμοποιήθηκε το kit RQ1 RNase-free DNase της Promega σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Η RQ1 Rnase-free DNase είναι μία δεοξυριβονουκλεάση η οποία επάγει την πέψη τόσο μονόκλωνων όσο και δίκλωνων αλυσίδων DNA σε олиγοδεοξυριβονουκλεοτίδια κάθε ένα από τα οποία φέρει ελεύθερο το 3' υδροξυλικό του άκρο.

3.5.3. Παρασκευή cDNA από το RNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

Ως αντίστροφη μεταγραφή ορίζεται η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) με μήτρα το RNA. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται από τις αντίστροφες μεταγραφάσες, τα ένζυμα δηλαδή που μπορούν να χρησιμοποιούν ως μήτρα RNA.

3.5.4. Πρωτόκολλο παρασκευής cDNA(First-Strand cDNA) από το RNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (SuperScript™ II RT)

Για την δημιουργία μιας αντίδρασης , με τελικό όγκο 20μl, ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

1. Αρχικά προσθέτουμε 50-250 ng random primers 1μl
2. Έπειτα προσθέτουμε 1ng -5μg συνολικού RNA x μl
3. dNTPs mix (10 mM το κάθε ένα) 1μl
4. DEPC νερό έως 12 μl
5. Θερμαίνουμε το δείγμα στους 65 °C για 5 λεπτά και έπειτα τα τοποθετούμε γρήγορα στον πάγο. Μετά από γρήγορη φυγοκέντρωση παίρνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε :
6. 5x First-strand Buffer 4μl
7. 0.1M DTT 2μl
8. Αναμιγνύουμε το δείγμα μας και επωάζουμε τους 25°C για 2 λεπτά
9. Προσθέτουμε 1μl (200 units), SuperScript™ II RT και αναμιγνύουμε.
10. Επωάζουμε στους 25 °C για 10 λεπτά
11. Ακολουθεί επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά
12. Τέλος, απενεργοποιούμε την αντίδραση στους 70 °C για 15 λεπτά.

3.5.5. Αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

(RT-PCR)

Η αντίδραση πολλαπλασιασμού πραγματικού χρόνου της αλληλουχίας cDNA (Real Time PCR), γίνεται σε τρία στάδια, όπως και στην κλασική PCR:

- i.** αποδιάταξη του DNA
- ii.** υβριδοποίηση των εκκινητών
- iii.** επιμήκυνση του προϊόντος.

Η διαφορά των δύο τεχνικών βρίσκεται στη χρήση ανιχνευτών, κατά την Real-Time PCR, οι οποίοι προσδεδεμένοι στο προϊόν της αντίδρασης, εκπέμπουν σήμα φθορισμού που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των αντιγράφων που σχηματίζονται σε πραγματικό χρόνο.

Κατά την διάρκεια των πρώτων κύκλων της αντίδρασης το σήμα αυτό είναι ασθενές, δίχως να υπάρχει η δυνατότητα να διακριθεί από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η πρώτη αυτή φάση της αντίδρασης είναι γνωστή ως φάση “υπόβαθρου” ή ως φάση “θορύβου” (background phase). Όσο το προϊόν της αντίδρασης συσσωρεύεται, το σήμα ξεπερνά κάποια στιγμή το σήμα του υποβάθρου, αρχίζοντας πλέον να αυξάνεται εκθετικά. Η εκθετική αυτή φάση της αντίδρασης (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase), όπου η απόδοση της αντίδρασης προσεγγίζει το 100%, με αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο να διπλασιάζεται το προϊόν της αντίδρασης, δίνει την θέση της στην γραμμική φάση (linear phase). Στη φάση αυτή παρατηρείται ταχύτατη κατανάλωση των συστατικών της αντίδρασης και αποδόμηση του προϊόντος, με αποτέλεσμα μετά από κάποιο σημείο η απόδοση της αντίδρασης να μειώνεται. Τότε ξεκινά η τελευταία φάση της αντίδρασης, γνωστή ως φάση “κορεσμού” (plateau). Ο κορεσμός αυτός οφείλεται στη σημαντική μείωση κάποιων εκ των συστατικών της αντίδρασης, όπως των εκκινητών, της χρωστικής, των dNTPs ή τον κορεσμό της καταλυτικής δράσης των μορίων της πολυμεράσης της αντίδρασης, οδηγούμενοι έτσι από την εκθετική στη γραμμική αύξηση.

Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται κατά τη λογαριθμική φάση της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υποβάθρου, είναι γνωστός ως “Threshold cycle” (CT). Ο αριθμός αυτός CT προσδιορίζεται από την αύξηση του φθορισμού του μίγματος της αντίδρασης πάνω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο γνωστό ως “Threshold” (κατώφλι). Το επίπεδο αυτό, ανάλογα με τον κυκλοποιητή και το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται, μπορεί να επιλεγεί είτε αυτόματα, με τη βοήθεια ειδικών αλγόριθμων, είτε μπορεί να προσδιοριστεί από τον ίδιο τον ερευνητή.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την . Αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'-3')
YFP-F	CAT CTT CTT CAA GGA CGACGG
YFP-R	TGA TAT AGA CGT TGT GGC T GT TG
NEO-R	CCT CTAATCA GGA TAT TCT TC
NEO-F	GCC AAT GAT GTT ACA GAT GAG
CHERRY-R	GCT TCA CCT TGT AGA TGA AC
CHERRY-F	TGG CCT GGG ACA TCC TGT CC
IGFII -F	GTC GAT GTT GGT GCT TCT CA
IGFII -R	AAG CAG GAC TCT TCC ACG AT
IGFI-R	GCT TTT GTA GGC TTC AGT GG
IGFI-F	AGT TGC CTC CGT TAC CTC CT
bACTIN-F	CCC AGG CAT TGC TGA CAG G
bACTIN-R	TGG AAG GTG GAC AGT GAG GC
PPIA -F	TCC ATC GTG TCA TCA AGG AC
PPIA-R	GTT GCC ATC CAG CCA GGA G

Ανίχνευση της αλληλουχίας στόχου μέσω SYBR Green

Η SYBR Green είναι μια πολύ σταθερή χρωστική (μόλις το 6% της δράσης της χάνεται μετά από 30 κύκλους της αντίδρασης PCR) η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης. Έχει τη δυνατότητα να ενσωματώνεται στη μικρή αύλακα δίκλωνων μορίων DNA και αφού διεγερθεί να φθορίζει. Όταν τα PCR προϊόντα συσσωρεύονται, ο φθορισμός αυξάνεται και η αύξηση αυτή είναι εκθετικά ανάλογη της ποσότητας του δίκλωνου DNA που παράγεται.

Τα βασικά βήματα ανίχνευσης από την SYBR Green, κατά τη διάρκεια της Real Time, για το Light Cycler® 480 (Roche), είναι τα ακόλουθα :

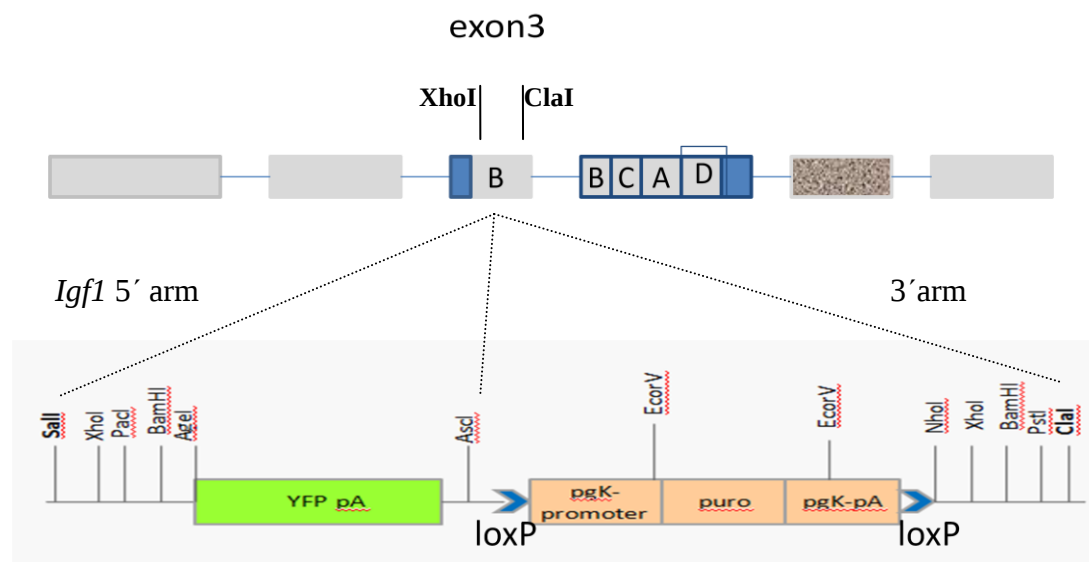
- i.** Κατά την υβριδοποίηση, οι εκκινητές υβριδοποιούνται με την αλληλουχία στόχο, σχηματίζοντας μικρές δίκλωνες περιοχές DNA όπου και ενσωματώνεται η SYBR Green, με επακόλουθη μικρή αύξηση του φθορισμού.
- ii.** Κατά την επιμήκυνση, σχηματίζονται περισσότερα δίκλιωνα μόρια DNA με αποτέλεσμα να ενσωματώνεται μεγαλύτερη ποσότητα χρωστικής με επακόλουθη αύξηση του φθορισμού.
- iii.** Με την ολοκλήρωση της επιμήκυνσης, η αλληλουχία του DNA είναι δίκλιωνα σε όλο το μήκος της, και έχει τη μεγαλύτερη ενσωμάτωση SYBR Green. Ο φθορισμός μετράται (530nm) στο τέλος της κάθε φάσης επιμήκυνσης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Δημιουργία IGF1-YFP LPL (lox-puro-lox) ποντικού

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *IgfI* και *IgfII* σε ποντίκια. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε ένα ποντίκι, στο οποίο η κωδική περιοχή του *IgfI* έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο που κωδικοποιεί την Yellow Fluorescent Protein (YFP). Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε να παρακολουθήσουμε αναπτυξιακά τα κύτταρα που παράγουν IGF1, διότι αντ' αυτού θα παράγεται μια φθορίζουσα πρωτεΐνη που είναι ορατή στα 500nm. Φαινοτυπικά σε ομοζυγωτία το ποντίκι θα συμπεριφερόταν ως IGF1 knock-out. Η κατασκευή της knock-in κασέτας YFP-LPL, όπως φαίνεται και στην εικόνα, πραγματοποιήθηκε αρχικά με κλωνοποίηση της διαγονιδιακής κατασκευής YFPpA από το πλασμίδιο pBSK σε έναν πλασμιδιακό φορέα, που περιλαμβάνει την lox-puro-lox (LPL) κασέτα, και τον P_{gk} υποκινητή. Η YFPpALPL κασέτα απομονώθηκε με πέψη με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων SalI&ClaI και πραγματοποιήθηκε η ένθεσή της στο εξόνιο 3, του γονιδίου *Igf1* με χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών XhoI&ClaI (Liu et al., 1993). Η διαγονιδιακή κατασκευή IGF1-YFPpLPL, αφότου έγινε γραμμική, εισήχθη με μετασχηματισμό σε πολυδύναμα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ES) που διατηρούνταν σε κυτταροκαλλιέργεια. Τα μετασχηματισμένα ES κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού Puromycin, προκειμένου να επιλεγούν εκείνα στα οποία πραγματοποιήθηκε ο ομόλογος ανασυνδυασμός και επομένως ένθεση της κασέτας που εκτός από το YFP φέρει και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη.

Εικόνα 4.1. Διαγραμματική απεικόνιση της ένθεσης της «knock-in» κασέτας YFP-LPL στη γενετική περιοχή του *Igf1*.

