ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μετατροπή μεσεγχυματικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα

Άννυ Τ. Μερτζανιάν

Επιβλέπουσα: **κ.Τζέτη Μαρία,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής

ΑΘΗΝΑ
Οκτώβριος 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μετατροπή Μεσεγχυματικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα

Άννυ Τ. Μερτζανιάν
Α.Μ.: 20160649

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ **κ. Τζέτη Μαρία,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ **κ. Τζέτη Μαρία,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής
κ. Traeger-Συνοδινού J. Καθηγήτρια Γενετικής
κ.Φρυσίρα Ελένη,Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής

Οκτώβριος, 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βλαστικά κύτταρα αποτελούν αδιαφοροποίητα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της αυτοανανέωσης, της πολυδυναμίας και της in vivo ανασύστασης λειτουργικών ιστών. Προέρχονται από τα πρώιμα στάδια δημιουργίας ζυγωτού και μπορούν να δώσουν γένεση σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Συγκεκριμένα στην κατηγορία των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων συναντώνται τα Εμβρυονικά βλαστοκύτταρα(ESCs) που πρόερχονται από την εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης και έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε ιστούς και των 3 βλαστικών δερμάτων. Το απεριόριστο αδιαφοροποίητο πολλαπλασιαστικό δυναμικό καθώς και η ικανότητα διαφοροποίησης τους αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο στο κομμάτι της έρευνας και της αναγεννητικής ιατρικής, ερχόμενο όμως σε σύγκρουση με ηθικούς φραγμούς και διλλήματα. Την λύση σε αυτό έρχονται να δώσουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, όπου το 2006 οι Takahasi και Yamanaka κατάφεραν να επάγουν πολυδυναμία σε σωματικά κύτταρα χρησιμοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας και ανοίγοντας νέου ορίζοντες στην έρευνα και στην Εξατομικευμένη Ιατρική. Τα χαρακτηριστικά των iPSCs που προσομοιάζουν αυτά των ESCs σηματοδοτούν την ευρεία χρήση τους προς διάφορες κατευθύνσεις με κυριότερες: μοντελοποίηση ασθενειών(Νοσοειδικά iPSCs), μελέτη φαρμάκων και μελλοντικά γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η δημιουργία ειδικών iPSCs ως προς το DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας χρησιμοποιώντας μέθοδο επαναπρογραμματισμού με συνθετικά μόρια mRNA που εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας *OCt4, Sox2, Klf4, Lin28, c –Myc*, σε μεσεγχυματικά κύτταρα από τον μυελό των οστών (BM – MSCs) ασθενούς με το συγκεκριμένο σύνδρομο, που εμφάνιζε μια ομόζυγη έλλειψη 4 βάσεων. Πραγματοποιήθηκε επιτυχής επαναπρογραμματισμός των BM – MSCs και δημιουργία DOCK8iPSCs με απόδοση της μεθόδου 0,4%. Τα DOCK8iPSCs ελέγχθηκαν επιτυχώς ως προς την ταυτοποίηση τους, πολυδυναμία τους και την γενετική τους σταθερότητα.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της παρούσης διπλωματικής εργασίας δημιουργήθηκαν για πρώτη φορά, σύμφωνα με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, πολυδύναμα, γενετικά σταθερά και νοσοειδικά iPSCs για το DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας με μια ασφαλή και υψηλής απόδοσης μέθοδο κυτταρικού επαναπρογραματισμού, θέτοντας τα θεμέλια για τη μοντελοποίηση της νόσου και τον σχεδιασμό, με τις απαραίτητες περαιτέρω μελέτες, πιθανών θεραπειών της.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ : Κυτταρικός Επαναπρογραμματισμός, Νοσοειδικά - iPSCs, συνθετικά μόρια mRNA, DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας, BM - MSCs

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells characterized by the ability of self-renewal, pluripotency and in vivo reconstitution of functional tissues. They come from the early stages of zygote formation and can give birth to all tissues of the human body. Specifically in the category of pluripotent stem cells are embryonic stem cells (ESCs) that come from the internal mass of the blastocyst and are able to differentiate into the tissues of all 3 germinal skins. Unlimited undifferentiated reproductive potential as well as their ability to differentiate has been an important tool in the field of research and regenerative medicine, but it is confronted with moral barriers and dilemmas. The solution to this comes from induced pluripotent stem cells, where in 2006 Takahasi and Yamanaka succeeded in inducing somatic cell pluripotency using pluripotent transcription factors and opening new horizons for research and personalized medicine. The characteristics of iPSCs that resemble those of ESCs signal their widespread use in several directions: disease modeling (Disease - specific iPSCs), drug study and future gene and cell therapy.

The purpose of this study was to develop specific iPSCs for DOCK8 Immunodeficiency Syndrome using a reprogramming method with synthetic mRNA molecules that express the transcription factors OCt4, Sox2, Klf4, Lin28, c -Myc, in mesenchymal stem cells (BM cells). - MSCs) a patient with this syndrome, who had a 4-base homozygous deficiency. Successful reprogramming of BM - MSCs and creation of DOCK8iPSCs with 0.4% yield was performed. The DOCK8iPSCs were successfully tested for their identification, pluripotency, and genetic stability.

Evaluating the results of this thesis was the first time that, according to existing literature, pluripotent, genetically stable and disease-specific iPSCs for the DOCK8 Immunodeficiency Syndrome were established with a safe and high-yield method of cell reprogramming, laying the foundations for the study of the method and planning, with the necessary further studies, possible therapies.

KEYWORDS: Cell Reprogramming, Disease-specific iPSCs, synthetic mRNA, DOCK8 Immunodeficiency Syndrome, BM - MSCs

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ.Τζέτη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής για την εμπιστόσυνη που μου έδειξε, την διαρκή επίβλεψη της αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές της, ώστε να πραγματοποιησω την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.
Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Γουσέτη Ευγένιο, Διευθυντή ΕΣΥ της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών(ΜΜΜΟ) του Νοσοκομείου Παίδων ΄΄Αγία Σοφία΄΄, για την καθοδήγηση του και την σημαντική στήριξή του καθ'όλη τη διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά την Σφουγκατάκη Ειρήνη , μέλος τους Εργ. Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών για την πολύτιμη βοήθεια της και την εκπαίδευση που που προσέφερε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ δεν θα μπορούσε να λείπει από, την Μυρτώ Πούλου και τον Αναστάσιο Μητράκο, για την σημαντική τους καθοδήγηση, βοήθεια και στήριξη, καθώς και από όλα τα μέλη του Εργ. ΜΜΜΟ και του Εργ. Ιατρικής Γενετικής για την συμβολή τους και την άψογη συνεργασία.
Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα, επίσης να ευχαριστήσω όλους τους ομιλητές και καθοδηγητές εργαστηρίων και διαλέξεων αυτά τα δύο χρόνια διάρκειας του Μεταπτυχιακού, καθώς χωρίς την παρουσία τους δεν θα είχα λάβει τις απαραίτητες γνώσεις τόσο για την εκπόνηση της Διπλωματικής μου Εργασίας, όσο και για την μετέπειτα πορεία μου.
Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, τον αδελφό μου και τους φίλους μου που ήταν πάντα δίπλα μου γεμίζοντας με υπομονή και δύναμη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ **10**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **11**

1.1 Βλαστικά ή στελεχιαία κύτταρα **11**

1.2 Ιστορία πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων **12**

1.2.1 Εμβρυονικά βλαστοκύτταρα 13

1.2.2 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα 15

1.3 Μέθοδοι κυτταρικού επαναπρογραμματισμού για τηνπαραγωγή iPSCs **17**

1.3.1 Μέθοδος επαναπρογραμματισμού με ενσωμάτωση γενετικού υλικού 18

1.3.2 DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς την ενσωμάτωση γενετικού υλικού 18

1.3.3 Μη DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμο χωρίς την ενσωμάτωση γενετικού υλικού 19

1.4 Μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας **20**

1.5 Εφαρμογή των iPSCs **22**

1.5.1 Μοντελοποίηση ασθενειών και μελέτη φαρμάκων 23

1.5.2 Αναγεννητική Ιατρική και iPSCs 28

1.6 Περιορισμοί που σχετίζονται με την χρήση των iPSCs **31**

1.7 Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα **33**

1.8 DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας **36**

1.9 Σκοπός **39**

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **40**

2.1 Απομόνωση και απόψυξη μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων **41**

2.2 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων **43**

2.3 Βαθμιαία κρυοκατάψυξη μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων **44**

2.4 Επαναπρογραμματισμός μεσεγχυματικών κυττάρων σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα – Μέθοδος με συνθετικά μόρια mRNA **48**

2.5 Κυτταρικές σειρές επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων(iPSCs)..... 49

2.6 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων..... 50

2.7 Μελέτη έκφρασης μοριακών δεικτών πολυδυναμίας στις iPSCs σειρές 51

2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA 55

2.7.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR) 56

2.8 Μελέτη γενετικής σταθερότητας των iPSCs σειρών 62

2.8.1 Απομόνωση γενωμικού DNA 62

2.8.2 Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός (aCGH)..... 63

2.9 Μελέτη της αλληλουχίας και ταυτοποίηση μετάλλαξης στο DOCK8 γονίδιο στα BM-MSCs και στις iPSCs σειρές..... 65

2.9.1 Αντίδραση PCR με συγκεκριμένους εκκινητές για το DOCK8 γονίδιο..... 65

2.9.2 Αντίδραση Sanger Sequencing..... 66

2.10 In vitro έλεγχος πολυδυναμίας των iPSCs σειρών με τη δημιουργία εμβρυικών σωματιδίων 68

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... 69

3.1 Δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs) μέσω επαναπρογραμματισμού με συνθετικά μόρια mRNA..... 69

3.2 Δημιουργία DOCK8 iPSCs σειρών..... 71

3.3 Χαρακτηρισμός DOCK8 iPSCs 72

3.3.1 Έλεγχος πολυδυναμίας DOCK8 iPSCs σειρών 73

3.3.2 Αξιολόγηση γενετικής σταθερότητας DOCK8 iPSCs..... 76

3.3.3 In vitro μελέτη δυναμικού πολυδυναμίας 77

3.3.4 Αξιολόγηση παραγωγής νοσοειδικών iPSCs(Disease- specific iPSCs)..... 78

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 81

5. ΕΙΚΟΝΕΣ, ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΑ 87

5.1 Παράθεση Πινάκων..... 87

5.2 Παράθεση Σχημάτων..... 87

5.3 Παράθεση Εικόνων..... 88

6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ..... 89

7. ΑΝΑΦΟΡΕΣ 90

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

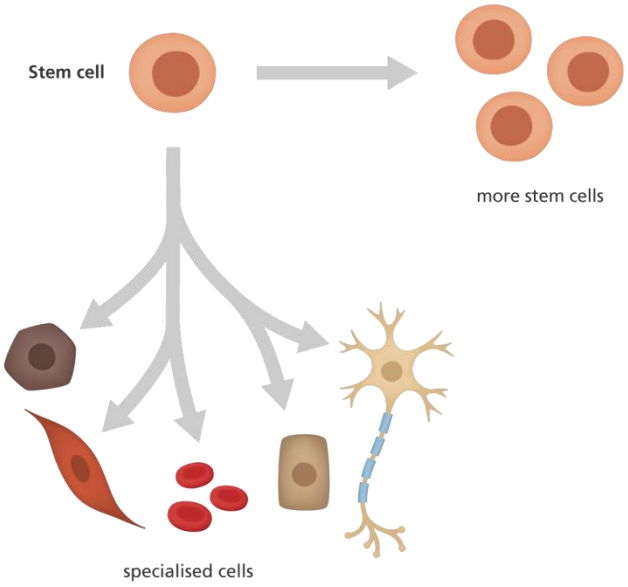
Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, της Ογκολογικής Μονάδας Παίδων ΄΄Αγία Σοφία΄΄, καθώς και στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2018 – Μάρτιος 2019.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βλαστικά ή στελεχιαία κύτταρα(stem cells)

Με τον όρο βλαστικά κύτταρα αναφερόμαστε σε κύτταρα μη διαφοροποιημένα που θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από 3 βασικές ιδιότητες: Αρχικά, θα πρέπει να έχουν την ιδιότητα της *αυτοανανέωσης (self – renewal)* δηλαδή να χαρακτηρίζονται από ένα απεριόριστο πολλαπλασιαστικό δυναμικό χωρίς να υφίστανται βιολογική γήρανση και χωρίς να χάνεται η ικανότητα διαφοροποίηση τους. Η αυτοανανέωση των κυττάρων αναφέρεται είτε σε παραγωγή δύο όμοιων θυγατρικών κυττάρων που διατηρούν τα χαρακτηριστικά του κυττάρου από το οποίο προήλθαν (συμμετρικές διαιρέσεις) είτε στην παραγωγή ενός θυγατρικού και ενός προγονικού κυττάρου(ασύμμετρες διαιρέσεις). Το θυγατρικό κύτταρο διατηρεί όλες τις ιδιότητες του μητρικού κυττάρου ενώ το προγονικό θα δώσει γένεση στα μεταβατικά – πολλαπλασιαστικά κύτταρα (transit- amplifying cells, TA) τα οποία ενώ διατηρούν κάποιο ποσοστό αυτοανανέωσης, έχουν πολλές διαφοροποιημένες λειτουργίες καταλήγοντας τελικά σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα (terminally differentiated, TD)(εικόνα 1.1). Η δεύτερη ιδιότητα που χαρακτηρίζει ένα κύτταρο βλαστικό είναι η *πολυδυναμία,* η ικανότητα τους δηλαδή να διαφοροποιούνται προς πολλούς κυτταρικούς τύπους τόσο in vivo όσο και σε in vitro πειράματα. Ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης τους , ο βαθμός πολυδυναμίας τους τα διαχωρίζει σε ολοδύναμα (totipotent), πολυδύναμα (pluripotent) και πλειοδύναμα (multipotent).