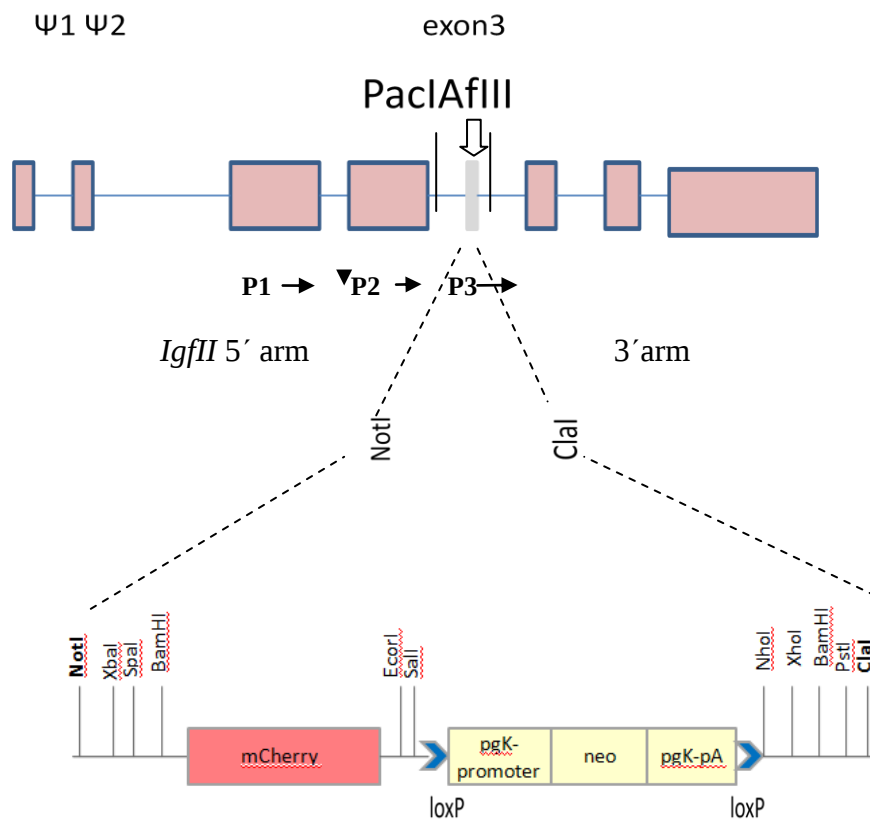


Το μπλε βελάκι, δείχνει τα loxP sites, τα οποία φεύγουν, όταν γίνει η ένθεση της κασέτας, yfp-LpL στο εξόνιο 3 του *IgfII*). Η ώριμη μορφή του πεπτιδίου αποτελείται από τέσσερις περιοχές (domains), τις B, C, A και D. Η δομή της πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Το Yfp-pA αντιστοιχεί, στην πολυαδενυλική ουρά, η οποία υπάρχει στο mRNA του *yfp* γονιδίου και του προσδίδει σταθερότητα.

4.2. Δημιουργία IGFII-mCHERRY LNL (lox-neo-lox) ποντικίου

Για τη δημιουργία ενός διαγονιδιακού ποντικού που στη θέση του ενδογενούς γονιδίου του *IgfII* θα εξέφραζε τη φθορίζουσα πρωτεΐνη CHERRY και θα μας επέτρεπε να παρακολουθήσουμε αναπτυξιακά τη μοίρα των κυττάρων που παράγουν IGFII, διότι αντ' αυτού θα παράγεται μια φθορίζουσα πρωτεΐνη που είναι ορατή στα 600 nm, έπρεπε να λάβουμε υπ' όψιν το φαινόμενο της γονιδιακής αποτύπωσης. Τα μισά ποντίκια που θα προερχόταν από πατέρα IGFII-mCHERRY θα συμπεριφερόταν ως IGFII knock-out, ενώ τα άλλα μισά, ως αγρίου τύπου, η έννοια του ετερόζυγου λοιπόν υφίσταται. Η κατασκευή της knock-in κασέτας mCHERRY-LNL, πραγματοποιήθηκε αρχικά με κλωνοποίηση της διαγονιδιακής κατασκευής mCHERRY που απομονώθηκε από το πλασμίδιο pRSET-B, σε έναν πλασμιδιακό φορέα που περιλαμβάνει την lox-neo-lox (LNL) κασέτα, και τον P_{gk} υποκινητή, τα οποία με τη σειρά τους απομονώθηκαν με διπλή πέψη του πλασμιδίου pAKH (IRES-EGFP-floxedNEO, με τα ένζυμα BsrGI και XhoI, ώστε να απομονωθεί η κασέτα μεγέθους 2,1 kb που περιλαμβάνει τον PGK υποκινητή, το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (NeoR) και το σινιάλο πολυαδενυλίωσης (pA), ανάμεσα σε δυο θέσεις loxP (LNL). Η mCHERRY-LNL κασέτα απομονώθηκε με πέψη με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων NotI&ClaI και πραγματοποιήθηκε η ένθεσή της στο *IgfII* γονίδιο, συγκεκριμένα στο εξόνιο 3, με χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών PacI&AflIII (Liu et al., 1993). Η διαγονιδιακή κατασκευή IGFII-mCHERRY LNL, αφότου έγινε γραμμική, εισήχθη με μετασχηματισμό σε πολυδύναμα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ES) που διατηρούνταν σε κυτταροκαλλιέργεια. Τα μετασχηματισμένα ES κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού neomycin, προκειμένου να επιλεγούν εκείνα στα οποία πραγματοποιήθηκε ο ομόλογος ανασυνδυασμός και επομένως ένθεση της κασέτας που εκτός από το IGFII-mCHERRY, φέρει και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη.

Εικόνα 4.2. Διαγραμματική απεικόνιση της ένθεσης της «knock-in» κασέτας CHERRY-LNL στη γενετική περιοχή του *IgfII*



Τα ψ1,ψ2 είναι ψευδοεξόνια, τα οποία αντιστοιχούν στα εξόνια 1,2 στον άνθρωπο. Ενώ τα εξόνια 1,2,3, έχουν και τους αντίστοιχους εκκινητές, (P1, P2 ,P3). Το μπλε βελάκι, δείχνει τα loxP sites, τα οποία φεύγουν, όταν γίνει η ένθεση της κασέτας, *mcherry*-LNL ,στο εξόνιο 3 του *IgfII*.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι με διασταύρωση των παραπάνω ποντικών δημιουργήθηκε ένα μοντέλο για να παρακολουθήσου με την έκφραση των δύο αυτών σπουδαίων παραγόντων, του IGF1 και του IGFII, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου.

4.3. Ενδεικτικοί φαινότυποι που προκύπτουν από τη διασταύρωση αρσενικών

IgfII_{mCherry} × *IgfI_{Yfp}* θηλυκών ποντικών

Διασταυρώσαμε αρσενικών ποντίκια με γονότυπο *cherry/igfII(p/-)* με θηλυκά ποντίκια με γονότυπο *yfp/igfI(+/-)*, με σκοπό να αναλύσουμε την έκφραση των IGFs σε δύο αναπτυξιακά διακριτά μεταξύ τους στάδια, στην εμβρυική μέρα 15 και στην εμβρυική μέρα 18.

Εικόνα 4.3. Α. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15



Β. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18



Α. Έμβρυα εμβρυικής ημέρας ανάπτυξης E15. Απεικονίζονται οι φαινότυποι εμβρύων, από αριστερά προς τα δεξιά, αγρίου τύπου, *yfp-IgfI KO*, *yfp-IgfI KO/cherry-IgfII KO* **Β.** Έμβρυα εμβρυικής ημέρας ανάπτυξης E18. Απεικονίζονται οι φαινότυποι εμβρύων, από αριστερά προς τα δεξιά, *cherry-IgfII KO*, ετερόζυγα *yfp-IgfI KO/cherry-IgfII KO*, ετερόζυγα *yfp-IgfI KO* και έμβρυα αγρίου τύπου.

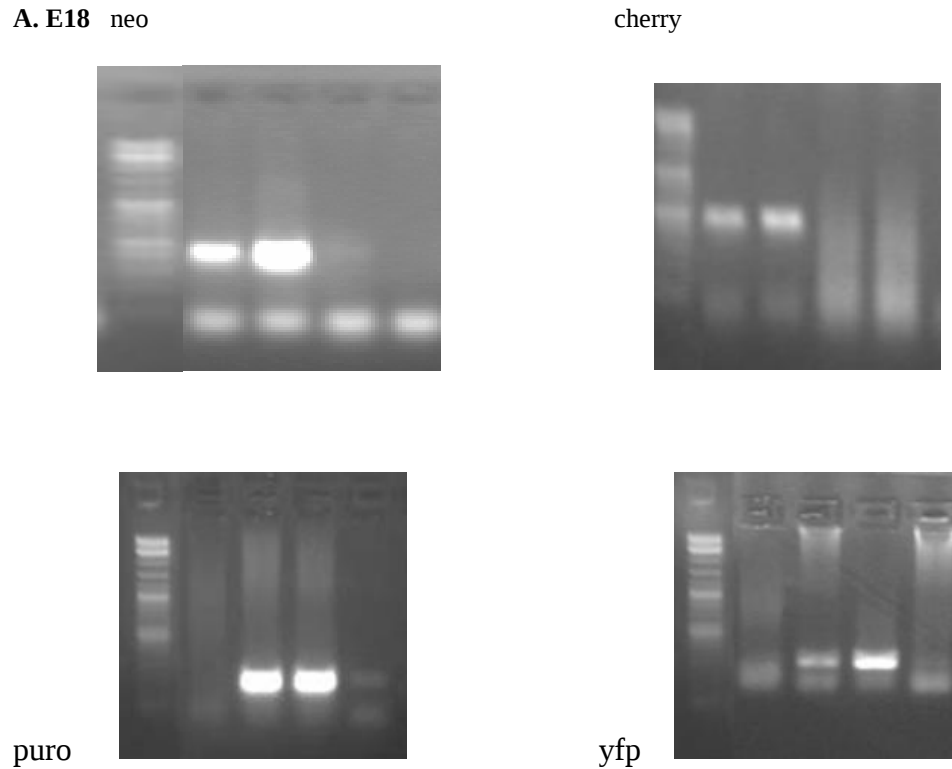
Όπως φαίνεται και στην εικόνα, τα έμβρυα στα οποία απουσιάζει μόνο ο *Igf1*, το μέγεθός τους είναι περίπου στο 60% σε σχέση με το φυσιολογικό, ενώ στα έμβρυα, στα οποία απουσιάζουν και οι δύο παράγοντες, *IgfI* και *IgfII*, το μέγεθός τους, είναι περίπου στο 30%, σε σχέση με τα αγρίου τύπου.

4.4. Ταυτοποίηση των γονοτύπων των *Yfp/mCherry* ποντικών

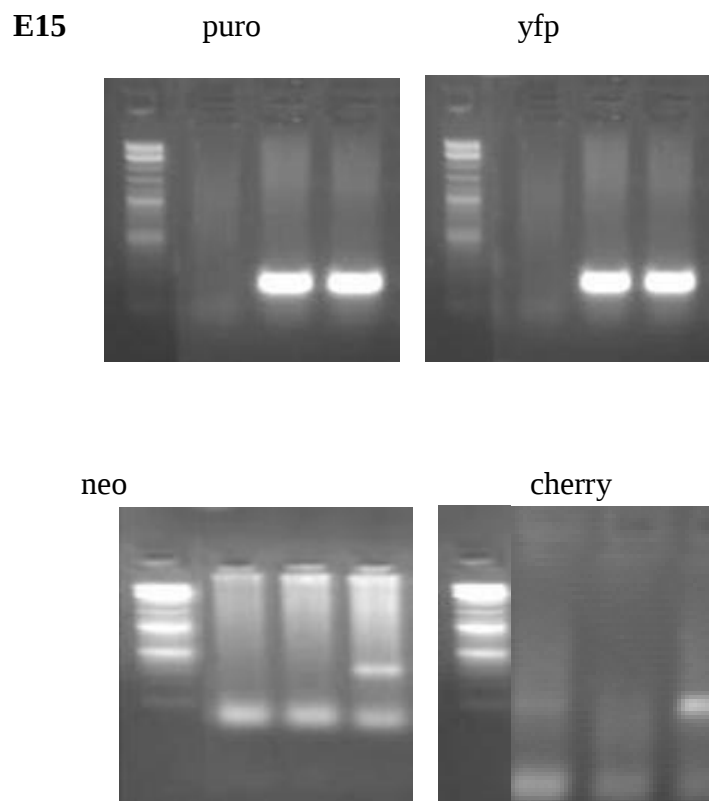
Προκειμένου να γίνει η γονοτύπηση των εμβρύων και να επιλέξουμε ποια έμβρυα θα αναλύσουμε κατά περίπτωση, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), με τη χρήση δύο διαφορετικών εναρκτήριων

αλληλουχιών, που είναι ειδικές για τέσσερις διαφορετικούς γενετικούς τύπους που εξετάσαμε, δηλαδή τα γονίδια της νεομυκίνης, πουρομυκίνης, *yfp* και *mCherry*.

Εικόνα 4.4. Ταυτοποίηση γονιδίων νεομυκίνης, πουρομυκίνης, *yfp* και *cherry* με PCR



Με το αποτέλεσμα της pcr επιβεβαιώνονται οι φαινότυποι που προκύπτουν. Στην περίπτωση των *yfp* και *puro* αναμένουμε μια ζώνη περίπου στα 150 bp και στην περίπτωση των *neo* και *cherry*, μια ζώνη περίπου στα 450 bp.



4.5. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *yfr* ποντίκι

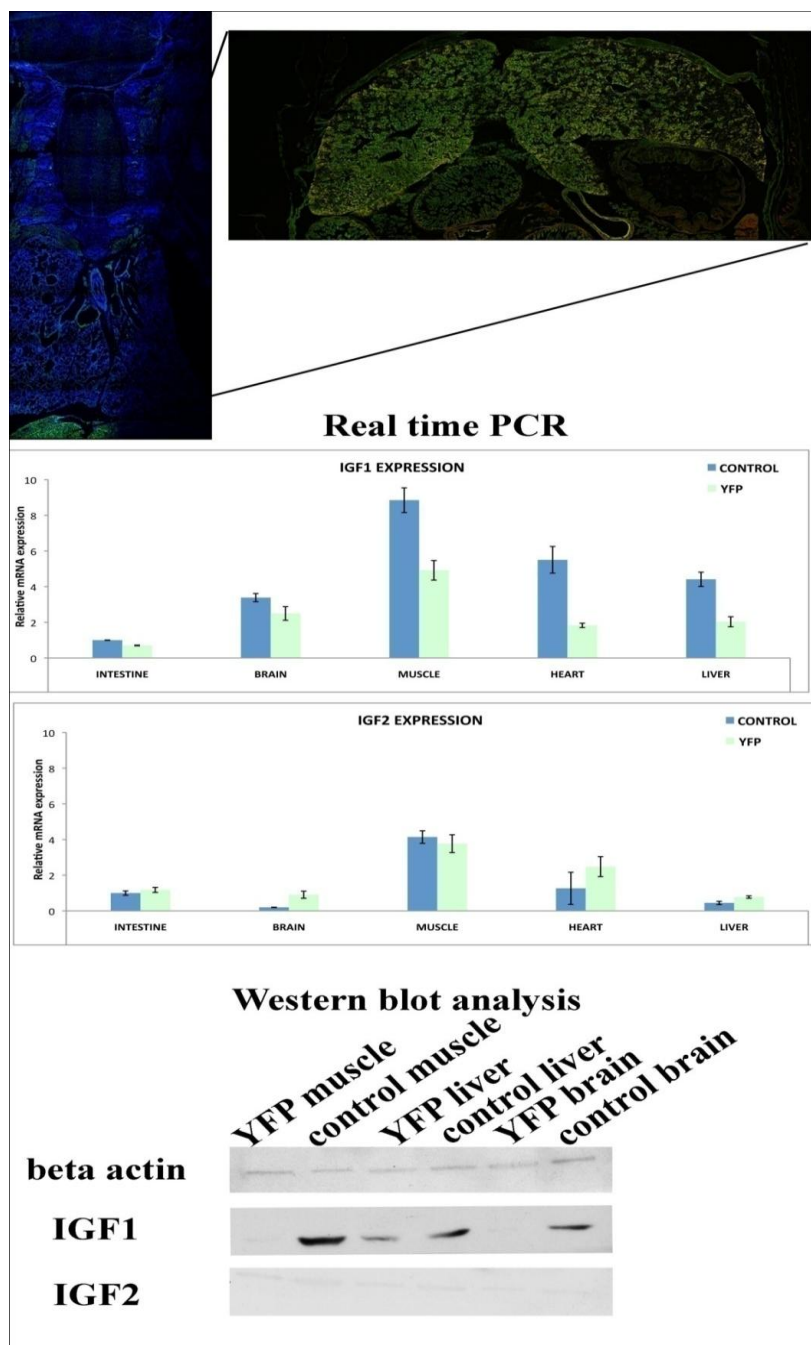
Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες, η απουσία του *IgfI* στα έμβρυα ποντικών, αρχίζει να γίνεται εμφανής από την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E 13.5. Το φαινόμενο του νανισμού, αυξάνεται ειδικά από την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15,5-E18,5, μέχρι τη γέννηση και τα έμβρυα εμφανίζουν μια μορφή νανισμού, με μέγεθος περίπου στο 60% σε σχέση με το φυσιολογικό. Έτσι, στα έμβρυα που προέκυψαν από τη διασταύρωση ετερόζυγων *yfr* ποντικών με αγρίου τύπου ποντίκια, την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15, μελετήθηκε η ιστοειδική έκφραση του *yfr* στη θέση του *IgfI*. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, παρατηρείται έντονη έκφραση του *yfr*, στο ήπαρ, όπως είναι αναμενόμενο, εφόσον ο *IgfI* παράγεται και απελευθερώνεται από το ήπαρ και η δράση του στα υπόλοιπα εσωτερικά όργανα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφρασή του στο ήπαρ, εγκέφαλο, καρδιά, έντερο και μυ, ώστε να επιβεβαιωθεί η ενδοκρινής, αυτοκρινής και παρακρινής δράση του.

Ωστόσο, παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασής του *IgfI* μειώνονται αισθητά, στα υπόλοιπα όργανα και αυτό επιβεβαιώνεται και με τη μέθοδο της RT-PCR, όπου παρατηρείται αυξημένη έκφραση ιδιαίτερα στο μυ, σε σχέση με το ήπαρ και το έντερο, που παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Πιθανόν, σε αυτό το στάδιο εμβρυικής ανάπτυξης, ο IGF1 κατέχει σημαντικό ρόλο στη μυογένεση και κατ'επέκταση τον πολλαπλασιασμό μυοβλαστών, για την ανάπτυξη μυϊκού ιστού. Άλλωστε, είναι γνωστό, ότι ο IGF1 είναι απαραίτητος, για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μυοκυττάρων (Florini et al.1991a). Επίσης η διαφορά στην έκφραση του αυξητικού παράγοντα στα έμβρυα αγρίου τύπου σε αντίθεση με αυτά, που εκφράζουν *yfr* στη θέση του *IgfI*, δείχνει ότι η απουσία του συγκεκριμένου παράγοντα, επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του εμβρύου, οδηγώντας σε υποπλασία των οργάνων του και σε αυτό οφείλεται και ο νανισμός. Το ίδιο παρατηρείται και στα επίπεδα έκφρασης του IGFII, με την έκφρασή του να μειώνεται όσο πλησιάζει στο τέλος της κύησης.

Επιπλέον, σε έρευνες έχειδειχθεί ότι, κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής η περιεκτικότητα του mRNA του *IgfII* σε οποιοδήποτε δεδομένο όργανο ή ιστό παραμένει σταθερή, αν και σε εγκέφαλο αρουραίου, τα επίπεδα mRNA μειώνονται μετά την εμβρυϊκή ημέρα 14(E14). Ωστόσο, όλοι οι ιστοί του εγκεφάλου είναι η εξαίρεση στον κανόνα, δεδομένου ότι στον εγκέφαλο, τα επίπεδα mRNA του IGFII, παραμένουν σε υψηλά επίπεδα και στην ενήλικη ζωή (Stylianopoulou, Efstratiadis, et al., 1988). Το mRNA του IGFII, στον εγκέφαλο, φαίνεται να συντίθενται από τα κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος και από τη λεπτομήνιγγα.

Η πρωτεϊνική ανάλυση με Western blot, επιβεβαιώνει την παρουσία του IGF1 στα έμβρυα αγρίου τύπου σε σχέση με τα υπόλοιπα. Στα *yfr* ετερόζυγα έμβρυα, δικαιολογείται η παρουσία πρωτεΐνης στο ήπαρ, γιατί εκεί ο IGF1 υπερεκφράζεται. Ο IGFII, είναι ανιχνεύσιμος σε όλα τα έμβρυα, στις ίδιες ποσότητες.

Εικόνα 4.5. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *yfp* ποντίκι.

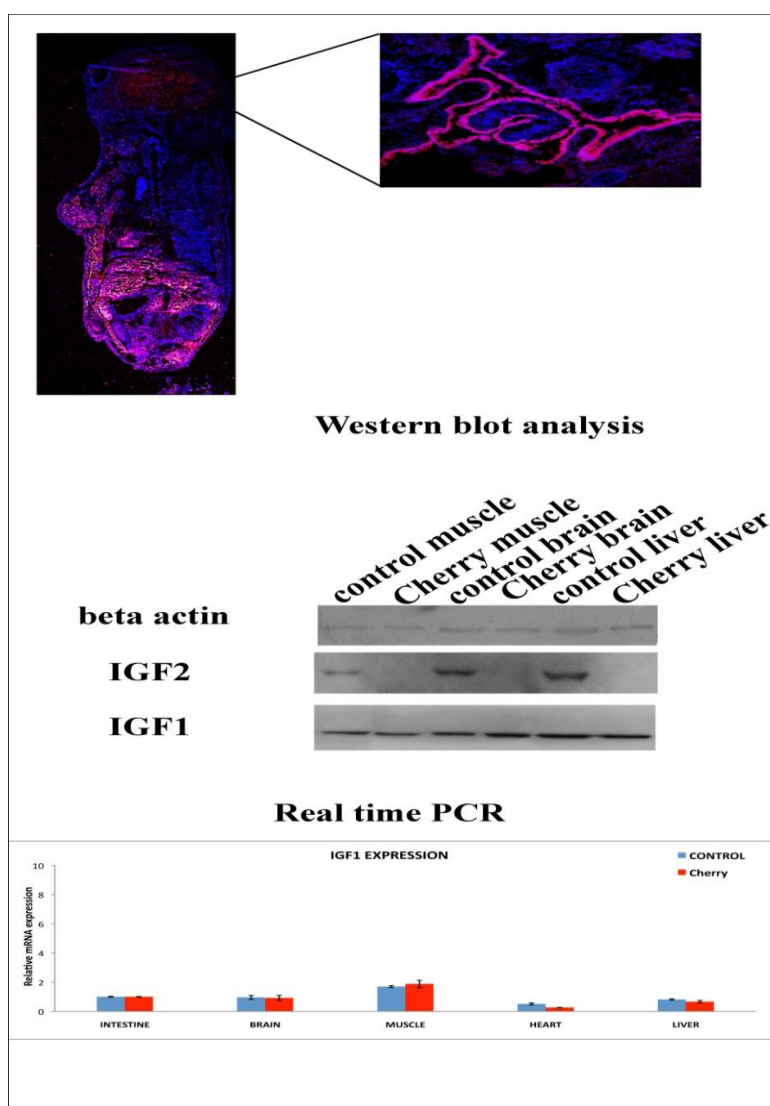


Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *yfp* ποντίκι. Α. Εγκάρσια απεικόνιση *yfp* ποντικού την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15, από κρυοτομές ποντικών Β. Παρατηρείται έντονη εμφάνιση *yfp* στο ήπαρ, από όπου παράγεται ο *IgfI*, Γ. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των *IgfI* και *IgfII* σε ιστούς (έντερο, εγκέφαλος, μυς, καρδιά, συκώτι) με RT-PCR, όπου παρατηρείται διαφορά μεταξύ των *yfp* και αγρίου τύπου ποντικών Δ. Πρωτεϊνική ανάλυση των IGF1 και IGFII σε μυ, συκώτι και εγκέφαλο μεταξύ *yfp* και αγρίου τύπου ποντικών. Ο IGF1, στα *yfp* ετερόζυγα έμβρυα, απουσιάζει, εκτός από το ήπαρ, που παρουσιάζει ασθενή έκφραση.

4.6. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *mcherry* ποντίκια

Η μελέτη σε απογόνους που προκύπτουν από τη διασταύρωση αρσενικών *mcherry* ποντικών με θηλυκά *yfp*, επιβεβαιώνουν την παρουσία της πρωτεΐνης mCHERRY στο ήπαρ, στη σπονδυλική στήλη και στον εγκέφαλο, συγκεκριμένα στο χοριακό πλέγμα.

Εικόνα 4.6. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *mcherry* ποντίκια



Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *mCherry* ποντίκι. Α Εγκάρσια απεικόνιση *cherry* ποντικού την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15, από κρυοτομές ποντικών Β. Παρατηρείται έντονη εμφάνιση *cherry* στο ήπαρ, στη σπονδυλική στήλη και στο χοριακό πλέγμα Γ. Πρωτεϊνική ανάλυση των IGF1 και IGFII σε μυ, συκώτι και εγκέφαλο μεταξύ *cherry* και *αγρίου* τύπου ποντικών. Ο IGF1, εντοπίζεται στα ίδια επίπεδα σε όλα τα έμβρυα και ο IGFII απουσιάζει στα *mcherry* έμβρυα. Δ. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *IgfI* σε ιστούς (έντερο, εγκέφαλος, μυς, καρδιά, συκώτι) με RT-PCR, όπου παρατηρείται διαφορά μεταξύ των *mcherry* και *αγρίου* τύπου ποντικών.