Τέλος, τα βλαστικά κύτταρα ανάλογα με τον βαθμό πολυδυναμίας τους έχουν την ικανότητα της in vivo ανασύστασης λειτουργικών ιστών



Εικόνα 1.1 Απεικόνιση αυτοανανέωσης βλαστικών στελεχιαίων κυττάρων(Genome Research Limited)

Ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι η πλέον αδιαφοροποίητη μορφή κυττάρων που συναντώνται κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το ζυγωτό καθώς και τα κύτταρα που προκύπτουν με τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις μέχρι το στάδιο του μοριδίου. Δεν έχουν υποστεί καμία διαφοροποίηση και μπορούν να δώσουν γένεση τόσο σε εμβρυϊκούς όσο και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς (Mitalipov et al.,2009). Συγκεκριμένα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε περισσότερους από 250 κυτταρικούς τύπους, όπως σε νευρικά κύτταρα, μυϊκά κύτταρα, του δέρματος,κύτταρα του αίματος, χονδροκύτταρα κ.α (Rossant J. et al., 2001).

Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι εκείνα που προέρχονται από την έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM) της βλαστοκύστης(Thompson et al., 1998). Τα κύτταρα αυτά είναι πιο εξειδικευμένα, διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης αλλά δεν σχηματίζουν εξωεμβρυϊκούς ιστούς ή τον πλακούντα. Διαφοροποιούνται στα 3 βλαστικά δέρματα: εξώδερμα, μεσόδερμα,ενδόδερμα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Embryonic stem cells, ESCs) που προέρχονται από το εσωτερικό της βλαστοκύστης και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs). Τα κύτταρα αυτά δημιουργούνται in

vitro μετά από κυτταρικό επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων και παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (Takahasi et al., 2006)

Πλειοδύναμα βλαστικά κύτταραέχουν περιορισμένο δυναμικό αυτοανανέωσης και διαφοροποιούνται μόνο σε ένα περιορισμένο εύρος κυτταρικών τύπων ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται. Στην κατηγορία αυτή τοποθετούνται τα ενήλικα ή σωματικά βλαστικά/ στελεχιαία κύτταρα (Menon et al., 2006).

1.2 Ιστορία πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων

1.2.1 Εμβρυονικά βλαστοκύτταρα

Η πρώτη περιγραφή για την επιτυχή δημιουργία εβρυονικών βλαστοκυττάρων γίνεται το 1981 όπου δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες δημιούργησαν ESCs από την βλαστοκύστη ποντικού(Evans and Kaufman, 1981; Martin et al., 1981). Λίγα χρόνια μετά γίνεται και η πρώτη αναφορά για την δημιουργία ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων(hESCs). Σε μια προσπάθεια για την θεραπεία της υπογονιμότητας δημιουργηθηκαν μετά από in vitro γονιμοποίηση, βλαστοκύστεις οι οποίες μετά από συγκατάθεση των ζευγαριών χρησιμοποιήθηκαν για ερευνητικούς σκοπούς. Από την έσω κυτταρική μάζα των βλαστοκυστών απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν κύτταρα, όπου παρατηρήθηκε απεριόριστος πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών χωρίς φαινόμενο διαφοροποίησης με αποτέλεσμα την δημιουργία των πρώτων κυτταρικών σειρών ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Στη συνέχεια η ίδια ερευνητική ομάδα πρότεινε τρία κριτήρια για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό των πρωτογενών ESCs: 1) απομόνωση των κυττάρων από in vitro προεμφυτευικά έμβρυα, 2) παρατεταμένος αδιαφοροποίητος πολλαπλασιασμός, 3) ικανότητα διαφοροποίησης σε κυτταρικούς τύπους και

των τριών βλαστικών δερμάτων μετά από καλλιέργεια με παράγοντες διαφοροποίησης (Thompson et al., 1998).

Η ανακάλυψη αυτή ανοίγει νέα παράθυρα στον τομέα της ιατροβιολογικής έρευνας καθιστώντας τα κύτταρα αυτά ένα σημαντικό εργαλείο στην αναγεννητική ιατρική, κυτταρική θεραπεία και στην ανακάλυψη φαρμάκων. Μέχρι σήμερα έχουν παραχθεί περισσότερες από 400 τέτοιες κυτταρικές σειρές εμφανίζοντας μεταξύ τους σημαντική ποικιλομορφία σε πολλά επίπεδα όπως στο διαφοροποιητικό τους δυναμικό ή στα αναπτυξιακά τους χαρακτηριστικά. Οι διαφορές αυτές αντανακλούν τη γενετική ετερογένεια των παραγόμενων κυτταρικών σειρών καθώς προέρχονται από ένα ποικίλο γενετικά πληθυσμό(Abeyta et al., 2004). Τα ESCs έχουν συμβάλλει στην εξέλιξη της αναπτυξιακής βιολογίας , στη μελέτη μηχανισμών παθογένειας καθώς και στην προσπάθεια λειτουργικής αποκατάστασης πασχόντων οργάνων διαφόρων νοσημάτων, όπως η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Οι κυτταρικές αυτές σειρές όμως ως σημαντικό εργαλείο της έρευνας εγείρει μεγάλα ηθικά προβλήματα καθώς απαιτείται η χρησιμοποίηση ανθρώπινων εμβρυϊκών ιστών για την δημιουργία τους, με αποτέλεσμα την περιορισμένη εφαρμογή τους.

Τη λύση στα συγκεκριμένα προβλήματα και διλλήματα φαίνεται πως μπορούν να δώσουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα(iPSCs), που δημιουργούνται μετά από επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων , τα οποία διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες με τα ESCs ενώ δεν απαιτείται η καταστροφή εμβρυικών ιστών για την παραγωγή τους.

1.2.2 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα(Induced pluripotent stem cells - iPSCs)

Το 1958 πραγματοποιήθηκε η τεχνική πυρηνικής μεταφοράς διαφοροποιημένου κυττάρου σε απύρηνο ωοκύτταρο δείχνοντας ότι η διαφοροποιημένη κατάσταση των κυττάρων είναι αναστρέψιμη(Gurdon et al., 1958) Συγκεκριμένα, μεταφέρθηκε πυρήνας επιθηλιακού κυττάρου του εντέρου σε ωάριο βατράχου από το οποίο είχε αφαιρεθεί ο πυρήνας. ,

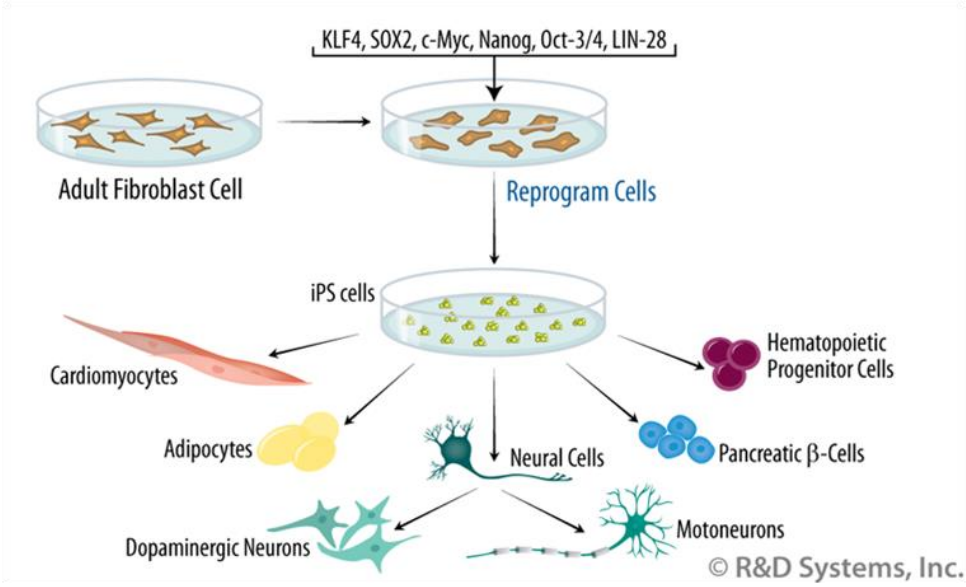
οδηγώντας στην ανάπτυξη φυσιολογικών γυρίνων. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες (εικόνα 1.) με την χρήση της πυρηνικής μεταφοράς (Wilmut et al., 1997) οδηγώντας στο συμπέρασμα ύπαρξης παραγόντων που είτε επάγουν είτε διατηρούν την πολυδυναμία στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα.

Το 2006 οι Yamanaka και Takahasi αναφέρουν 4 γονίδια έκφρασης πολυδυναμίας : Oct4(Octamer-Binding Transcription Factor 4), Sox2(SRY-box 2), Klf4(Kruppel-Like Factor 4) και c-Myc(Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog) γνωστά και ως παράγοντες Yamanaka ή παράγοντες OSKM. Με την εκτοπική έκφραση , μέσω ρετροϊκών φορέων, των συγκεκριμένων γονιδίων κατάφεραν να αναδείξουν τη δυνατότητα επαγωγής πολυδυναμίας σε ινοβλάστες ποντικού. Τα κύτταρα που προέκυψαν, χαρακτηρίζονται ως επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα(iPSCs) και προσομοιάζουν τις δυνατότητες των πολυδύναμων εμβρυονικών κυττάρων. Εμφανίζουν ομοιότητες στην μορφολογία, την έκφραση γονιδίων , το πολλαπλασιαστικό δυναμικό καθώς επίσης διατηρούν φυσιολογικό καρυότυπο συνήθως σε όλη τη διαδικασία καλλιέργειας τους. Επίσης, έχουν την δυναντότητα διαφοροποίησης σε κυτταρικούς τύπους και των τριών βλαστικών δερμάτων καθώς και την δημιουργία τερατωμάτων κατά την χορήγηση τους in vivo(Takahasi and Yamanaka, 2006). Έναν χρόνο αργότερα επιτυγχάνεται η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων και με την χρήση ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών χρησιμοποιώντας τους ίδιους μεταγραφικούς παράγοντες. Η σημαντικότητα των iPSCs καθυστέρησε να έρθει καθώς καταφέρθηκε 6 χρόνια μετά την πρώτη δημιουργία τους, με την απονομή του βραβείου Νόμπελ στους Gurdon και Yamanaka το 2012(εικόνα 1.2)