Από παλιότερα πειράματα σε αρουραίους, σε αυτό το σημείο του εγκεφάλου, όπως και στη λεπτομήνιγγα, έχει διαπιστωθεί η παρουσία του IGFII και στα δύο αλληλόμορφα μετά τη γέννηση και στο ποντίκι και στον άνθρωπο, ενώ γενικά ακολουθεί το πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης (Stylianopoulou, Efstratiadis, et al., 1988).

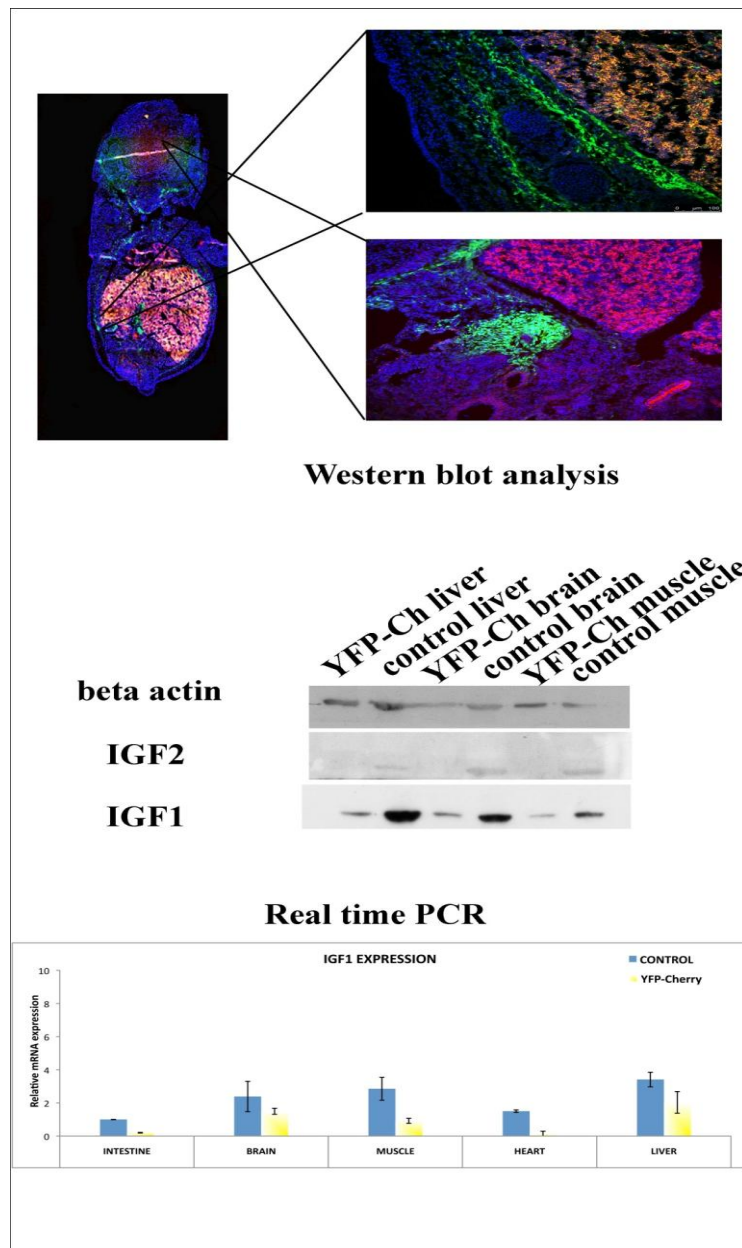
Το χοριακό πλέγμα, είναι το αγγειακό πλέγμα που εμπεριέχεται μέσα στις τέσσερις κοιλίες του εγκεφάλου και αποτελεί την δίκην πλέγματος συσπείρωση αιμοφόρων αγγείων. Ανάμεσα σε αυτές τις κοιλίες, παράγεται το εγκεφαλονωτιαίο υγρό που είναι υπεύθυνο για τη φυσική στήριξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο εγκεφαλος καθώς και ο νωτιαίος μυελός περιβάλλονται και στηρίζονται από τρεις μεμβράνες, οι οποίες ονομάζονται μήνιγγες (εγκεφαλικές και νωτιαίες αντίστοιχα). Όπως απαντώνται εκ των έξω προς τα έσω οι μήνιγγες περιλαμβάνουν την σκληρά ή παχυμήνιγγα και την λεπτομήνιγγα που υποδιαιρείται στην αραχνοειδή και τη χοριοειδή ή λεπτή μήνιγγα. Μεταξύ των μηνίγγων υπάρχουν οι εξής χώροι: ο υποσκληρίδιος (δυσνητικός) μεταξύ της σκληράς και της αραχνοειδούς και ο υπαραχνοειδής μεταξύ της αραχνοειδούς και της χοριοειδούς μήνιγγας. Στον υπαραχνοειδή χώρο κυκλοφορεί το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Στο ποντίκι, η παρουσία του IGFII, στην ενήλικη ζωή, οφείλεται στη λειτουργία των P1 και P2 εκκινητών, στα εμβρυικά στάδια ανάπτυξης. Στον άνθρωπο αντίθετα, ο IGFII, συντίθεται στο ήπαρ κατά την ενήλικη ζωή, εξαιτίας της ύπαρξης ενός εκκινητή. Επίσης, η αναγνώριση υποδοχέων του IGFII, στον εγκεφαλο στο χοριακό πλέγμα και πιθανόν και η λεπτομήνιγγα, υποδηλώνει ότι είναι αποτέλεσμα της παρακρινούς του δράσης. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης του IGFII, επιβεβαιώνει την απουσία του στα *mcherry* έμβρυα, σε σχέση με τα έμβρυα αγρίου τύπου, ενώ η μελέτη στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου του *IgfI*, επιβεβαιώνει την απουσία του *yfp*, εφόσον η έκφραση του στα αγρίου τύπου ποντίκια είναι ίδια.

Ο σχηματισμός της καρδιάς ξεκινά την εμβρυική ημέρα E7,5-10,5, κυρίως (μυοκάρδιο, ενδοκάρδιο, επικάρδιο). Η συμβολή του *IgfII*, στον σχηματισμό της καρδιάς ξεκινάει από την αρχή της διαδικασίας. Αντίθετα, η έκφραση του *IgfI*, είναι οριακά ανιχνεύσιμη στα πρώτα στάδια ανάπτυξης και αυξάνεται κυρίως από την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E14,5, δηλαδή από τα μέσα της κύησης, στη κοιλιακή χώρα της καρδιάς και στο επικάρδιο. Μελετώντας, όπως φαίνεται και από την εικόνα, τα επίπεδα έκφρασης του *IgfI*, στα κύρια όργανα των εμβρύων που απουσιάζει ο *IgfII*, είναι φανερό ότι η έκφρασή του, είναι αρκετά μειωμένη στην καρδιά, σε σχέση με τα υπόλοιπα, κυρίως μυ και έντερο και αυτό δικαιολογείται, καθώς η αντισταθμιστική δράση του *IgfI*, δεν είναι αρκετή για τη σωστή μορφογένεση της καρδιάς.

4.7. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *yfp/mcherry* ποντίκια

Από την αθροιστική απουσία του *IgfI* και του *IgfII*, τα έμβρυα που προκύπτουν έχουν το μικρότερο μέγεθος, λόγω του μικρού μεγέθους των οργάνων τους.

Εικόνα 4.7. Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *yfp/mcherry* ποντίκια



Εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15 σε *Yfp-mCherry* ποντίκι. Α Εγκάρσια απεικόνιση *yfp-mcherry* ποντικού την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15, από κρυοτομές ποντικών Β. Παρατηρείται έντονη εμφάνιση *yfp-mcherry* κυρίως στο ήπαρ Γ. Πρωτεϊνική ανάλυση των IGF1 και IGFII σε μυ, συκώτι και εγκέφαλο μεταξύ *yfp-mcherry* και *αγρίου τύπου* ποντικών. Ο IGF1 στα *yfp* έμβρυα. Δ. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *IgfI* σε ιστούς (έντερο, εγκέφαλος, μυς, καρδιά, συκώτι) με RT-PCR, όπου παρατηρείται διαφορά μεταξύ των *yfp-mcherry* και *αγρίου τύπου* ποντικών.

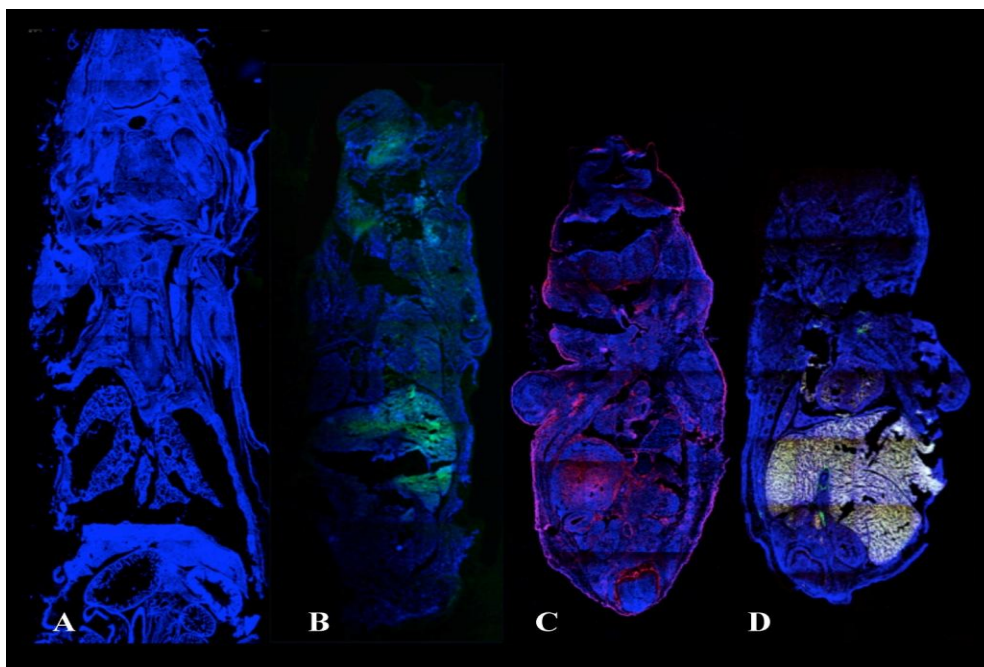
Στην εικόνα ανοσοφθορισμού, παρατηρείται η έκφραση και των δυο πρωτεϊνών YFP και CHERRY, οι οποίοι συνεντοπίζονται στο ήπαρ, από το οποίο παράγονται. Επιπλέον, σε α στον εγκέφαλο και στη σπονδυλική στήλη, εντοπίζονται εύκολα διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων, οι οποίοι εκφράζουν τις πρωτεΐνες YFP και mCHERRY, οδηγώντας στο συμπέρασμα, ότι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί εκφράζουν τους δύο παράγοντες και αυτό οφείλεται κυρίως στη δράση τους.

Απουσία και των δύο παραγόντων, τα επίπεδα έκφρασής τους, σε όλα τα όργανα που μελετήθηκαν, είναι μηδενικά και ειδικά στο έντερο και στη καρδιά, είναι σχεδόν ανύπαρκτα, επιβεβαιώνοντας την αθροιστική τους απουσία. Η πρωτεϊνική ανάλυση, επιβεβαιώνει την απουσία του *IgfII*, ωστόσο όσον αφορά τον *IgfI*, παρατηρείται η έκφρασή του.

4.8. Έκφραση των γονιδίων *yfp* και *mcherry* την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18

Έχοντας πλέον, επιβεβαιώσει ποσοτικά την έκφραση των γονιδίων του *IgfI* και *IgfII*, την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15. Την εμβρυική ημέρα E18, μελετήθηκε μόνο η έκφραση των δύο γονιδίων, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η διαφορετική τους έκφραση σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης. Όπως φαίνεται και από την εικόνα, επιβεβαιώνεται η διαφορά στα μεγέθη τους, καθώς βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Στα έμβρυα με γονότυπο *mcherry-IgfII KO*, η έκφραση του *mcherry* είναι ελλιπής (C), γεγονός, το οποίο δικαιολογείται, από την απουσία του *IgfII*, στα τελευταία στάδια της κύησης. Αντίθετα, σε έμβρυα *yfp-IgfI KO* και τα έμβρυα *yfp-IgfI KO /mcherryIgfII KO*, η έκφραση του *IgfI* είναι εμφανής, εφόσον ο IGF1 είναι ο παράγοντας, που συμμετέχει καθ όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού ενώ πριν τη γέννηση του εμβρύου, τα επίπεδα έκφρασής του αυξάνονται (B).