Μέχρι σήμερα έχουν δημιουργηθεί iPSCs και από άλλους τύπους σωματικών κυττάρων τόσο από ποντικού όσο και ανθρώπινους (Patel et al., 2010). Τα iPSCs αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο για έρευνα και μελλοντικά κλινική χρήση καθώς η παραγωγή τους δεν εγείρει κανένα ηθικό θέμα. Η δημιουργία κυτταρικών σειρών από ασθενείς που πάσχουν από γενετικές ασθένειες θα αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την μοντελοποίηση και μελέτη των μηχανισμών των ασθενειών αυτών καθώς και στη δοκιμή πιθανών φαρμάκων. Επίσης, η διαφοροποίηση των κυτταρικών σειρών αυτών σε

κύτταρα ιστών που πάσχουν θα μπορούσε να βρει άμεση εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική και στις μεταμοσχεύσεις(εικόνα 1.3)

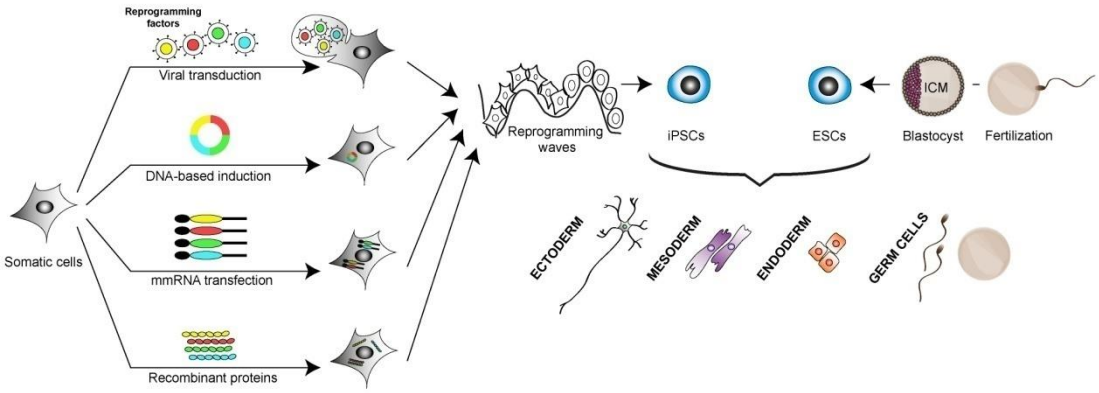
Εικόνα 1.2 Ιστορικό χρονόδιάγραμμα δημιουργίας και εξέλιξης iPSCs(Singh et al., 2015)



Εικόνα 1.3 Δημιουργία iPSCs μέσω επαναγρομματισμού με παράγοντες πολυδυναμίας σωματικών κυττάρων και διαφοροποίηση τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους(R&D Systems)

1.3 Μέθοδοι κυτταρικού επαναπρογραμματισμού για την παραγωγή iPSCs

Από την πρώτη στιγμή δημιουργίας των iPSCs έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (εικόνα 1.4).Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν στον τρόπο μεταφοράς των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας στα κύτταρα – στόχους, είτε αυτές περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση γενωμικού υλικού είτε την αποφεύγουν και χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:α) Μέθοδος με την ενσωμάτωση γενωμικού υλικού, β) DNA-μέθοδος χωρίς την ενσωμάτωση γενωμικού υλικού, γ) Μη- DNA μέθοδος χωρίς την ενσωμάτωση γενωμικού υλικού. Η απόδοση των διαφόρων τεχνικών καθορίζεται από το είδος των κυττάρων που πρόκειται να αποδιαφοροποιηθεί, τον συνδυασμό των διαφορετικών παραγόντων πολυδυναμίας και τον τρόπο μεταφοράς τους , με την σύγχρονη έρευνα να στρέφει κυρίως το ενδιαφέρον της στις μεθόδους χωρίς ενσωμάτωση γενωμικού υλικού.



Εικόνα 1.4 Διάφορες τεχνικές κυτταρικού επαναπρογραμματισμού για την δημιουργία iPSCs με την ενσωμάτωση ή όχι γενωμικού υλικού.

1.3.1 Μέθοδος επαναπρογραμματισμού με την ενσωμάτωση γενετικού υλικού(Integrating method)

Στην συγκεκριμένη κατηγορία ως μέσο μεταφοράς των μεταγραφικών παραγόντων OSKM έχουν χρησιμοποιηθεί οι εξής φορείς : ρετροϊοί, λεντιιοί, Ioxp λεντιιοί, piggybac τρανσποζόνιο και αδενοϊοί σε κύτταρα στόχους ανθρώπινούς και ινοβλάστες ποντικού(Takahasi and Yamanaka, 2006; Maherali et al., 2008; Somers et al., 2010; Stadtfeld et al., 2008). Η ρετροϊκή μεταγωγή έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε διάφορα είδη κυττάρων στόχων(ινοβλάστες, αιμοποιητικά, νευρικά, κλπ) και εμφάνισε απόδοση επαναπρογραμματισμού της τάξης 0.1% για ινοβλάστες ποντικού ενώ 0.01% για ανθρώπινους ινοβλάστες(Gonzalez et al., 2011). Η χρήση λεντιιών εμφάνισε μεγαλύτερη απόδοση επαναπρογραμματισμού σε ανθρώπινους ινοβλάστες, 01 – 2% σε σύγκριση με τους ρετροϊούς. Το σύστημα ιϊκής μεταφοράς οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων βλαστοκυττάρων, παρουσιάζει όμως σημαντικά μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι η ενσωμάτωση του ιού στο γενετικό υλικό των κυττάρων- στόχων με σημαντικό κίνδυνο δημιουργίας ογκογένεσης(Seifinejad et al., 2010). Σύμφωνα με μελέτες, ο ρετροϊός έχει τη ικανότητα ενσωμάτωσης σε 10-20 θέσεις στα iPSCs(Werning et al., 2008). Συνεπώς καθώς ο επαναπρογραμματισμός με ρετροϊούς και λεντιιούς ενέχει το κίνδυνο ογκογένεσης, πραγματοποιήθηκαν έρευνες για την αναζήτηση ασφαλέστερων μεθόδων κυτταρικού επαναπρογραμματισμού.

1.3.2 DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς την ενσωμάτωση γενετικού υλικού(Non – Integrating DNA-based methods)

Στην προσπάθεια εύρεσης μιας ασφαλέστερης και αποδοτικότερης τεχνικής για τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό, δημιουργήθηκαν DNA- μέθοδοι χωρίς την ενσωμάτωση γενετικού υλικού, οι οποίες όμως δεν φαίνεται να εμφανίζουν ικανοποιητικές αποδόσεις διαμόλυνσης των κυττάρων - στόχων. Η πρώτη προσπάθεια έγινε με την χρήση λεντιιών που περιείχαν LoxP θέσεις στα 5’ – 3’ άκρα LTR, οι οποίες διασφαλίζουν την εκτομή των διαγονιδίων

χωρίς όμως να αποκλείεται η ένθεση γενετικών αλληλουχιών του φορέα(Chang et al., 2009). Ένας άλλος τρόπος είναι η χρησιμοποίηση τρανσποζονίων piggybac(PB) για την μεταφορά των παραγόντων OSKM.
Η τεχνική αυτή εμφανίζει απόδοση 0.01 – 0.05% , χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτης για την επιβεβαίωση της πλήρους εκτομής του τρανσποζονίου από το γονιδίωμα των κυττάρων – στόχων (Gonzalez et al., 2011). Επιπρόσθετα, η χρήση αδενοϊών και επισωματικών πλασμιδίων εξασφαλίζει την δημιουργία iPSCs χωρίς να προυποθέτει την ενσωμάτωση γενετικού υλικού στο γονιδίωμα τους. Και τα 2 συστήματα όμως, παρουσιάζουν χαμηλή απόδοση κυτταρικού επαναπρογραμματισμού (Graham et al., 1992; Hu et al., 2015).

1.3.3 Μη – DNA μέθοδοι επαναπρογραμματισμού χωρίς την ενσωμάτωση γενετικού υλικού (Non – Integrating Non – DNA based methods)

Για την αποφυγή ενσωμάτιση γενετικού υλικού κατά τον επαναπρογραμματισμό χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μόρια έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας OSKM. Δημιουργήθηκε μια ασφαλής εναλλακτική ρετροϊών , ο ss(single stranded) RNA Sendai ιός , ο οποίος μεταφέρει τους παράγοντες στα κύτταρα – στόχους χωρίς την ενσωμάτωση γενετικού υλικό στον πυρήνα τους καθώς υπάρχει η δυνατότητα απομάκρυνσης του με αντίσωμα. Η απόδοση της συγκεκριμένης τεχνικής είναι 0.1%(Fusaki et al., 2009).
Μια άλλη μέθοδος η οποία έχει εμφανίσει σημαντικές προοπτικές και η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα πειραματική διαδικασία είναι η διαμόλυνση των κυττάρων στόχων με συνθετικά mRNA μόρια που κωδικοποιούν τους OSKM παράγοντες. Σε αυτή την τεχνική δεν ενέχεται ο κίνδυνος ενσωμάτωσης γενετική υλικού και αποτελεί μια ασφαλή και αποτελεσματική μέθοδο δημιουργίας iPSCs(Warren et al., 2010). Η καθημερινή διαμόλυνση των κυττάρων, με τα συγκεκριμένα ειδικά σχεδιασμένα μόρια να ξεπερνούν την έμφυτη αντι-ιική ανοσία, οδηγεί σε επιτυχή δημιουργία iPSCs με απόδοση μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται σε συστήμα διαμόλυνσης με ιούς.

Τέλος στην κατηγορία αυτή ανήκουν και άλλες τεχνικές, κάποιες από τις οποίες εμφανίζουν χαμηλή απόδοση και απαιτούνται παραπάνω μελέτες(βιοενεργές πρωτεϊνες) ενώ άλλες (microRNAs-miRs) αποδίδουν σημαντικά αποτελέσματα(Zhou et al, 2009; Miyoshi et al., 2011).

1.4 Μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας

Η γονιδιακή έκφραση πολυδυναμίας στα iPSCs όπως και στα ESCs ελέγχεται μέσω επιγενετικών μηχανισμών, καθώς μεταγραφικοί παράγοντες τροποποιούν την χρωματίνη, ρυθμιστικά μόρια RNA, σηματοδοτικά μονοπάτια με αποτέλεσμα την έκφραση ή την αποσιώπηση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη. Ο κάθε μεταγραφικός παράγοντας συμβάλλει διαφορετικά στο προφίλ έκφρασης της πολυδυναμίας στα εμβρυονικά βλαστοκυττάρα και η μελέτη τους οδηγεί στην κατανόηση του μηχανισμού του επαναπρογραμματισμού στα iPSCs.

- OCT4 (Octamer- Binding Transcription Factor): Ο παράγοντας OCT4 γνωστός και ως POUF5F1 συμβάλλει σημαντικά στην πρώϊμη εμβρυική ανάπτυξη και στην διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Φαίνεται να αποτελεί τον πιο σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα στην διαδικασία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού(Nakagawa et al., 2008)

- Klf4 (Kruppel – Like Facror 4): ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Kruppel και συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό . στη διαφοροποίηση και στην επιβίωση των κυττάρων

- Sox2 (SRY – box2) :αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για τη διατήρηση της ικανότητας αυτοανανέωσης των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Συμμετέχει επίσης στην ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και στην

πορεία ζωής του κυττάρου

- C – Myc: πρωτοογκογονίδιο που η λειτουργίΑ του ως μεταγραφικός παράγοντας είναι να ελέγχει την δράση πολλών γονιδίων που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε αυτά είναι ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια

Μελέτες στα ESCs δείχνουν ότι η ταυτότητα τους καθορίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες: OCT4, Sox2, Klf4 και Nanog καθώς ρυθμίζουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης τους και καταστέλλουν τα μονοπάτια της κυτταρικής διαφοροποίησης(Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Διάφορα γονίδια σηματοδοτούν την πολυδυναμία και την αυτοανανέωση στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα ενώ η αναστολή έκφρασης των γονιδίων αυτών σε συνδυασμό με την επαγωγή έκφρασης ιστοειδικών γονιδίων οδηγεί στην έναρξη της διαφοροποίησης.

Κατά τη διαδικασία της φυσιολογικής διαφοροποίησης των ινοβλαστών και συγκεκριμένα στο στάδιο της γαστριδίωσης παρατηρείται η μετάβαση από την επιθηλιακή στην μεσεγχυματική μορφολογία των κυττάρων με σκοπό τον σχηματισμό των 3 βλαστικών δερμάτων(Chen et al., 2012). Η αντίθετη διαδικασία , δηλαδή η μετάβαση των κυττάρων από την μεσεγχυματική στην επιθηλιακή κατάσταση σηματοδοτεί τα πρώτα στάδια του επαναπρογραμματισμού(Li et al., 2010; Samavarchi et al., 2010). Κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι τα iPSCS και τα ESCs εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες ως προς το πρότυπο μεθυλίωσης και το μεταγραφικό τους πρότυπο ενώ άλλες έρχονται σε σύγκρουση με αυτή την άποψη. Συγκεκριμένα, οι υποκινητές των γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμία παρατηρούνται απομεθυλιωμένοι στα ESCs και στα iPSCs ενώ εμφανίζονται μεθυλιωμένοι σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Εκτός αυτού δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί η ύπαρξη ή μη επιγενετικής μνήμης, με διάφορες έρευνες να καταλήγουν στην ύπαρξη καθώς η διαφοροποίηση των iPSCs φαίνεται να γίνεται πιο εύκολα προς τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προήλθαν σε σύγκριση με άλλους κυτταρικούς τύπους(Kim et al., 2010).

1.5 Εφαρμογή των iPSCs

Όπως προαναφέρθηκε, τα iPSCs παράγονται με μία διαδικασία γενετικού επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων προς μία κατάσταση που προσομοιάζει στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) (Rossant J., 2008). Τα iPSCs εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα iPSCs, όπως κοινά γονίδια έκφρασης, παρόμοια πρότυπα μεθυλίωσης, ικανότητα διαφοροποίησης στα 3 βλαστικά δέρματα και τη δυνατότητα σχηματισμού τερατωμάτων, χωρίς όμως να εγείρουν ηθικούς προβληματισμούς. Ένα ακόμη ίσως πλεονέκτημα των iPSCs έναντι των ESCs είναι η περιορισμένη πιθανότητα ανοσοαπόρριψης μοσχευμάτων λόγω ανεπαρκούς συμβατότητας, καθώς τα iPSCs δημιουργούνται από σωματικά κύτταρα του ενδιαφερόμενου λήπτη. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι τα iPSCs αποτελούν μια ελπιδοφόρα τεχνολογία και καθιστούν τη χρήση τους απαραίτητη πλέον στο κομμάτι της έρευνας και της ιατρικής.

Η χρήση των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στρέφεται κυρίως προς 2 κατευθύνσεις, στην αναγεννητική ιατρική και στην εξατομικευμένη ιατρική όσον αφορά την μοντελοποίηση ασθενειών και την μελέτη φαρμάκων(εικόνα 1.5)

1.5.1 Μοντελοποίηση ασθενειών και μελέτη φαρμάκων

Η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων έχει συμβάλλει σημαντικά στην μελέτη της παθογένειας διαφόρων ασθενειών και την μοντελοποίηση αυτών. Ένας συχνός περιοριστικός παράγοντας στην θεραπεία αρκετών ασθενειών είναι η αδυναμία κατανόησης των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Ο μοντελισμός ασθενειών για πολλά χρόνια πραγματοποιούταν με την χρήση ζωικών μοντέλων τα οποία μιμούνταν ως ένα βαθμό τα ανθρώπινα κυτταρικά μικροπεριβάλλοντα. Τα συγκεκριμένα όμως εμφάνιζαν αρκετούς περιορισμούς στη μελέτη ανθρώπινων ασθενειών καθώς αδυνατούσαν να προσομοιάσουν πλήρως το

μεταβολισμό και το κυτταρικό περιβάλλον , λόγω γενετικών διακυμάνσεων και έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών που καθορίζουν τις βιολογικές λειτουργίες του ανθρώπου. Η ανακάλυψη των iPSCs έδωσε μια σημαντική λύση στους περιορισμούς αυτούς. Διάφορες έρευνες επικεντρώνονται στην δημιουργία νοσοειδικών iPSCs σειρών(disease-specific ipscs) από ασθενείς με γνωστά γενετικά νοσήματα, δηλαδή κυτταρικές σειρές επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που φέρουν τον γονότυπο της γενετικής δυσλειτουργίας. Η παραγωγή αυτών των κυττάρων και η επακόλουθη διαφοροποίηση τους προς τον κυτταρικό τύπο ο οποίος πάσχει, χρησιμεύει ως πρότυπο για την μελέτη της παθογένειας και πιθανότητα της θεραπείας της νόσου.
Το 2008 αναφέρθηκαν οι πρώτες δύο επιτυχημένες προσπάθειες δημιουργίας νοσοειδικών iPSCs κυτταρικών σειρών. Η πρώτη μελέτη αναφέρεται στην δημιουργία iPSCs από ασθενείς με διάφορες νόσους μενδελικής ή πολυπαραγοντικής κληρονομικότητας(Park et al., 2008). Στην δεύτερη μελέτη δημιουργήθηκαν iPSCs σειρές από ασθενή που έπασχε από οικογενή αμυοατροφική πλευρική σκλήρυνση(ALS), τα οποία στην συνέχεια διαφοροποιήθηκαν in vitro σε κινητικούς νευρώνες (Dimos et al., 2008). Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για την δημιουργία νοσοειδικών iPSCs από ασθένειες διαφόρων κατηγοριών: νευροεκφυλιστικές, καρδιακές, αιματολογικές, σκελετικές, οφθαλμολογικές, μεταβολικές κακοήθειες, κλπ.(πίνακας1.1)

Η δυνατότητα μελέτης της φυσιολογίας και της αιτιοπαθογένειας μιας νόσου με την χρήση των iPSCs έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στον σχεδιασμό και στην μελέτη φαρμάκων για την πιθανή θεραπεία της. Έχουν γίνει διάφορες έρευνες που αφορούν τον σχεδιασμό φαρμάκων και με ελπιδοφόρα αποτελέσματα , οι οποίες όμως είτε έχουν παραμείνει σε in vitro επίπεδο και δεν έχουν εφαρμοστεί σε ζωντανό οργανισμό, είτε χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για τον έλεγχο της τοξικότητας των φαρμάκων αυτών. Επίσης, ένας ακόμη περιοριστικός παράγοντας στην δημιουργία εξατομικευμένων φαρμάκων είναι η ανίχνευση της αιτιολογίας της νόσου και αν απαιτείται γενετική επιδιόρθωση ,κάτι το οποίο ενέχει δύσκολίες σε πολυπαραγοντικές ή μη γενετικές ασθένειες (Yanhong et al., 2017). Έρευνες έχουν υλοποιηθεί για πιθανή θεραπεία του Alzheimer, όπου δημιουργήθηκαν νευρώνες από iPSCs

ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια της πρεσενιλίνης και παρατηρήθηκε ανταπόκριση της αμυλοειδούς β σε αναστολείς της γ-σεκρετάσης (Yagi et al., 2011). Επίσης για την ίδια ασθένεια, φαίνεται ότι αναστολείς της β σεκρετάσης μειώνουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνης Tau (Israel et al., 2012). Πιθανοί θεραπευτικοί μηχανισμοί με βάση τα iPSCs έχουν αναφερθεί και για καρδιακές νόσους και συγκεκριμένα για το σύνδρομο LQT που οφείλεται σε διαταραχές των μονοπατιών καλίου νατρίου. Σε iPSCs ασθενών χορηγήθηκαν αναστολείς των συγκεκριμένων ιοντικών καναλιών ή φάρμακα που ενισχύουν την διέλευση των ιόντων, ως πιθανοί ρυθμιστές των διαταραχών των μονοπατιών νατρίου, καλίου(Itzhaki et al., 2011). Τέλος, δοκιμές σχεδιασμού φαρμάκων in vitro ή σε ζωικά μοντέλα έχουν γίνει και για τις εξής ασθένειες: σύνδρομο Down, χορεία του Huntington, Parkinson, μιτοχονδριακές ασθένειες, Diamon Blackfan αναιμία, οικογενής υπερχοληστερολαιμία, Gaucher, σύνδρομο Rett, κ.α.(Elitt et al., 2018 ; Wattanapanitch et al., 2018).

Για πολλά χρόνια ο μοντελισμός των ασθενειών γινόταν με διαφοροποίηση των iPSCs σε 2D μονοστοιβάδες κυττάρων(2D monolayers), για την μελέτη του φαινοτύπου της ασθένειας και των αιτιών της. Η διαδικασία αυτή όμως ενείχε μειονεκτήματα καθώς αδυνατεί να αναπαραστήσει την δομή ιστών και οργάνων, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών κυττάρων και εξωκυττάριων μηχανισμών που συμβαίνουν σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό και πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Για το λόγο αυτό, οι έρευνες τα τελευταία χρόνια στράφηκαν στην δημιουργία των οργανοειδών (organoids). Τα οργανοειδή είναι τρισδιάστατα πολυκυτταρικά συσσωματώματα που προερχόμενα από βλαστοκύτταρα που διαφοροποιούνται και αυτοοργανώνονται με σκοπό να αναπαραστήσουν τα δομικά χαρακτηριστικά και τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις ώριμων ιστών. Η ανακάλυψη αυτή αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο στην εξέλιξη της έρευνας των iPSCs για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη μιας νόσου και τον σχεδιασμό πιθανής θεραπείας της(McCaleuy et al., 2017; Liu et al., 2018). Ακόμη και αυτή η μέθοδος παρουσιάζει περιορισμούς, καθώς τα οργανοειδή από iPSCs εξαρτώνται σημαντικα από την αυτοοργάνωση και παρατηρείται κυτταρική ετερογένεια και μεταβολή οργανοειδών που προέρχονται από την ίδια

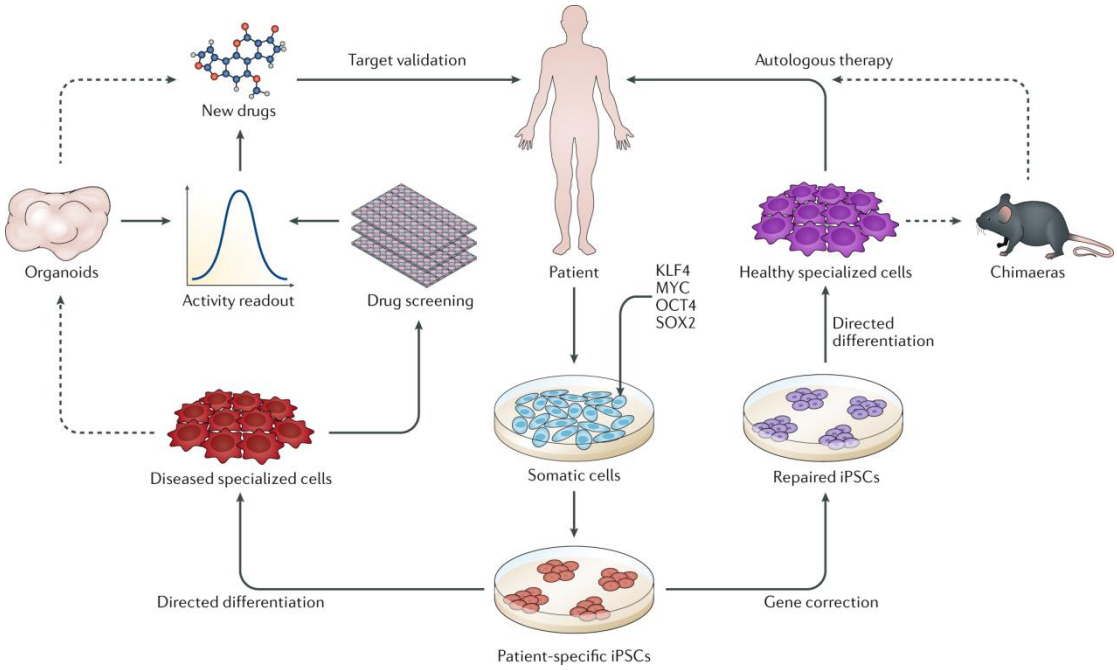
παρτιδα. Επίσης, βρίσκεται ακόμη υπό συζήτηση το κατά πόσο μπορούν να αντικατοπτρίσουν πλήρως την δομή και την φυσιολογία ενός ανθρώπινου ιστού ή οργάνου. Πέρα από τους περιορισμούς, τα οργανοδειδή προσφέρουν τεράστιες δυνατότητες και μέχρι τώρα έχουν δημιουργηθεί ή είναι προς μελέτη οι εξής τύποι: νευρικά, γαστρεντερικά, ηπατικά, καρδιακά και οργανοδειδή που προσομοιάζουν πνεύμονα και συκώτι, με σκοπό να μελετηθούν οι αντίστοιχες ασθένειες που εμφανίζονται στα όργανα που αναπαριστούν(Rowe et al., 2019).