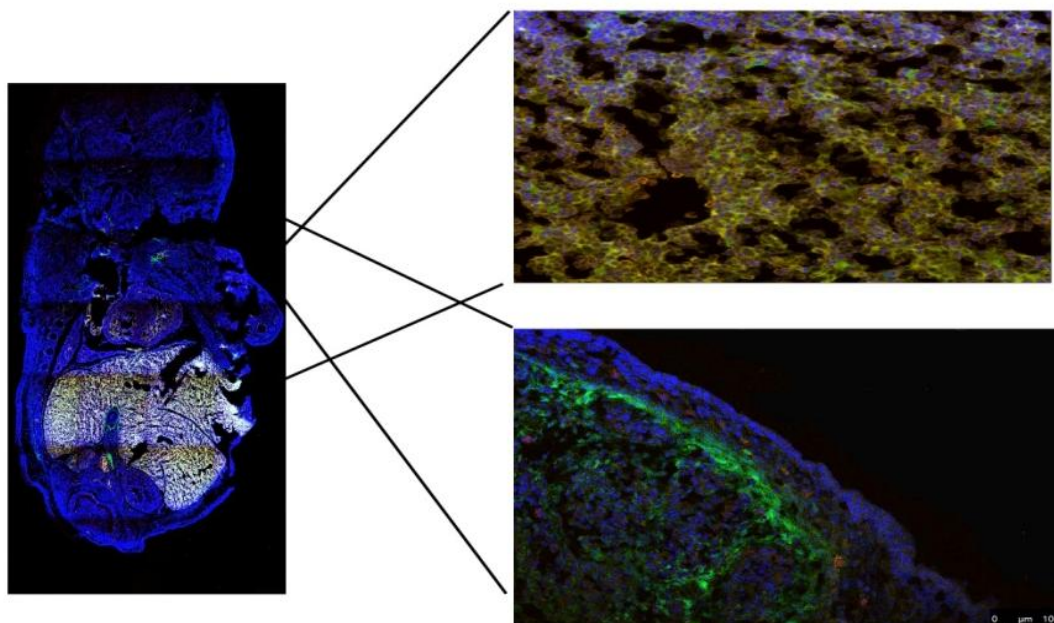
Εικόνα 4.8. Έκφραση των γονιδίων *yfp* και *mcherry* την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18



A. Έμβρυο αγρίου τύπου την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18, **B.** Απεικόνιση *yfp* εμβρύου, παρατηρείται έντονη έκφραση σε ήπαρ και εγκέφαλο, **Γ.** Απεικόνιση *mcherry* εμβρύου, παρατηρείται η έκφρασή του σποραδικά, κυρίως στο δέρμα, στο ήπαρ και στον εγκέφαλο, **Δ.** Απεικόνιση *yfp-mcherry* εμβρύου, όπου παρατηρείται έντονη έκφραση στο ήπαρ.

Συγκεκριμένα, παρατηρώντας σε μεγέθυνση κάθε έμβρυο ξεχωριστά παρατηρείται ότι, στο έμβρυο που εκφράζεται ταυτόχρονα και *yfp* και *mcherry*, η παρουσία και των δύο γονιδίων στο κυτταρόπλασμα είναι εμφανής, ειδικά στο ήπαρ. Η παρακρινής και ενδοκρινής δράση τους φαίνεται ανύπαρκτη, πιθανόν λόγω της απουσίας και των δύο αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο, είναι φανερό, ιδιαίτερα στον εγκέφαλο, ότι άλλα κύτταρα, παράγουν *yfp* και άλλα *cherry*. Ενδεχομένως ο πληθυσμός αυτών των κυττάρων που εκφράζουν *yfp*, να είναι αυξημένος, σε σχέση με αυτά που εκφράζουν *mcherry*. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα του IGF1, αυξάνονται προς το τέλος της κύησης και στην μετέπειτα ενήλικη ζωή. Αντίθετα, η έκφραση του *IgfII* είναι σχεδόν ανύπαρκτη μετά τη γέννηση. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, είναι προφανής η αντίθεση σε σχέση με τα έμβρυα, την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15.

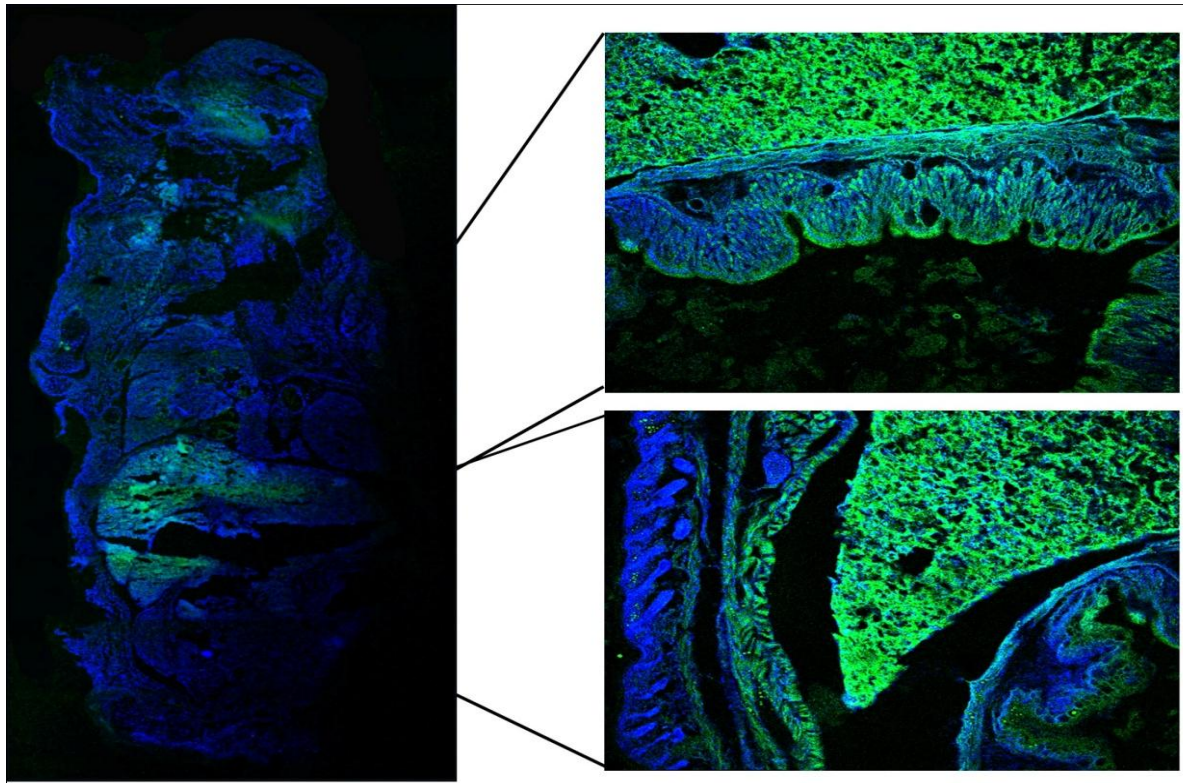
Εικόνα 4.9 Απεικόνιση *yfp-mcherry* εμβρύου την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18.



Απεικόνιση *yfp-mcherry* εμβρύου την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18. Απεικόνιση ολόκληρου εμβρύου, παρατηρείται έντονη εμφάνιση στο ήπαρ. Σε μεγένθυση, πάνω δεξιά, συνεντοπίζονται τα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν *yfp* και *cherry*, στο ήπαρ. Κάτω δεξιά σε ένα σημείο του εγκεφάλου, παρατηρείται, ότι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί εκφράζουν *yfp* και *mcherry*. Γενικά παρατηρείται έντονη έκφραση του *yfp* σε πολλούς ιστούς, σε αντίθεση με το *mcherry*, εικόνα που είναι αντίθετη με την αντίστοιχη των 15 ημερών.

Το ίδιο φαινόμενο, παρατηρείται και στα *yfp* έμβρυα, όπου φαίνεται ότι έντονα η παρουσία *yfp* στο ήπαρ, αλλά και στο χόριο του δέρματος, στη σπονδυλική στήλη και πολύ λίγο στο τμήμα του εντέρου. Σε κάθε περίπτωση, επιβεβαιώνεται, ότι οποιαδήποτε διαφορά στο μέγεθος οφείλεται στο γεγονός ότι ο IGF1, στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, συνεχίζει να εκφράζεται (Constancia et al., 2002).

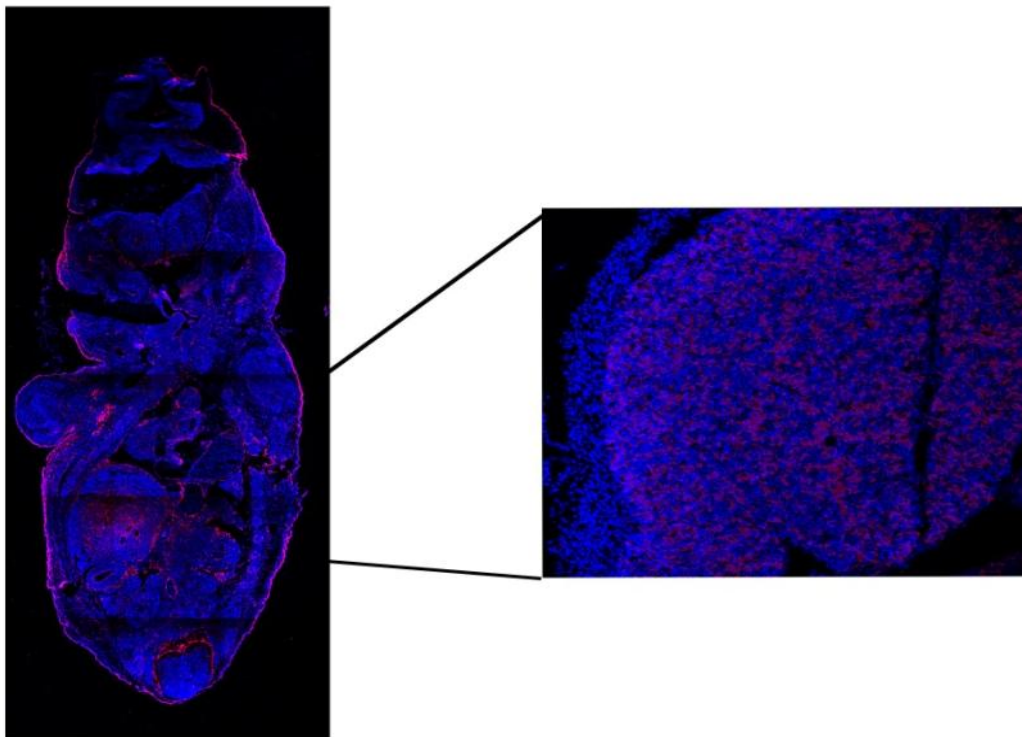
Εικόνα 4.10 Απεικόνιση *yfp* εμβρύου την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18.



Απεικόνιση *yfp* εμβρύου την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18. Απεικόνιση ολόκληρου εμβρύου, παρατηρείται έντονη εμφάνιση στο ήπαρ και στον εγκέφαλο. Σε μεγένθυση, πάνω δεξιά, συνεντοπίζονται τα κύτταρα , τα οποία εκφράζουν *yfp* στο ήπαρ και πολύ λιγότερο στο έντερο και τον σπλήνα. . Κάτω δεξιά, απεικονίζεται πάλι το ήπαρ και η έκφραση του *yfp*, η οποία είναι έντονη σε αυτό το όργανο, αλλά εμφανίζεται και λίγο στο κομμάτι του εντέρου.

Αντίθετα, σε *cherry* έμβρυα 18 ημερών, η παρουσία του *mcherry*, είναι ελλιπής, ακόμα και στα κύτταρα του ήπατος, το οποίο είναι το κατεξοχήν όργανο παραγωγής του IGFII. Η προφανής εξήγηση είναι ότι τα επίπεδα έκφρασης του IGFII πέφτουν κατακόρυφα μετά τη μέση της κύησης, επηρεάζοντας πιθανόν και το μέγεθος του πλακούντα, οπότε η μειωμένη έκφραση του *mcherry*, όπως και το μέγεθος του εμβρύου, μπορεί εκτός των άλλων να οφείλεται και στη μειωμένη πρόσληψη τροφής, σε σχέση με αυτή που προσλαμβάνει ένα φυσιολογικό έμβρυο (Louvi, Accili, & Efstratiadis, 1997) (Constancia et al., 2002).