Είδος ασθένειας	Ασθένεια	Βιβλιογραφία
Νευρολογικές	Parkinson(PD)	Byers et al., 2011
	Χορεία Huntington	Consortium et al., 2012
	Alzheimer	Israel et al., 2012
	Μετωποκροταφική άνοια(FTD)	Almeida et al., 2013
	Αμυοατροφική πλευρική σκλήρυνση(ALS)	Li et al., 2015
	Νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικη αταξία τύπου 2(SCA 2)	Xia et al., 2013
	Σύνδρομο Rett	Djuric et al., 2015
	Σχιζοφρένεια	Brennand et al., 2011
Μεταβολικές	Οικογενής υπερχοληστερολαιμία	Rashid et al., 2010
	Διαβήτης τύπου 1	Maehr et al., 2009
	Μιτοχονδριακή μυοπάθεια(MELAS)	Hamalainen et al., 2013
	Ανεπάρκεια α1 αντιτρυψίνης	Rashid et al., 2010
	Νόσος Gaucher	Panicker et al., 2012

Οφθαλμολογικές	Μελαγχρωστική αμφιβληστροπάθεια(RP)	Schwarz et al., 2015
	Συγγενής Αμαύρωση Leber(LCA)	Lustremant et al., 2013
	Σύνδρομο Usher	Tucker et al., 2013
	Γηραιοειδής ατροφία (GA)	Meyer et al., 2011
	Εκφύλιση ωχράς κηλίδας (AMD)	Chag et al., 2014
Σκελετικές	Σκελετική Δυσπλασία	Saitta et al., 2014
	Σύνδρομο Marfan	Quatro et al., 2012
	Νόσος Menkes	Kim et al., 2015
	Προοδευτική Οστεοποιός Ινοδυσπλασία	Matsumoto et al., 2010
Κακοήθειες	Καρκίνος γαστρεντερικού	Miyoshi et al., 2010
	Li Fraumeni	Lee et al., 2015
	Αδενοκαρκίνωμα Παγκρεατικού Πόρου	Kim et al., 2013
Αιματολογικές	Δρεπανοκυτταρικη αναιμία	Zou et al., 2011
	β – Μεσογειακή αναιμία	Ye et al., 2009
	Οικογενής διαταραχή αιμοπεταλίων	Sakurai et al., 2014
	Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία(CML)	Kumano et al., 2012
	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία(AML)	Chao et al.,2017
	Diamon Blackfan	Ge et al., 2015
	Severe Combined Immunodeficiency	Huang et al., 2015

Διάφορες	Πρωτογενής Ωοθηκική ανεπάρκεια	Leng et al., 2015
	Σύνδρομο Down	Weick et al., 2013
	Hermansy-Pudlak	Mica et al., 2013

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα iPSCs σειρών από σωματικά κύτταρα ασθενών διαφόρων νοσημάτων



Εικόνα 1.5 Η χρήση των iPSCs στην έρευνα και την αναγγενητική ιατρική(Rowe and Daley, 2019).

1.5.2 Αναγεννητική Ιατρική και iPSCs

Το 2009 εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, η πρώτη κλινική δοκιμή με χρήση ανθρώπινων εμβρυικών βλαστοκυττάρων για τη θεραπεία ασθενών που εμφάνιζαν τραυματισμούς στην σπονδυλική στήλη(Alper, J. 2009). Η συγκεκριμένη δοκιμή και γενικότερα η χρήση ανθρώπινων ESCs παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα λόγω των ηθικών προβληματισμών που εγείρει αλλά και πιθανότητα ανοσοαπόρριψης μοσχευμάτων λόγω ελλιπούς ιστοσυμβατότητας. Η ικανότητα παραγωγής επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων μετά από επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων , δημιουργώντας έτσι εξατομικευμένα κύτταρα, άλλαξε ριζικά έναν βασικό στόχο της Αναγεννητικής Ιατρικής, την αναγέννηση εκφυλισμένων ή κατεστραμμένων ιστών. Συγκεκριμένα, iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν in vitro σε κύτταρα του ιστού που πάσχει και να πραγματοποιηθεί τοπική χορήγηση των κύτταρων αυτών με σκοπό την αναγέννηση του ιστού, σε περιπτώσεις μυοσκελετικών κακώσεων, ηπατικών βλαβών , κακώσεων του νωτιαίου μυελού κ.α(Tan et al., 2012; Rowe et al., 2019).

Ένας άλλος σημαντικός στόχος της Αναγεννητικής Ιατρικής είναι η θεραπεία ασθενειών με γενετικό υπόβαθρο. Πληθώρα μελετών επικεντρώνονται στην γονιδιακή θεραπεία ασθενειών μέσω γενετικής τροποποίησης iPSCs με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε προκλινικές δοκιμές με σκοπό την περαιτέρω χρησιμοποίηση τους σε κλινικές δοκιμές και την πιθανή θεραπεία γενετικών ασθενειών. Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι η πρώτη ασθένεια στην οποία χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς γενετικά τροποποιημένα iPSCs. Δημιουργήθηκαν iPSCs από ινοβλάστες ποντικού όπου είχε προηγηθεί γενετική μεταλλαγή προκαλώντας τον φαινότυπο της νόσου. Μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού πραγματοποιήθηκε γενετική επιδιόρθωση της μεταλλαγής , διαφοροποίηση των iPSCs σε προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και μεταμόσχευση σε ποντίκι. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση επιπέδων έκφρασης της HBS αιμοσφαιρίνης και σημαντική έκφραση της HBA, υποδηλώνοντας τον επιδιορθωμένο φαινότυπο(Hanna et al., 2007).

Τα iPSCs όπως φαίνεται αποτελούν μια ελπιδοφόρα πηγή για νέες κυτταρικές θεραπείες, καθώς χρόνιες έρευνες σε ζωικά μοντέλα αλλά και σε προκλινικές μελέτες έχουν δείξει υψηλή αποτελεσματικότητα , θέτοντας τα θεμέλια για την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Διάφορες κλινικές μελέτες έχουν δοκιμαστεί, παρόλα αυτά όμως η χρήση των iPSCs σε κλινικό επίπεδο είναι ακόμη σε αρχικό στάδιο και απαιτούνται περαιτέρω έρευνες καθώς υπάρχουν αρκετές ανησυχίες για την ασφάλεια των συγκεκριμένων κυττάρων ή των κυττάρων που προκύπτουν μετά από διαφοροποίηση των iPSCs ,στην εφαρμογή τους ως θεραπεία διαφόρων νοσημάτων(Haake et al., 2019) Στη συνέχεια παρατίθενται κάποιες προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές που ίσως να αποτελέσουν πιθανές θεραπείες με την χρήση των iPSCs. Η κατηγορία των νόσων που σχετίζονται με τον εκφυλισμό των οφθαλμών έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον στους ερευνητές, καθώς ο οφθαλμός προσδίδει της εξής ευκολίες: εύκολη τοπική χορήγηση κυττάρων, ικανότητα ανοσοανοχής μη ιστοσυμβατών κυττάρων και δυνατότητα άμεσου ελέγχου των πιθανών ανεπιθύμητων αντιδράσεων. Προκλινικές μελέτες για την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας δείχνουν ότι προγονικά νευρικά κύτταρα που έχουν προέλθει από διαφοροποίηση των iPSCs μπορούν να διατηρήσουν την ικανότητα όρασης μετά από τοπική έγχυση σε οφθαλμό αρουραίου(Tsai et al., 2015). Δύο χρόνια αργότερα, λαμβάνει χώρα κλινική μελέτη για την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την νεοαγγειακή ηλικία. Μεταμοσχεύθηκαν αυτόλογα επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς(RPE) διαφοροποιημένα από iPSCs και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ δεν βελτιώθηκε ή επιδεινώθηκε η όραση του ασθενούς, τα μεταμοσχευμένα κύτταρα παρέμειναν άθικτα μετά από ένα χρόνο ελέγχου του ασθενούς(Mandai et al., 2017). Άλλες κατηγορίες ασθενειών δοκιμασμένες σε προκλινικές μελέτες είναι οι νευρολογικές και οι μυοσκελετικές. Σε ποντίκια με βλάβη στον νωτιαίο μυελό, χορηγήθηκαν νευρικά σφαιρίδια προερχόμενα από iPSCs όπου παρατηρήθηκε βελτίωση της κινητικής λειτουργίας, απουσία ογκογένεσης ενώ παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των νευρικών σφαιριδίων σε νευρικά κύτταρα και αγγειογένεση(Nori et al., 2011). Ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρατηρούνται και για την πιθανή θεραπεία της μυϊκής δυστροφίας Duchene, όπου με τη χρήση ανθρώπινων τεχνητών χρωμοσωμάτων (HACs) δημιουργήθηκαν επιδιορθωμένοι μυϊκοί ιστοί

προερχόμενοι από iPSCs από ποντικό και άνθρωπο(Kazuki et al., 2010). Επιπρόσθετα, προκλινικές μελέτες δείχνουν ικανοποιητική πρόοδο και σε μεταβολικές ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου Ι. Ανθρώπινα iPSCs από ινοβλάστες διαφοροποιήθηκαν σε β- παγκρεατικά κύτταρα, χορηγήθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στα οποία είχε προκληθεί η νόσος και παρατηρήθηκε φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης(Zhu et al., 2016). Τέλος, η πρώτη κλινική μελέτη ,μετά από τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε ζωϊκά μοντέλα, για την θεραπεία του Parkinson με iPSCs ξεκίνησε το 2018 και βρίσκεται σε εξέλιξη. Η ερευνητική ομάδα του Takahasi σε συνεργασία με Kyoto University, πραγματοποίησαν έγχυση προγονικών ντοπαμινεργικών κυττάρων, που προήλθαν από διαφοροποίηση iPSCs, σε 7 ασθενείς που πάσχουν από την νόσο του Parkinson και οι οποίοι θα επιβλέπονται για 2 χρόνια από την έγχυση των κυττάρων αυτών για την πορεία της νόσου και τον έλεγχο πιθανών παρενεργειών(UMIN Kyoto Trial, 2018).

1.6 Περιορισμοί που σχετίζονται με την χρήση των iPSCs

Η τεχνολογία των iPSCs έχει ανοίξει ένα νέο σημαντικό κεφάλαιο στην έρευνα και στον τομέα της Αναγεννητικής Ιατρικής, παρόλα αυτά εντοπίζονται αρκετά μειονεκτήματα στην χρήση τους και ανησυχίες που τα κάνει να απέχουν από την χρήση τους στην κλινική πράξη. Οι προβληματισμοί σχετίζονται κυρίως με την διαδικασία του επαναπρογραμματισμού των ενήλικων σωματικών κυττάρων και τις επιπτώσεις του στην δημιουργία και τη γενετική σταθερότητα των iPSCs.

Πιο συγκεκριμένα, πολλοί ερευνητές ανησυχούν για την γενετική σταθερότητα των iPSCs κυττάρων που προκύπτουν καθώς και την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα την πιθανή δημιουργία καρκινογένεσης. Η μακρόχρονη καλλιέργεια και συνεχείς ανακαλλιέργειες των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων επιφέρουν γενετικές και επιγενετικές επιπτώσεις, κάποιες από τις οποίες μένουν αδιευκρίνιστες. Σύμφωνα με μελέτη, τα iPSCs φέρουν περισσότερες

μεταλλάξεις από ότι τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται, για την ακρίβεια σε 22 ανθρώπινες σειρές iPSCs που είχαν δημιουργηθεί με διάφορες μεθόδους επαναπρογραμματισμού παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις από τις οποίες, περίπου οι μισές βρίσκονταν και στα αρχικά σωματικά κύτταρα(Gore et al.,2011). Σημαντική παρατήρηση στο κομμάτι της γενετικής σταθερότητας είναι ότι ο αριθμός των μεταλλάξεων σε iPSCs σχετίζεται με το κύτταρο προέλευσης αλλά και με την μέθοδο επαναπρογραμματισμού, με τις μεθόδους ενσωμάτωσης γενετικού υλικού να δείχνουν υψηλότερη πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης(Araki et al., 2017). Όπως προαναφέρθηκε, η μεθυλίωση του DNA που σχετίζεται με μηχανισμούς επιγενετικής μεταγραφικής ρύθμισης διαφέρει μεταξύ των iPSCs και ESCs, προκαλώντας επιπτώσεις που δεν είναι απολύτως γνωστές εμποδίζοντας τα iPSCs να χρησιμοποιηθούν ευρέως σε κλινικό επίπεδο(Deng et al., 2009). Επιπρόσθετα, το χαρακτηριστικό της πολυδυναμίας προσδίνει την ικανότητα έντονου πολλαπλασιασμού επιφέροντας πιθανώς de novo μεταλλάξεις, κάτι που καθιστά απαραίτητο τον συνεχή έλεγχο της γενετικής σταθερότητας των iPSCs κατά τη διάρκεια καλλιέργειας τους με διάφορες μεθόδους, όπως ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός(aCGH).

Η ανησυχία δημιουργίας καρκινογένεσης στρέφεται και προς τους μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας που χρησιμοποιούνται κατά τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό. Αλλαγές στην έκφραση των βασικών παραγόντων φαίνεται πως ενέχουν αρνητικές επιπτώσεις. Αναλυτικότερα, η υπερέκφραση του Oct-4 μπορεί να δημιουργήσει δυσπλασία επιθηλιακών κυττάρων ενώ μεταβολές στην έκφραση του Sox2 αναφέρεται ότι προκαλούν καρκίνωμα του παχέος εντέρου(Hochedlinget et al., 2015 ; Park et al.,2008). Επίσης, ο παράγοντας c-Myc που παρατηρείται στην ρετροϊκή διαμόλυνση των κυττάρων, αποτελεί ένα πρωτογκογονίδιο που εμφανίζεται σε ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπινων νεοπλασιών και ενέχει σημαντικούς κινδύνους κατά την συμμετοχή του στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό(Kuttler et al., 2006).

Ένας ακόμη περιορισμός στην χρήση των iPSCs είναι η χαμηλή απόδοση του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού αλλά και η αδυναμία πλήρους διαφοροποίησης των iPSCs στα επιθυμητά σωματικά κύτταρα. Τα iPSCs πριν από οποιαδήποτε προκλινική ή κλινική μελέτη ελέγχονται για την ικανότητα

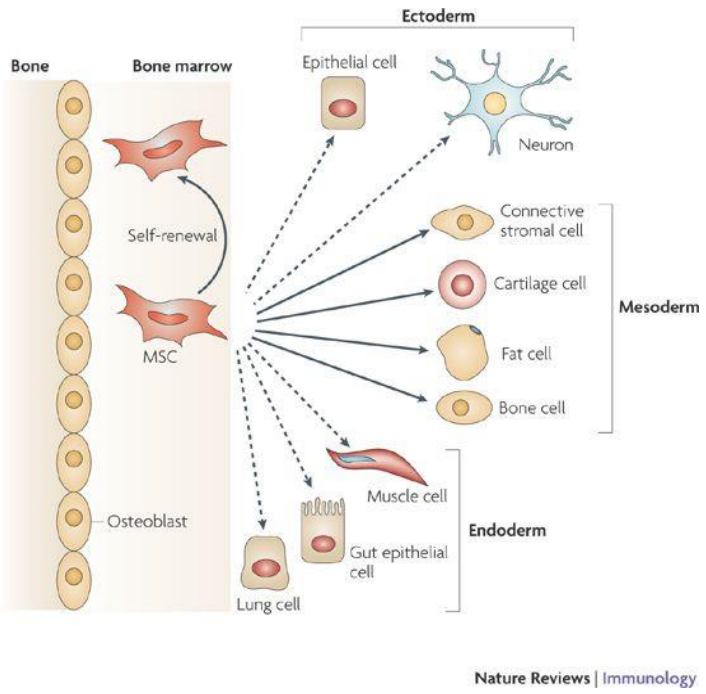
τους να σχηματίζουν τερατώματα σε ποντίκια. Οπότε η ανησυχία επάγεται στην πιθανότητα ύπαρξης μη διαφοροποιημένων κυττάρων μέσα στον κυτταρικό πληθυσμό που πρόκειται να μεταμοσχευθεί κατά την κλινική φάση, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση (Doss et al., 2019). Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν πως πρέπει να εφαρμοστούν ασφαλέστερα πρωτόκολλα και τρόποι βελτίωσης της τεχνολογίας των iPSCs.

1.7 Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal stem cells)

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά ή στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal Stem/stromal Cells, MSCs), περιγράφηκαν πρώτη φορά από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του, το 1974 (Friedenstein et al. 1974; Friedenstein et al. 1976). Αποτελούν πλειοδύναμα στελεχιαία κύτταρα που ανευρίσκονται στους περισσότερους ιστούς και έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε διαφόρους κυτταρικούς τύπους του μεσοδέρματος, όπως οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιπώδη κύτταρα (Eslaminejad et al. 2012)(εικόνα 1.6). Τα κύτταρα αυτά είναι ινοβλαστικής μορφολογίας παρουσιάζουν επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα με εστιακές μόνο επαφές με τα γειτονικά τους κύτταρα δίνοντας τους τη δυνατότητα έντονης κινητικότητας in vitro και in vivo(Thompson et al., 2015). Εκτός από το μυελό των οστών που προέρχονται από το περιαγγειακό κύτταρο των τριχοειδικών αγγείων, άλλες πηγές μεσεγχυματικών κυττάρων αποτελούν: ο λιπώδης ιστός, η γέλη Wharton στον ομφάλιο λώρο, το αμνιακό υγρό και ο οδοντικός πολφός.

<u>Κριτήρια χαρακτηρισμού μεσεγχυματικών κυττάρων(Dominici M et al.,2006):</u>

- Ικανότητα προσκόλλησης σε πλαστική επιφάνεια κατά την καλλιέργεια των κυττάρων
- Έκφραση αντιγόνων επιφανείας: CD73, CD90, CD105
- Απουσία έκφρασης αντιγόνων: CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79a ή CD19 και HLA-DR
- Ικανότητα διαφοροποίησης σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και μυοβλάστες



Εικόνα 1.6 Ιδιότητες μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων(Nature Reviews)

Ο μυελός των οστών και ο λιπώδης ιστός αποτελούν τις 2 πιο συχνές πηγές απομόνωσης μεσεγχυματικών κυττάρων παρατηρώντας όμως αρκετές διαφορές μεταξύ τους(Kourosch et al.,2016).. Τα τελευταία χρόνια η έκπτυξη και η χρήση των MSCs έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της Αναγεννητικής ιατρικής. Κάποια από τα χαρακτηριστικά που οδήγησαν τους ερευνητές σε ευρεία χρήση τους είναι τα εξής:

- Ανοσορυθμιστικές , αναγεννητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
- Ικανότητα μετανάστευσης σε ιστούς που παρουσιάζουν αλλοίωση
- Ικανότητα διαφοροποίησης
- Έκκριση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων καθώς και την επιδιόρθωση ιστικών βλαβών σε in vivo πειράματα(Caplan et al., 2006)

Συγκεκριμένα η έρευνα τα τελευταία χρόνια μέσω in vitro πειραμάτων και

προκλινικών δοκιμών έχει εστιάσει στις ευεργετικές τους ιδιότητες σε φλεγμονώδεις νόσους όπως η νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή (GvHD) ή σε χρόνια αυτοάνοσα νοσήματα (νόσος του Chrohn) καθώς τα MSCs εκφράζουν μόρια MHC τάξης I διαφεύγοντας της ανοσολογικής αναγνώρισης και μη προκαλώντας ανοσολογική αντίδραση όταν χορηγούνται σε αλλογενείς δέκτες(Blanc et al., 2005) Επιπρόσθετα, διάφορες μελέτες αναφέρουν την χρήση των μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων για την επισκευή και αναγέννηση ιστών σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως στην καρδιακή ισχαιμική νόσο ή σε οστικές και χονδρικές βλάβες(Bianco et al.,2013)

Παρόλα τα θετικά στοιχεία των MSCs υπάρχουν διάφοροι περιορισμοί στην παραγωγή τους σε μεγάλο αριθμό για in vitro πειράματα αλλά και για κλινική εφαρμογή. Τα MSCs του μυελού(BM-MSCs) των οστών που αποτελεί και την πιο συχνή πηγή απομόνωσης τους βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στον συγκεκριμένο ιστό και μπορούν να αυξηθούν μέχρι έναν περιορισμένο αριθμό στις in vitro καλλιέργειες. Σε αυτό συμβάλλει και η σταδιακή γήρανση στην οποία υφίστανται τα συγκεκριμένα κύτταρα μετά από έναν αριθμό ανακαλλιεργειών (Bernardo et al.,2011)Για την παραγωγή τους σε ικανούς αριθμούς για κλινική χρήση, απαιτείται χρόνος αρκετών εβδομάδων, με αποτέλεσμα σημαντική καθυστέρηση της κυτταρικής θεραπείας. Επιπλέον, η επεμβατικότητα της διαδικασίας άντλησης MSCs από ενήλικους ιστούς αποτελεί άλλο ένα σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση τους (Hass et al., 2011).

Όλα αυτά οδήγησαν την έρευνα στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών παραγωγής MSCs, πέρα από την απευθείας άντληση τους από ενήλικους ιστούς, με σημαντικό έδαφος να κερδίζει η διαφοροποίηση εμβρυικών και επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε MSCs(iMSCs).

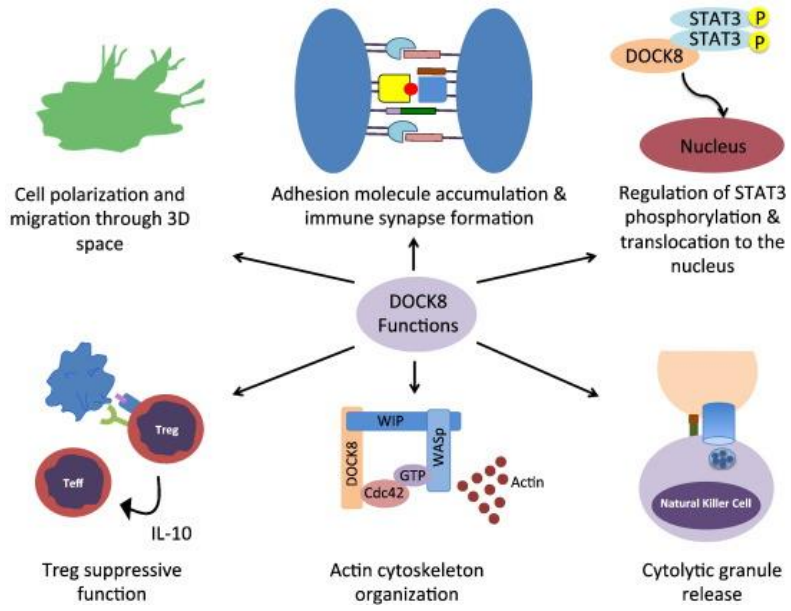
1.8 DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας (DOCK8 Immunodefeciency Syndrome - DIDS)

Το DOCK8 σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας(DIDS), αποτελεί μια σπάνια γενετική διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου DOCK8. Η συγκεκριμένη συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια εμφανίζει διάφορα ασυνήθιστα χαρακτηριστικά, με ένα από αυτά να είναι, σε αρκετούς ασθενείς, η αυξημένη ανοσοσφαιρίνη Ε (IgE) στον ορό του αίματος. Λόγω αυτού, για αρκετό καιρό περιλαμβανόταν στην κατηγορία του αυτοσωμικού υπολειπόμενου ΥΠΕΡ- IgE συνδρόμου (AR – HIES), γνωστό και ως Job's Σύνδρομο. Το 2009 περιγράφηκε για πρώτη φορά η γενετική αιτιολογία της ασθένειας παρατηρήθηκαν διαφορές στα κλινικά συμπτώματα από τις κοινές ανοσοανεπάρκειες, ορίζοντας το DIDS ως μια ξεχωριστή κλινική οντότητα (Engelhardt et al., 2009).