Εικόνα 4.11 Απεικόνιση *mcherry* εμβρύου την εμβρυική ημέρα E18



Απεικόνιση *mcherry* εμβρύου την εμβρυική ημέρα E18. Αριστερά απεικονίζεται ολόκληρο το έμβρυο και δεξιά φαίνεται σε μεγέθυνση το ήπαρ, όπου η έκφραση του είναι ελλειπής, σε αντίθεση με το εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15.

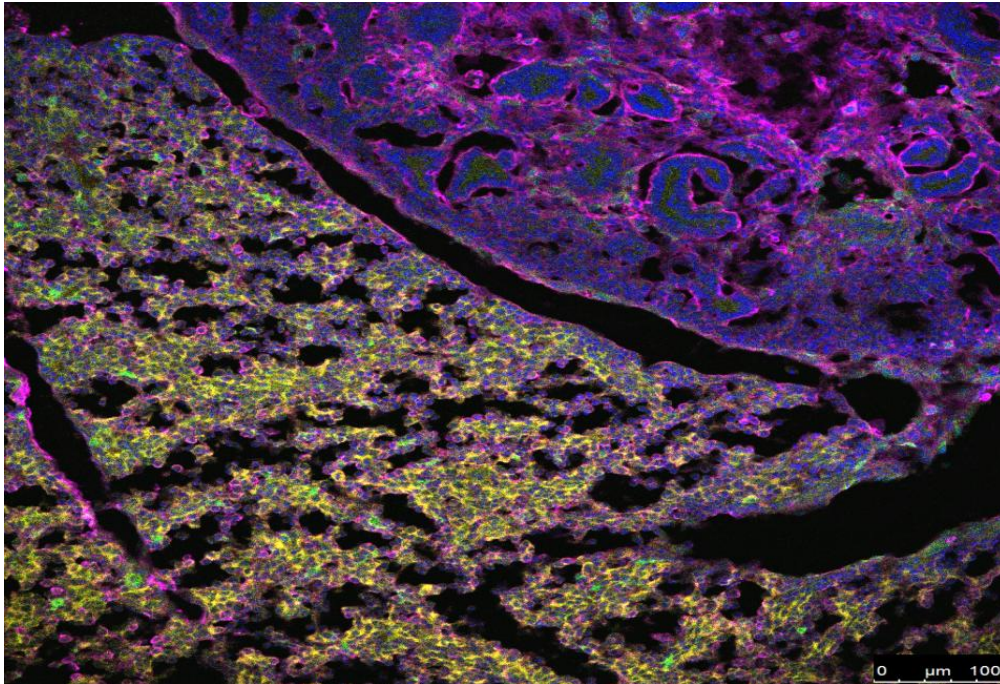
4.9. Χρήση δεικτών κυτταρικής διαφοροποίησης με στόχο τη ταυτοποίηση κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν *yfp* και *mcherry*

Οι δείκτες κυτταρικής διαφοροποίησης, χρησιμοποιούνται κυρίως για τη ταυτοποίηση κυτταρικών πληθυσμών και υποπληθυσμών και το στάδιο διαφοροποίησης και ενεργοποίησης στο οποίο βρίσκονται. Έχοντας αναλύσει και πιστοποιήσει την έκφραση των IGFs από διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, έγινε και μία ενδεικτική πρώτη προσπάθεια να ταυτοποιηθούν οι πληθυσμοί αυτοί βάσει άλλων μοριακών δεικτών που συνεκφράζουν.

Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθεί, ότι στο ήπαρ εμβρύου *yfp-IgfI KO /cherry-IgfII KO*, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ε-καντχερίνης, που είναι ασβέστιο-εξαρτώμενο μόριο προσκόλλησης (e-cadherin). Όπως φαίνεται και στην εικόνα, υπάρχουν κύτταρα που εκφράζουν *yfp* και όχι ε-καντχερίνη, ενώ φαίνεται ότι τα κύτταρα που εκφράζουν *mcherry*, συνεντοπίζουν και ε-καντχερίνη. Επιπλέον προτεινόμενοι δείκτες διαφοροποίησης για το ήπαρ, το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο όργανο παραγωγής και απελευθέρωσης των αυξητικών παραγόντων IGFs είναι οι κερατίνες 7,18,19 (ck7,18,19), η α-φετοπρωτεΐνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, μόρια τα οποία

θα μας βοηθήσουν στο άμεσο μέλλον να ταυτοποιήσουμε καλύτερα τους πληθυσμούς των ηπατικών εμβρυικών κυττάρων που εκφράζουν IGF1 και IGFII.

Εικόνα 4.12 Απεικόνιση ήπατος σε μεγέθυνση (20x), εμβρύου *yfp-IgfI KO /cherry-IgfII KO*



Απεικόνιση ήπατος σε μεγέθυνση (20x), εμβρύου *yfp-IgfI KO /cherry-IgfII KO*. Το μωβ αντιστοιχεί στο δείκτη διαφοροποίησης E-cadherin, ενδεικτική για τη σήμανση επιθηλιακών κυττάρων και τη σύνδεση των ιστών ειδικά κατά την εμβρυογένεση. Στο έντερο, παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση E-cadherin, σε σχέση με το ήπαρ, όπου παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα έκφρασης *yfp* και *mcherry*, επιβεβαιώνοντας τη κυτταροπλασματική τους έκφραση.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οικογένεια των ινσουλινοειδικών αυξητικών παραγόντων (IGFs), περιλαμβάνει δύο συνδέτες (IGF-I και IGF-II), που είναι δομικά ομόλογοι με την προϊνσουλίνη, δύο υποδοχείς (IGF1R και IGF2R), και τουλάχιστον έξι πρωτεΐνες του πλάσματος IGFBPs (LeRoith et al., 1995; Zumkeller & Schofield, 1992). Επειδή οι IGFs παράγονται από πολλούς ιστούς, πιστεύεται ότι λειτουργούν με αυτοκρινή / παρακρινή τρόπο, αν και μπορούν επίσης να δρουν ως κλασική ορμόνες, δεδομένου ότι κυκλοφορούν στο πλάσμα σε συνεργασία με τις IGFBPs.

Τα τελευταία χρόνια, ο χειρισμός της γονιδιακής έκφρασης σε ποντικούς, έχει μελετηθεί ευρέως, όσον αφορά τον ρόλο των IGFs κατά την εμβρυική ανάπτυξη και τις *in vivo* αλληλεπιδράσεις συνδέτη και υποδοχέα, διαμέσου της ανάλυσης του μεταλλαγμένου φαινοτύπου, που προκύπτει από τη διαδικασία knock-out των γονιδίων (Baker et al., 1993), (Efstratiadis, 1998). Η διαγραφή οποιουδήποτε εκ των δύο γονιδίων (*IgfI* ή *IgfII*), επιβραδύνει την ανάπτυξη των εμβρύων σε παρόμοιο βαθμό. Όταν τα δύο γονίδια διαγράφονται ταυτόχρονα, οι επιδράσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου είναι αθροιστικές και προκύπτουν διπλές μεταλλάξεις, που είναι μόνο 30 τοις εκατό του κανονικού σωματικού βάρους (Liu et al., 1993). Η διαγραφή του γονιδίου του υποδοχέα των IGFs (*Igf1r*), προκαλεί πιο σοβαρή καθυστέρηση στην ανάπτυξη, το οποίο υποδηλώνει ότι και οι δύο IGFs δρουν μέσω του υποδοχέα IGF τύπου 1, προκαλώντας την διέγερση του ιστού.

Στα τρωκτικά, η έκφραση του *IgfII* σταματάει λίγες εβδομάδες μετά τη γέννηση, (εκτός από το χοριακό πλέγμα και τη λεπτομήνιγγα) (Stylianopoulou, Herbert, et al., 1988). Έτσι, σε αντίθεση με την εμβρυϊκή ανάπτυξη, η μεταγεννητική ανάπτυξη των ποντικών είναι *IgfII*-ανεξάρτητη και τα ποντίκια που στερούνται τον *IgfII*, γεννιούνται με ένα βάρος περίπου στο 60 %, σε σχέση με το φυσιολογικό. Παρατηρείται δηλαδή, ότι τα ετερόζυγα ποντίκια, απουσία του γονιδίου του *IgfII* πατρικής προέλευσης, *IgfII*(+ / *p*) και τα *IgfII*(-/-) είναι φαινοτυπικά δυσδιάκριτα και εκτός από μια μικρή καθυστέρηση στην οστεοποίηση, δεν παρουσιάζουν αναπτυξιακές ανωμαλίες. Αντίθετα, όταν διαταράσσεται το αλληλόμορφο του *IgfII*, που μεταδίδεται από τη μητέρα, οι απόγονοι είναι φαινοτυπικά φυσιολογικοί, δεδομένου ότι το μητρικό αλληλόμορφο είναι κανονικά αποσιωπημένο (Baker et al., 1993; Hill et al., 1998).

Σε αντίθεση με τον *IgfII*, ο *IgfI* είναι ένας συνδέτης που έχει συνεχή λειτουργία σε όλη την ανάπτυξη του οργανισμού. Ο *IgfI* εκκρίνεται από πολλούς ιστούς, καθορίζοντας τη δράση του. Κυρίως εκκρίνεται από το ήπαρ και μεταφέρεται σε άλλους ιστούς, ενεργώντας ως ενδοκρινής ορμόνη. Ο *IgfI* επίσης εκκρίνεται από άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του χονδροειδή ιστού (χονδροκύτταρα) και δρα τοπικά ως παρακρινής ορμόνη. Επίσης, θεωρείται ότι μπορεί να λειτουργήσει με αυτοκρινή τρόπο, ως ογκογονίδιο. Ο ρόλος του *IgfI* στο μεταβολισμό πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένου αυτών της ανάπτυξης έχει αναθεωρηθεί πρόσφατα. Έτσι, μετά τον τοκετό, ο ρυθμός αύξησης των εμβρύων στα οποία απουσιάζει ο *IgfI* είναι χαμηλότερος από το κανονικό, όπως είναι και κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Κατά συνέπεια, τα ποντίκια παρουσιάζουν 60 % βάρος κατά τη γέννηση σε σχέση με

το φυσιολογικό, να γίνουν 30% σε 8 εβδομάδες και να παραμείνουν σε αυτό το επίπεδο στη συνέχεια .

Συγκεκριμένα, έχει ήδη επιβεβαιωθεί ότι, μεταξύ της εμβρυικής ημέρας E11-E12.5, η εκδήλωση ανεπάρκειας της ανάπτυξης έχει την ίδια επίδραση σε έμβρυα που στερούνται τον *IgfII*, τον *IgfIr* ή και τους δύο, υποδεικνύοντας, ότι ο *IgfIr* αλληλεπιδρά αποκλειστικά με τον *IgfII*. Στην εμβρυική ημέρα E13.5 , ωστόσο , αυτές οι τρεις κατηγορίες μεταλλάξεων γίνονται διακριτές σε μέγεθος : $IgfII > IgfIr > IgfII / IgfIr$ μεταλλάξεις. Έτσι , κάποια στιγμή μεταξύ εμβρυικής ημέρας E12.5 - 13.5, ο *IgfIr*, ο οποίος συνδέεται αρχικά μόνο με τον *IgfII*, ξεκινά μια επιπλέον αλληλεπίδραση με τον *IgfI* , ενώ ο *IgfII* αρχίζει να επίσης αλληλεπιδρά με τον *InsR*. Στη συνέχεια, τα έμβρυα που προκύπτουν εμφανίζουν μέγεθος χαμηλότερο από το κανονικό, ως αποτέλεσμα του μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης.

Για τη μελέτη του συστήματος των IGFs και την ταυτοποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν τους παράγοντες αυτούς, σχεδιάστηκαν δύο ποντίκια που εκφράζουν *yfp* και *cherry*, στη θέση των *IgfI* και *IgfII*, αντίστοιχα, έτσι ώστε να γίνει ταυτοποίηση των κυττάρων, που εκφράζουν τον καθένα από αυτούς τους παράγοντες και το πρότυπο έκφρασης. Στην παρούσα εργασία, παρατηρείται, η διαφορετική έκφραση των *IgfI* και *IgfII*, σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς, τόσο στο ήπαρ, όσο και στα υπόλοιπα όργανα, (εγκέφαλος, καρδιά, μυς). Με τη χρήση διαφόρων δεικτών διαφοροποίησης, μπορούν να μελετηθούν και να ταυτοποιηθούν αναπτυξιακά οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί, στους οποίους εκφράζονται.