Το DIDS κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας(loss of function) στο γονίδιο DOCK8. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που παρατηρείται στα προσβεβλημένα άτομα είναι ομόλογες διαφόρων μεγεθών ελλείψεις ή σύνθετες ετερόζυγες απαλοιφές, που οδηγούν σε μεταβολές και κυρίως απώλεια λειτουργίας πρωτεϊνών. Το γονίδιο DOCK8 εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 , αποτελείται από 48 εξόνια και χαρακτηρίζεται από αρκετές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες γύρω και εντός του γονιδίου, οδηγώντας σε μη φυσιολογικούς ανασυνδυασμούς, το οποίο ίσως να μπορεί να δικαιολογήσει την υψηλή συχνότητα των ελλείψεων. Άλλου είδους μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί, με χαμηλότερη συχνότητα, είναι ματίσματος (splice-site) και non –sense μεταλλάξεις (Keles et al., 2016 ; Biggs et al., 2017).

Το γονίδιο DOCK8 , *dedicator of cytokinesis 8*, ανήκει στην υπερ-οικογένεια DOCK180 των άτυπων παραγόντων ανταλλαγής της γουανίνης(Guanine Exchange Factors-GEFs) που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Οι GEFs ενεργοποιούν τις GTPασες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην χημική σηματοδότηση εντός των κυττάρων. Το DOCK8 κωδικοποιεί μια μεγάλου μεγέθους πρωτεϊνη, 190kb, η οποία εκφράζεται κυρίως σε αιμοποιητικούς και ανοσοποιητικούς ιστούς (Su HC, 2010) και

διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και λειτουργία πολλών κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως των T, NK και B κυττάρων. Συγκεκριμένα, διατηρεί την δομή των T και NK κυττάρων, βοηθά την μετακίνηση τους σε περιοχές μόλυνσης, καθώς επίσης συμμετέχει στην χημική σηματοδότηση των B κυττάρων (NIH, DOCK8 gene)(εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Ιδιότητες της πρωτεϊνης που εκφράζεται από το DOCK8 γονίδιο και συμβάλλει στην εμφάνιση DIDS (Biggs et al., 2017)

Η DOCK8 ανοσοανεπάρκεια εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία και χαρακτηρίζεται από πολλά ποικίλα συμπτώματα μεταξύ των ατόμων που πάσχουν. Τα περισσότερο κοινά κλινικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει ένας ασθενής είναι: έκζεμα, υποτροπιάζοντα αναπνευστικά προβλήματα, αυξημένη IgE και επίμονες ιϊκές λοιμώξεις που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το δέρμα. Επίσης, οι ασθενείς συχνά εμφανίζουν άσθμα, περιβαλλοντικές και τροφικές αλλεργίες, λεμφοπενία, ηωσινοφιλία και υψηλή προδιάθεση διαφόρων τύπων

καρκίνου. Όσον αφορά την θεραπεία της συγκεκριμένης νόσου εξαρτάται από την κατάσταση του ασθενούς και συνήθως περιλαμβάνει την αντιμετώπιση των κλινικών συμπτωμάτων. Επίσης, η μεταμόσχευση αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων φαίνεται ότι έχει σημαντικά θετικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση του DIDS (Zhang et al., 2016 ; Biggs et al., 2017 ; Hu et al., 2019).

1.9 Σκοπός

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων κυτταρικών σειρών μετά από κυτταρικό επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων ασθενούς με DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας είναι η χρησιμοποίηση της μεθόδου επαναπρογραμματισμού με συνθετικά μόρια mRNA σε μεσεγχυματικά κύτταρα από τον μυελό των οστών ασθενούς για την παραγωγή iPSCs σειρών για το συγκεκριμένο νόσημα καθώς και ο έλεγχος της γενετικής τους σταθερότητας, ώστε να μπορέσουν σε μελλοντικές έρευνες να αποτελέσουν βάση για την μελέτη της αιτιοπαθογένειας και παθοφυσιολογίας του DOCK8 Συνδρόμου Ανοσοανεπάρκειας και τον σχεδιασμό πιθανών θεραπειών του.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση και απόψυξη μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων (mesencymal stemcells, MSCs)

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα που απομονώθηκαν από το μυελό των οστών(BM- MSCs) παιδιού με Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας λόγω μετάλλης στο DOCK8 γονιδίο. Η συλλογή των κυττάρων έγινε κατά τη διάρκεια συλλογής αυτόλογου μοσχεύματος μετά από έγκριση των γονέων. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν ζώντα με την διαδικασία βαθμιαίας κρυοκατάψυξης, στους -180°C σε υγρό άζωτο κατά τη διάρκεια νοσηλείας του παιδιού στην Ογκολογική μονάδα του Νοσοκομείου Παίδων, <<Αγία Σοφία>>.

Η απομόνωση των μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων έγινε με την χρήση φυκόλης σε θάλαμο νηματικής ροής, καθώς και οι επικείμενες πειραματικές διαδικασίες που αφορούν κύτταρα, υπό στείρες συνθήκες.

<u>Πειραματική διαδικασία απομόνωσης BM-MSCs</u>

- Σε σωληνάρια με την κατάλληλη ποσότητα αντιπηκτικού τοποθετούνται 10 ml μυελού των οστών
- Αραίωση του μυελού με προσθήκη ίσης ποσότητας PBS(Phosphate-BufferedSaline)
- Προσεκτική επιστοίβαξη του δείγματος σε ίσο όγκο διαχωριστικού μέσου Ficoll- Hypaque(φυκόλη). Το δείγμα δεν θα πρέπει να διαπερνά την φυκόλη κατά την τοποθέτηση του
- Φυγοκέντρηση σε 1500rpm για 30min στους 20^{0}C με στόχο την διαχώριση του μυελού σε 3 στοιβάδες: ερυθροκυττάρων, μονοπύρηνων και πλάσματος
- Συλλογή της στοιβάδας των μονοπυρήνων σε διαφορετικό σωληνάριο, έκπλυση με PBS και φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 10 min, 2 φορές
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε καλλιεργητικό υλικό DMEMGlutamax(περιέχει L- glutamine) με 10% FBS(fetalbovineserum) και 20ng/ml αυξητικού παράγοντα bFGF.
- Ποσότητα κυττάρων τοποθετείται σε 75 cm^2 ή 25 cm^2 φλάσκες και τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο με 37^{0}C, απόλυτη υγρασία(90%) και 5% CO_2

Πειραματική διαδικασία απόψυξης των BM-MSCs:

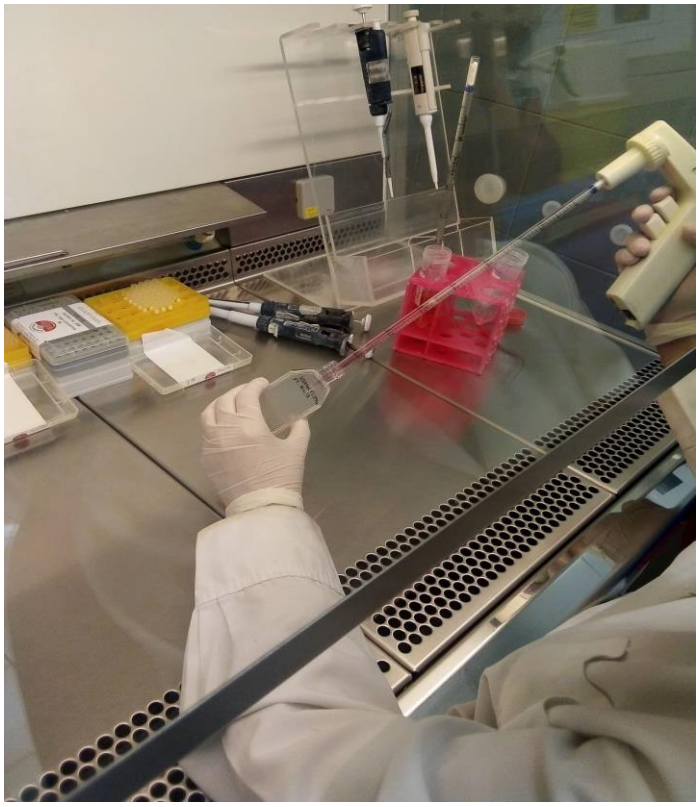
- Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 37°C και πραγματοποιείται συνεχής έλεγχος με υδραργυρικό θερμόμετρο μέχρι να φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία.
- Παίρνουμε την αμπούλα με τα κύτταρα από τους -160^{0}C, η οποία είναι αποθηκευμένη σε καταψύκτες με υγρό άζωτο και την ξεπαγώνουμε μέχρι να μείνει ένα μικρό ίζημα πάγου που καλύπτει τα κύτταρα. Η συγκεκριμένη ποσότητα πάγου είναι απαραίτητη μέχρι να γίνουν οι περαιτέρω χειρισμοί ώστε να ελαχιστοποιηθεί η άμεση δράση του DMSO(κρυοπροστατευτικό), η οποία είναι επιβαρυντική για τα κύτταρα καθώς στο στάδιο που βρίσκονται είναι πολύ ευαίσθητα.
- Η καλλιέργεια των BM-MSCs γίνεται σε θρεπτικό υλικό DMEMGlutamax(περίεχει το αμινοξύ Γλουταμίνη) και 10% FBS.
- Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε φλάσκες 75cm^2 και 25 cm^2
- Έχουμε τοποθετήσει σε falcon το θρεπτικό υλικό και στην συνέχεια παίρνουμε μια ποσότητα από τα κύτταρα της αμπούλας (~ 1ml) και την ρίχνουμε στο falcon. Αναδιαλύω ότι με το καλλιεργητικό υλικό το ίζημα που έχει απομείνει και το ρίχνω στο falcon.
- Φυγοκέντρηση για 6 min σε 1300 rpm.
- Αναδιαλύουμε το ίζημα και στην συνέχεια τοποθετούμε τα κύτταρα με το καλλιεργητικό υλικό στις φλάσκες.

2.2 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων (MSCs)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα μεσεγχυματικά κύτταρα βρίσκονται προσκολλημένα στην πλαστική επιφάνεια καλλιεργητικών φλασκών 75 cm^2 και 25cm^2. Τα συγκεκριμένα κύτταρα καλλιεργούνται σε υλικό DMEMGlutamax, που περιέχει το αμινοξύ λ-γλουταμίνη, στο οποίο προστίθενται 10% FBS(fetalbovineserum) και ο αυξητικός παράγοντας bFGF με συγκέντρωση 20ng/ml. Το υλικό (10 ml για 75 cm^2 και 3ml για 25cm^2

φλάσκα) ανανεώνεται κάθε 2- 3 μέρες. Όταν καλυφθεί ένα επαρκές ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας (~ 70-90%) τα μεσεγχυματικά κύτταρα ανακαλλιεργούνται. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας πραγματοποιείται με αποκόλληση των κυττάρων μέσω ενζυμικής μεθόδου και μεταφορά αυτών σε νέες φλάσκες και έπειτα σε βοθρία (6-wellplate,12-wellplate) με σκοπό την έναρξη της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού. Η ανακαλλιέργεια συμβαίνει ώστε να δημιουργηθεί ένας ομοιογενής πληθυσμός των μεσεγχυματικών κυττάρων και να αποφευχθούν συνθήκες επιβλαβείς για τα κύτταρα. Η αναλογία της ανακαλλιέργειας συνήθως είναι 1:3 σε νέες φλάσκες.