Επίσης για πρώτη φορά, δείξαμε ότι υπάρχουν κύτταρα που παράγουν μόνο *yfp* στη θέση του *IgfI* και άλλα που παράγουν μόνο *cherry* στη θέση του *IgfII*. Ωστόσο παρατηρείται ο συνεντοπισμός και των δύο παραγόντων χαρακτηριστικά, σε κύτταρα του ήπατος, από το οποίο παράγονται και στα δύο υπό μελέτη στάδια εμβρυικής ανάπτυξης (E15 και E18). Συγκεκριμένα, παρατηρείται, από τα αποτελέσματα, την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E15, η έκφραση του *IgfII*, στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στο χοριακό πλέγμα και στη λεπτομήνιγγα, όπως είναι αναμενόμενο. Ενώ την εμβρυική ημέρα ανάπτυξης E18, η παρουσία του *cherry* είναι σχεδόν ανύπαρκτη, εντοπίζεται ελάχιστα στο ήπαρ και στο δέρμα. Οπότε επιβεβαιώνεται, η υπόθεση με βάση την οποία, η δράση του *IgfII* ξεκινάει νωρίτερα από τον *IgfI*, αλλά αυτό αντιστρέφεται, μετά τη μέση της κύησης, όπου τα επίπεδα του *IgfII* πέφτουν κατακόρυφα, και στη μεταγεννητική ανάπτυξη, η παρουσία του είναι ανιχνεύσιμη και σε σταθερά επίπεδα. Αντίθετα, ο *IgfI*, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθόλη την ανάπτυξη του οργανισμού. Ωστόσο, πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διευκρινιστεί ακριβώς η αυτοκρινής/παρακρινής και ενδοκρινής δράση των δύο αυξητικών παραγόντων και κατεπέκταση ο ρόλος τους στην εμβρυική ανάπτυξη και οι συνθήκες που τους επηρεάζουν.

Επιπλέον απορρύθμιση του άξονα των IGFs, μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές της ανάπτυξης, όπως ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης (GH), ακρομεγαλία και στο σύνδρομο Laron, που οφείλονται στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του IGF1.

Προγεννητικά, αυτή η δυσλειτουργία, μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό της σωματικής ανάπτυξης ή μακροσωμία, (Roddam et al., 2008). Επιπλέον αναπτυξιακές ανωμαλίες, που προκύπτουν λόγω έλλειψης των IGFs, κυρίως του *IgfI* περιλαμβάνουν μικρό εγκέφαλο, μικρή καρδιά (cardiomicria) και μικρό πηγούνι, που προκύπτει από την υπανάπτυξη του προσώπου και των οστών. Το ίδιο ισχύει και για όσα ποντίκια εμφανίζουν μικρά χέρια και μικρά πόδια (acromicria). Η έλλειψή του συγκεκριμένου παράγοντα, προκαλεί επίσης, την υπανάπτυξη και αδυναμία του μυϊκού συστήματος, βλάπτει και αποδυναμώνει την ανάπτυξη στα νύχια και στα μαλλιά. Μεταβολικά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Beckwith–Wiedemann (BWS), το οποίο οφείλεται σε υπερέκφραση του *IgfII*, λόγω έλλειψης γονιδιακής αποτύπωσης (Eggenchwiler et al., 1997).

Οι IGFs έχουν επίσης σημαντική μιτογόνο δράση και παίζουν ρόλο στην ογκογένεση και τον καρκίνο. Οι δράσεις αυτές ρυθμίζονται από αλληλεπιδράσεις με τις IGFBPs, ιδιαίτερα την IGFBP-3, (Key, Appleby, Reeves, & Roddam, 2010), (Roddam et al., 2008), (Keinan-Boker et al., 2003; Pisani, 2008). Εκτός από την σωματική ανάπτυξη και μιτογόνο δράση, οι IGFs έχουν ευαισθητοποιημένη δράση στην ινσουλίνη και η δυσλειτουργία τους εμπλέκεται στο διαβήτη και στις επιπλοκές του (Pisani, 2008).

Οι αυξητικοί παράγοντες IGFI και IGFIH επηρεάζουν την ανάπτυξη του όγκου και των μεταστάσεων, μέσω της δράσης τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την επιβίωση και την κινητικότητα, καθώς και με τη συνεργασία τους με άλλους αυξητικούς παράγοντες. Επιπλέον, επηρεάζουν και την αγγειογένεση, διεγείροντας τη μετανάστευση, διαφοροποίηση και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (O. H. Lee et al., 2000; Shigematsu et al., 1999).

Μέχρι στιγμής, η πλειονότητα των ποντικών στα οποία απουσιάζει ο IGFI, έχει δείξει ότι πεθαίνουν λίγο μετά τη γέννηση και όσα επιζούν είναι στείρα, γεγονός που περιορίζει σημαντικά τη χρησιμότητα αυτού του μοντέλου για τη μελέτη της ανάπτυξης όγκων (Olivo-Marston et al., 2009). Τα lid (liver induced deletion) ποντίκια παρουσιάζουν μόνο στο ήπαρ, διαγραφή του *IgfI* και παρατηρείται μια μείωση 75% στην κυκλοφορία των επιπέδων του. Αυτά τα ποντίκια είναι ανθεκτικά στην επαγωγή όγκου του παχέος εντέρου και του στήθους. Οι εν λόγω όγκοι που αναπτύσσονται είναι μικροί σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια (Wu, Yakar, Zhao, Hennighausen, & LeRoith, 2002).

Τα ποντίκια αυτά, εμφανίζουν επίσης μειωμένη ανάπτυξη σε ξενομοσχεύματα όγκου (xenografts), σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Επίσης, σε ποντίκια που τρέφονταν με μια περιορισμένη διατροφή εμφανίζεται μειωμένη συχνότητα στην ανάπτυξη διαφόρων όγκων, και ο θερμιδικός περιορισμός μειώνει τα επίπεδα του IGFI. Ενώ η αντικατάσταση του *IgfI* σε ποντίκια με ανεπάρκεια στην p53, η οποία λειτουργεί ως καταστολέας όγκου αντιστρέφουν τις αντικαρκινογόνες επιδράσεις του θερμιδικού περιορισμού (Dunn et al., 1997).

Επιπλέον, σε ποντίκια, με μειωμένα επίπεδα IGFII εμφανίζεται μειωμένος όγκος στο πάγκρεας. Μελέτες έχουν αναφερθεί στην υπερέκφραση του IGFII και έχουν προσδιορίσει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης όγκου και ανάπτυξη, ενώ σε άλλες μελέτες δεν έχει εντοπιστεί καμία αλλαγή στον όγκο.

Στην παρούσα εργασία, παρατηρείται, η διαφορετική έκφραση των IGFΙ και IGFII, σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς, τόσο στο ήπαρ, όσο και στα υπόλοιπα όργανα, (εγκέφαλος, καρδιά, μυς). Με τη χρήση διαφόρων δεικτών διαφοροποίησης, μπορούν να μελετηθούν και να ταυτοποιηθούν αναπτυξιακά οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί, στους οποίους εκφράζονται. Γνωρίζοντας, λοιπόν τους ακριβείς κυτταρικούς υποπληθυσμούς, από τους οποίους προέρχονται οι IGFs, είναι εφικτή οποιαδήποτε μελλοντική διαγνωστική ανάλυση και βελτίωση στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης.



6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adamo, M. L., Ben-Hur, H., LeRoith, D., & Roberts, C. T., Jr. (1991). Transcription initiation in the two leader exons of the rat IGF-I gene occurs from disperse versus localized sites. *Biochem Biophys Res Commun*, 176(2), 887-893.
- Adamo, M. L., Shemer, J., Roberts, C. T., Jr., & LeRoith, D. (1993). Insulin and insulin-like growth factor-I induced phosphorylation in neurally derived cells. *Ann N Y Acad Sci*, 692, 113-125.
- Adolph, E. F. (1970). Physiological stages in the development of mammals. *Growth*, 34(1), 113-124.
- Allen, R. E., & Boxhorn, L. K. (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, 138(2), 311-315. doi: 10.1002/jcp.1041380213
- Bach, L. A., Headey, S. J., & Norton, R. S. (2005). IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol Metab*, 16(5), 228-234. doi: 10.1016/j.tem.2005.05.005
- Bach, M. A., Roberts, C. T., Jr., Smith, E. P., & LeRoith, D. (1990). Alternative splicing produces messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I prohormones that are differentially glycosylated in vitro. *Mol Endocrinol*, 4(6), 899-904. doi: 10.1210/mend-4-6-899
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75(1), 73-82.
- Baxter, R. C., Binoux, M., Clemmons, D. R., Conover, C., Drop, S. L., Holly, J. M., . . . Rosenfeld, R. G. (1998). Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. *Growth Horm IGF Res*, 8(3), 273-274.
- Bayne, M. L., Applebaum, J., Underwood, D., Chicchi, G. G., Green, B. G., Hayes, N. S., & Cascieri, M. A. (1989). The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type 1 IGF receptor. *J Biol Chem*, 264(19), 11004-11008.
- Bell, A. C., & Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature*, 405(6785), 482-485. doi: 10.1038/35013100
- Binz, K., Joller, P., Froesch, P., Binz, H., Zapf, J., & Froesch, E. R. (1990). Repopulation of the atrophied thymus in diabetic rats by insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(10), 3690-3694.
- Caroni, P., & Grandes, P. (1990). Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol*, 110(4), 1307-1317.
- Clemmons, D. R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8(1), 45-62.
- Clemmons, D. R., Busby, W. H., Arai, T., Nam, T. J., Clarke, J. B., Jones, J. I., & Ankrapp, D. K. (1995). Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res*, 6(2-4), 357-366.
- Cohen, P. (2006). Controversy in clinical endocrinology: problems with reclassification of insulin-like growth factor I production and action disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(11), 4235-4236. doi: 10.1210/jc.2006-1641
- Cohick, W. S., & Clemmons, D. R. (1993). The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, 55, 131-153. doi: 10.1146/annurev.ph.55.030193.001023

- Constancia, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., . . . Reik, W. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*, 417(6892), 945-948. doi: 10.1038/nature00819
- D'Ercole, A. J., Applewhite, G. T., & Underwood, L. E. (1980). Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol*, 75(2), 315-328.
- Daughaday, W. H. (1982). Divergence of binding sites, in vitro action, and secretory regulation of the somatomedin peptides, IGF-I and IGF-II. *Proc Soc Exp Biol Med*, 170(3), 257-263.
- Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D., Jr., van den Brande, J. L., & van Wyk, J. J. (1972). Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, 235(5333), 107.
- Daughaday, W. H., Parker, K. A., Borowsky, S., Trivedi, B., & Kapadia, M. (1982). Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal, and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II radioreceptor assay (RRA), and multiplication-stimulating activity RRA after acid-ethanol extraction. *Endocrinology*, 110(2), 575-581. doi: 10.1210/endo-110-2-575
- Daughaday, W. H., & Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, 10(1), 68-91. doi: 10.1210/edrv-10-1-68
- DeChiara, T. M., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64(4), 849-859.
- Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., & Forbes, B. E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(4-5), 421-439. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.004
- Dunn, S. E., Kari, F. W., French, J., Leininger, J. R., Travlos, G., Wilson, R., & Barrett, J. C. (1997). Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res*, 57(21), 4667-4672.
- Edwall, D., Schalling, M., Jennische, E., & Norstedt, G. (1989). Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology*, 124(2), 820-825. doi: 10.1210/endo-124-2-820
- Efstratiadis, A. (1998). Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol*, 42(7), 955-976.
- Eggenchwiler, J., Ludwig, T., Fisher, P., Leighton, P. A., Tilghman, S. M., & Efstratiadis, A. (1997). Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev*, 11(23), 3128-3142.
- Evans, T., DeChiara, T., & Efstratiadis, A. (1988). A promoter of the rat insulin-like growth factor II gene consists of minimal control elements. *J Mol Biol*, 199(1), 61-81.
- Falconer, J., Davies, J. J., Zhang, H. P., & Smith, R. (1991). Release of insulin-like growth factor I by the sheep placenta in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 3(4), 379-384.
- Fernandez, A. M., Kim, J. K., Yakar, S., Dupont, J., Hernandez-Sanchez, C., Castle, A. L., . . . LeRoith, D. (2001). Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev*, 15(15), 1926-1934. doi: 10.1101/gad.908001
- Florini, J. R., & Magri, K. A. (1989). Effects of growth factors on myogenic differentiation. *Am J Physiol*, 256(4 Pt 1), C701-711.
- Froesch, E. R., & Zapf, J. (1985). Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologia*, 28(8), 485-493.

- Geduspan, J. S., Padanilam, B. J., & Solursh, M. (1993). Mesonephros derived IGF I in early limb development. *Prog Clin Biol Res*, 383B, 673-681.
- Gluckman, P. D., Johnson-Barrett, J. J., Butler, J. H., Edgar, B. W., & Gunn, T. R. (1983). Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 19(3), 405-413.
- Green, H., Morikawa, M., & Nixon, T. (1985). A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*, 29(3), 195-198.
- Han, V. K., Lund, P. K., Lee, D. C., & D'Ercole, A. J. (1988). Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab*, 66(2), 422-429. doi: 10.1210/jcem-66-2-422
- Hill, D. J., & Logan, A. (1992). Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis. *Prog Growth Factor Res*, 4(1), 45-68.
- Hill, D. J., Petrik, J., & Arany, E. (1998). Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care*, 21 Suppl 2, B60-69.
- Hynes, M. A., Brooks, P. J., Van Wyk, J. J., & Lund, P. K. (1988). Insulin-like growth factor II messenger ribonucleic acids are synthesized in the choroid plexus of the rat brain. *Mol Endocrinol*, 2(1), 47-54. doi: 10.1210/mend-2-1-47
- Jones, J. I., & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, 16(1), 3-34. doi: 10.1210/edrv-16-1-3
- Juul, A. (2003). Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res*, 13(4), 113-170.
- Kajimoto, Y., & Rotwein, P. (1990). Evolution of insulin-like growth factor I (IGF-I): structure and expression of an IGF-I precursor from *Xenopus laevis*. *Mol Endocrinol*, 4(2), 217-226. doi: 10.1210/mend-4-2-217
- Keinan-Boker, L., Bueno De Mesquita, H. B., Kaaks, R., Van Gils, C. H., Van Noord, P. A., Rinaldi, S., . . . Peeters, P. H. (2003). Circulating levels of insulin-like growth factor I, its binding proteins -1,-2, -3, C-peptide and risk of postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer*, 106(1), 90-95. doi: 10.1002/ijc.11193
- Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., & Roddam, A. W. (2010). Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol*, 11(6), 530-542. doi: 10.1016/s1470-2045(10)70095-4
- Kurtz, A., Zapf, J., Eckardt, K. U., Clemons, G., Froesch, E. R., & Bauer, C. (1988). Insulin-like growth factor I stimulates erythropoiesis in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(20), 7825-7829.
- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*, 54(5), 311-316.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L., & Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*, 22(1), 53-74. doi: 10.1210/edrv.22.1.0419
- Lee, J. E., Pintar, J., & Efstratiadis, A. (1990). Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development*, 110(1), 151-159.
- Lee, J. T., Davidow, L. S., & Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet*, 21(4), 400-404. doi: 10.1038/7734
- Lee, O. H., Bae, S. K., Bae, M. H., Lee, Y. M., Moon, E. J., Cha, H. J., . . . Kim, K. W. (2000). Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models. *Br J Cancer*, 82(2), 385-391. doi: 10.1054/bjoc.1999.0931

- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., & Roberts, C. T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, 16(2), 143-163. doi: 10.1210/edrv-16-2-143
- Levinovitz, A., Jennische, E., Oldfors, A., Edwall, D., & Norstedt, G. (1992). Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation. *Mol Endocrinol*, 6(8), 1227-1234. doi: 10.1210/mend.6.8.1406701
- Lewis, K. J., Molan, P. C., Bass, J. J., & Gluckman, P. D. (1988). The lipolytic activity of low concentrations of insulin-like growth factors in ovine adipose tissue. *Endocrinology*, 122(6), 2554-2557. doi: 10.1210/endo-122-6-2554
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75(1), 59-72.
- Louvi, A., Accili, D., & Efstratiadis, A. (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol*, 189(1), 33-48. doi: 10.1006/dbio.1997.8666
- Lu, K., & Campisi, J. (1992). Ras proteins are essential and selective for the action of insulin-like growth factor 1 late in the G1 phase of the cell cycle in BALB/c murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3889-3893.
- Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A. J., Davenport, M. L., & Efstratiadis, A. (1996). Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev Biol*, 177(2), 517-535. doi: 10.1006/dbio.1996.0182
- McClain, D. A. (1990). Insulin action in cells expressing truncated or kinase-defective insulin receptors. Dissection of multiple hormone-signaling pathways. *Diabetes Care*, 13(3), 302-316.
- Mesiano, S., Young, I. R., Baxter, R. C., Hintz, R. L., Browne, C. A., & Thorburn, G. D. (1987). Effect of hypophysectomy with and without thyroxine replacement on growth and circulating concentrations of insulin-like growth factors I and II in the fetal lamb. *Endocrinology*, 120(5), 1821-1830. doi: 10.1210/endo-120-5-1821
- Mochizuki, T., Sakai, K., & Iwashita, M. (2006). Effects of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) on endometrial cancer (HHUA) cell apoptosis and EGF stimulated cell proliferation in vitro. *Growth Horm IGF Res*, 16(3), 202-210. doi: 10.1016/j.ghir.2006.05.002
- Monzavi, R., & Cohen, P. (2002). IGFs and IGFBPs: role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16(3), 433-447.
- Moran, A., Brown, D. M., Kim, Y., & Klein, D. J. (1991). Effects of IGF-I and glucose on protein and proteoglycan synthesis by human fetal mesangial cells in culture. *Diabetes*, 40(10), 1346-1354.
- Mulroney, S. E., Lumpkin, M. D., & Haramati, A. (1991). Suppression of growth hormone release restores phosphaturic response to PTH in immature rats. *Am J Physiol*, 261(6 Pt 2), F1110-1113.
- Nakae, J., Kido, Y., & Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev*, 22(6), 818-835. doi: 10.1210/edrv.22.6.0452
- Netchine, I., Azzi, S., Le Bouc, Y., & Savage, M. O. (2011). IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25(1), 181-190. doi: 10.1016/j.beem.2010.08.005
- Neuenschwander, S., Schwartz, A., Wood, T. L., Roberts, C. T., Jr., Hennighausen, L., & LeRoith, D. (1996). Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF

- system in a transgenic mouse model. *J Clin Invest*, 97(10), 2225-2232. doi: 10.1172/jci118663
- Nielsen, F. C. (1992). The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res*, 4(3), 257-290.
- Oberbauer, A. M. (2013). The Regulation of IGF-1 Gene Transcription and Splicing during Development and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 39. doi: 10.3389/fendo.2013.00039
- Ohlsson, R., Hedborg, F., Holmgren, L., Walsh, C., & Ekstrom, T. J. (1994). Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. *Development*, 120(2), 361-368.
- Olivo-Marston, S. E., Hursting, S. D., Lavigne, J., Perkins, S. N., Maarouf, R. S., Yakar, S., & Harris, C. C. (2009). Genetic reduction of circulating insulin-like growth factor-1 inhibits azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mice. *Mol Carcinog*, 48(12), 1071-1076. doi: 10.1002/mc.20577
- Otis, E. M., & Brent, R. (1954). Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat Rec*, 120(1), 33-63.
- Pahlman, S., Meyerson, G., Lindgren, E., Schalling, M., & Johansson, I. (1991). Insulin-like growth factor I shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(22), 9994-9998.
- Pfeifer, K. (2000). Mechanisms of genomic imprinting. *Am J Hum Genet*, 67(4), 777-787. doi: 10.1086/303101
- Pisani, P. (2008). Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies. *Arch Physiol Biochem*, 114(1), 63-70. doi: 10.1080/13813450801954451
- Pollak, M. (2007). Insulin-like growth factor-related signaling and cancer development. *Recent Results Cancer Res*, 174, 49-53.
- Pollak, M. N. (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp*, 262, 84-98; discussion 98-107, 265-108.
- Riedemann, J., & Macaulay, V. M. (2006). IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer*, 13 Suppl 1, S33-43. doi: 10.1677/erc.1.01280
- Rinderknecht, E., & Humbel, R. E. (1976). Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(7), 2365-2369.
- Roberts, C. T., Jr., Brown, A. L., Graham, D. E., Seelig, S., Berry, S., Gabbay, K. H., & Rechler, M. M. (1986). Growth hormone regulates the abundance of insulin-like growth factor I RNA in adult rat liver. *J Biol Chem*, 261(22), 10025-10028.
- Roddam, A. W., Allen, N. E., Appleby, P., Key, T. J., Ferrucci, L., Carter, H. B., . . . Galan, P. (2008). Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann Intern Med*, 149(7), 461-471, W483-468.
- Rotwein, P. (1986). Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(1), 77-81.
- Salmon, W. D., Jr., & Daughaday, W. H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*, 49(6), 825-836.
- Sara, V. R., & Hall, K. (1990). Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev*, 70(3), 591-614.
- Sasaki, H., Ishihara, K., & Kato, R. (2000). Mechanisms of Igf2/H19 imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. *J Biochem*, 127(5), 711-715.

- Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R. E., & Froesch, E. R. (1982). Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature*, 296(5854), 252-253.
- Shavlakadze, T., Winn, N., Rosenthal, N., & Grounds, M. D. (2005). Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res*, 15(1), 4-18. doi: 10.1016/j.ghir.2004.11.001
- Shigematsu, S., Yamauchi, K., Nakajima, K., Iijima, S., Aizawa, T., & Hashizume, K. (1999). IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J*, 46 Suppl, S59-62.
- Simmons, R. A., Flozak, A. S., & Ogata, E. S. (1993). The effect of insulin and insulin-like growth factor-I on glucose transport in normal and small for gestational age fetal rats. *Endocrinology*, 133(3), 1361-1368. doi: 10.1210/endo.133.3.8365373
- Singh, J. S., Rall, L. B., & Styne, D. M. (1991). Insulin-like growth factor I and II gene expression in Balb/C mouse liver during postnatal development. *Biol Neonate*, 60(1), 7-18.
- Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C., & Rubin, C. S. (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 263(19), 9402-9408.
- Snow, M. H. (1981a). Autonomous development of parts isolated from primitive-streak-stage mouse embryos. Is development clonal? *J Embryol Exp Morphol*, 65 Suppl, 269-287.
- Snow, M. H. (1981b). Growth and its control in early mammalian development. *Br Med Bull*, 37(3), 221-226.
- Snow, M. H., & Bennett, D. (1978). Gastrulation in the mouse: assessment of cell populations in the epiblast of tw18/tw18 embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 47, 39-52.
- Soares, M. B., Turken, A., Ishii, D., Mills, L., Episkopou, V., Cotter, S., . . . Efstratiadis, A. (1986). Rat insulin-like growth factor II gene. A single gene with two promoters expressing a multitranscript family. *J Mol Biol*, 192(4), 737-752.
- Stull, M. A., & Wood, T. L. (2003). Expression of the IGFs, IGF-IR and IGFBPs in the normal mammary gland and breast. *Breast Dis*, 17, 15-26.
- Stylianopoulou, F., Efstratiadis, A., Herbert, J., & Pintar, J. (1988). Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during rat embryogenesis. *Development*, 103(3), 497-506.
- Stylianopoulou, F., Herbert, J., Soares, M. B., & Efstratiadis, A. (1988). Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(1), 141-145.
- Sullivan, M. J., Taniguchi, T., Jhee, A., Kerr, N., & Reeve, A. E. (1999). Relaxation of IGF2 imprinting in Wilms tumours associated with specific changes in IGF2 methylation. *Oncogene*, 18(52), 7527-7534. doi: 10.1038/sj.onc.1203096
- Thorvaldsen, J. L., Verona, R. I., & Bartolomei, M. S. (2006). X-tra! X-tra! News from the mouse X chromosome. *Dev Biol*, 298(2), 344-353. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.07.011
- Trippel, S. B., Corvol, M. T., Dumontier, M. F., Rappaport, R., Hung, H. H., & Mankin, H. J. (1989). Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res*, 25(1), 76-82. doi: 10.1203/00006450-198901000-00017
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., . . . et al. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*, 5(10), 2503-2512.

- Vincent, A. M., & Feldman, E. L. (2002). Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res*, 12(4), 193-197.
- Wu, Y., Yakar, S., Zhao, L., Hennighausen, L., & LeRoith, D. (2002). Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res*, 62(4), 1030-1035.
- Yang, S., Alnaqeeb, M., Simpson, H., & Goldspink, G. (1996). Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil*, 17(4), 487-495.
- Yao, W., Zhong, J., Yu, J., Warner, T., Bozic, T., Ye, P., . . . Lee, W. H. (2008). IGF-I improved bone mineral density and body composition of weaver mutant mice. *Growth Horm IGF Res*, 18(6), 517-525. doi: 10.1016/j.ghir.2008.04.006
- Zapf, J., & Froesch, E. R. (1986). [Acromegaly and insulin-like growth factors]. *Schweiz Med Wochenschr*, 116(3), 71-77.
- Zumkeller, W., & Schofield, P. N. (1992). The role of insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in the physiological and pathological processes of the kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 62(4), 207-220.