- Απομάκρυνση καλλιεργητικού υλικού από τις φλάσκες που περιέχονται τα κύτταρα
- Προσθήκη ποσότητας DPBS (10ml 75 cm^2 / 3ml 25cm^2 φλάσκα) για έκπλυση των κυττάρων
- Απομάκρυνση DPBS και προσθήκη 3ml διαλύματος ενζύμου θρυψίνης αραιωμένο(trypsin- EDTA 0,05%DPBS)
- Επώαση των κυττάρων για 3-5min σε 37^0C, 90% υγρασία και 5% CO_2 ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν πλήρως από την επιφάνεια της φλάσκας
- Αδρανοποίηση της θρυψίνης με προσθήκη διπλάσιας ποσότητας (6ml) θρεπτικού υλικού (DMEMGlutamax και 10% FBS)
- Συλλογή όλων των αιωρούμεων MSCs με διάφορες εκπλύσεις με θρεπετικό υλικό στην επιφάνεια της φλάσκας και μεταφορά τους σε σωληνάριο φυγοκέντρησης
- Φυγοκέντρηση στις 1300rpm για 6 min και απομάκρυνση υπερκειμένου
- Διαχωρισμός των κυττάρων σε 3 νέες φλάσκες με θρεπτικό υλικό στο οποίο έχει προστεθεί και bFGF και μεταφορά τους σε επωαστικό κλίβανο



Εικόνα 2.1 Διαδικασία ανανέωσης θρεπτικού υλικού MSCs σε 25cm^2 φλάσκες σε θάλαμο νηματικής ροής

2.3 Βαθμιαία κρυοκατάψυξη μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων

Κάθε φορά που αποψύχεται μια ποσότητα κυττάρων θα πρέπει να καταψύχεται η ίδια ποσότητα ή και παραπάνω ώστε να μην χάνεται οποιαδήποτε κυτταρική σειρά από την τράπεζα κυττάρων του εργαστηρίου, η οποία μπορεί να είναι απαραίτητη για μελλοντική χρήση από τον ίδιο τον ασθενή ή για ερευνητικούς σκοπούς. Η φύλαξη των κυττάρων στο υγρό άζωτο πραγματοποιείται με την διαδικασία της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης σε κατάλληλα μηχανήματα συνδεδεμένα με κάνιστρα υγρού αζώτου και τα κύτταρα αυτά μπορούν να διατηρηθούν ζώντα δια βίου. Η βαθμιαία κρυοκατάψυξη αποτελεί μια σημαντικά επιβαρυντική κατάσταση καθώς τα κύτταρα υπόκεινται σε μια έντονα στρεσογόνο διεργασία. Με τη χρήση όμως κατάλληλου κρυοπροστατευτικού, γρήγορων και ταυτόχρονα προσεκτικών χειρισμών μπορεί να διασωθούν ζώντα και να ανακάμψει, με την διαδικασία της απόψυξης, μια ικανοποιητική ποσότητα κυττάρων.

Για την πειραματική διαδικασία της κρυοκατάψυξης MSCs:

- Αρχικά ρυθμίζεται η θερμοκρασία του μηχανήματος κρυοκατάψυξης στους 4^{0}C ώστε όταν τοποθετηθούν τα δείγματα να μην υποστούν σημαντικά απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας

- Δημιουργία κατάλληλης ποσότητας κρυοπροστατευτικού [20% DMSO (Dimethylsulfoxide) και FBS] και φύλαξη στους 4^0C μέχρι την χρηση του.
- Ακολουθεί το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας MSCs μέχρι το στάδιο μετά την φυγοκέντρηση
- Αφαίρεση υπερκειμένου, αναδιάλυση ιζήματος σε θρεπτικό υλικό DMEMGlutamax, 10%FBS και bFGF και μεταφορά ποσότητας κυττάρων σε κατάλληλα αποστειρωμένα vials.
- Σταδιακή προσθήκη κρυοπροστατευτικού στα vials με τα κύτταρα και γρήγορη μεταφορά τους στο μηχάνημα κρυοκατάψυξης, Η αναλογία κρυοπροστατευτικού και θρεπτικού υλικού είναι 1:1
- Έναρξη επιλεγμένου προγράμματος βαθμιαίας κρυοκατάψυξης με σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας έως -160^0C και άμεση μεταφορά και αποθήκευση των δειγμάτων σε καταψύκτες με υγρό άζωτο , μετά το πέρας αυτής

2.4 Επαναπρογραμματισμός μεσεγχυματικών κυττάρων MSCs σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα(iPSCs)- Μέθοδος με συνθετικά μόρια mRNA

Για τη δημιουργία των iPSCs χρησιμοποιήσαμε σύστημα επαναπρογραμματισμού με συνθετικά mRNA μόρια, το οποίο βασίζεται στην έκφραση πέντε μεταγραφικών παραγόντων (Oct4, Klf4, Sox2, Lin28, c-Myc), που είναι καθοριστικοί για την πολυδυναμία των κυττάρων. Τα συνθετικά mRNA μόρια προκύπτουν μετά από αντικατάσταση κάποιων βάσεων τους με τροποποιημένες βάσεις, ψευδουριδίνη και 5-μεθυλοκυτιδίνη, εξασφαλίζοντας έτσι την εισαγωγή τους μέσα στα κύτταρα προκαλώντας μικρή ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσοαπόκρισης και μικρότερο βαθμό κυτταροτοξικότητας. Επίσης, στην χαμηλή ανοσοαπόκριση συμβάλει και η προσθήκη, στο υλικό καλλιέργειας των κυττάρων κατά τον επαναπρογραμματισμό, ποσότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης B18R αυξάνοντας την βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από διαμόλυνση με συνθετικά mRNAs(Kauffman et al., 2016; Andersonetal.,2010)

Η διαμόλυνση των κυττάρων που πρόκειται να επαναπρογραμματιστούν με mRNA μόρια επιτυγχάνεται μέσω λιποσωματικών φορέων . Τα κατιονικά αυτά λιπίδια αποτελούνται από μια θετικά φορτισμένη κεφαλή και υδρογοναθρακικές αλυσίδες. Μέσω της κεφαλής αυτής, το λιπίδιο ενώνεται με το mRNA δημιουργώντας το σύμπλοκο λιποσωμάτιο/mRNA. Το θετικό φορτίο

της κεφαλής του λιποσωματίου είναι υπεύθυνο για την μεταφορά του συμπλόκου στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς προσδένεται στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική επιφάνεια και συγχωνεύεται μέσω ενδοκυττάρωσης διαμολύνωντας το κύτταρο. Αφού εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου, το σύμπλοκο διαφεύγει από το ενδοσωματικό μονοπάτι και το mRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη διάρκεια της διαμόλυνσης με συνθετικά μόρια mRNA η έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας είναι παροδική διότι αποικοδομούνται τα mRNA και οι πρωτεϊνες καθώς επίσης και λόγω της κυτταρικής διαίρεσης που αραιώνει την συγκέντρωση των μορίων αυτών. Για αυτό το λόγο απαιτείται καθημερινή διαμόλυνση των κυττάρων με mRNA ώστε να παραμένει η πρωτεινική έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας σε υψηλά επίπεδα. Παρατηρείται η μέγιστη έκφραση των μορίων στις 12 με 18 ώρες(Warenetal., 2010). Παρόλα αυτά, η καθημερινή διαμόλυνση εμπεριέχει το πρόβλημα της κυτταροτοξικότητας και δεν πρέπει να διαρκεί πάνω από 4 ώρες την ημέρα.

Το kit το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον επαναπρογραμματισμό των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι το StemMACS™ mRNA Reprogramming Kit, MiltenyiBiotec. Μεσω αυτού του kit παρατηρείται ότι η διαδικασία δημιουργίας των iPSCs συμβαίνει μέσα σε 12-16 ημέρες. Οι πρώτες αποικίες των κυττάρων αυτών εκτιμάται ότι θα αρχίσουν να δημιουργούνται μεταξύ της 13^{ης} και 15^{ης} ημέρας. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά από ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες(HumanBJForeskinFibroblasts) ως θετικός μάρτυρας . Η καλλιέργεια των συγκεκριμένων κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FBS και ακολουθείται παρόμοιο πειραματικό πρωτόκολλο με τα MSCs

Για την μέθοδο του επαναπρογραμματισμού χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικα:

- ✓ StemMACs Oct4 mRNA
- ✓ StemMACs Klf4 mRNA
- ✓ StemMACs Sox2 mRNA
- ✓ StemMACs c-Myc mRNA
- ✓ StemMACs Lin-28 mRNA

} mRNA cocktail

- ✓ StemMACs Nanog mRNA
- ✓ StemMACs Nuclear eGFP mRNA

- ✓ StemMACs Transfection Reagent
- ✓ StemMaCs Transfection Buffer
- ✓ StemMACs Repro-Brew XF, Basal Medium
- ✓ StemMACs Repro-Brew XF, 50x Supplement

Ημέρα – 2, seeding

- BM-MSCs ασθενούς με DOCK8 σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας, p3
    - 1 12-well plate 45.000 κύτταρα
    - 1 12-well plate 60.000 κύτταρα
- BJ fibroblasts, p6+3
    - 1 12-well plate 3000 κύτταρα
    - 1 12- well plate 4000 κύτταρα

Είναι πολύ σημαντική η αρχική πυκνότητα των κυττάρων που τοποθετούνται στα βοθρία και στα οποία θα γίνει ο επαναπρογραμματισμός καθώς και των αντίστοιχων μαρτύρων τους , για την επιτυχία του πειράματος. Η ιδανική πυκνότητα σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης κάθε κυτταρικής σειράς.

Στην ημέρα -2 , η ποσότητα κυττάρων που έχει υπολογισθεί τοποθετείται σε 12-wellplate, τόσο για τα BM-MSCs όσο και για τους ινοβλάστεςBJ. Τα κύτταρα αυτά έχουν απομονωθεί και υπολογισθεί με την διαδικασία της ενζυμικής αποκόλλησης που περιγράφηκε παραπάνω. Η κάθε κατηγορία κυττάρων διαχωρίζεται σε 2 και τοποθετείται σε ένα από τα 12-wells με διαφορετική πυκνότητα κυττάρων στο κάθε well. Το κάθε well έχει επιστρωθεί πριν τοποθετηθούν τα κύτταρα με συγκεκριμένη ποσότητα υποστρώματος MatrigelCorning σε υλικό DMEM/F12, το οποίο παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1h πριν από το seeding. Παράλληλα για 45 min τοποθετείται στον κλίβανο το υλικό StemMACSRepro-brewXFBasalMedium για να φτάσει στην σωστή θερμοκρασία (equilibration), το οποίο στην συνέχεια αντικαθιστά το DMEM/F12 και αποτελεί το υλικό όπου θα βρίσκονται τα BM-MSCs και BJ για δύο μέρες πριν την έναρξη του transfection.

Ημέρα 0

Το πρωί της ημέρας 0 πριν από την διαμόλυνση των κυττάρων απαιτείται προσθήκη φρέσκου ReprobrewXFBasalmedium με ReprobrewXFSupplement καθώς και ποσότητας πρωτεΐνης B18R για να κατασταλεί η αντι-ιϊκή απόκριση των κυττάρων και να απομακρυνθούν οποιαδήποτε αποπτωτικά κύτταρα.

Αρχικά πραγματοποιείται επώαση του BasalMedium για 45 min. Μετά την επώαση βγάζουμε τοB18R και το Supplement και φτιάχνουμε το μείγμα με τις κατάλληλες ποσότητες. Αφαιρείται το παλιό υλικό από τα κύτταρα, προστίθεται το καινούριο και τοποθετούνται στον κλίβανο για 4 ωρες.

Λίγο πριν την ώρα της διαμόλυνσης(μετά από 4h) προετοιμάζονται τα mRNAcocktail, totransfectionreagent και Buffer.

TubeA: Buffer + transfectionreagent

TubeB: Buffer + mRNAcocktail (5 μεταγραφικοί παράγοντες, nGFP πρωτεϊνη)

Μεταφορά του tubeA στο tubeB και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Μετά την επώαση, σε κάθε well ρίχνουμε 500ml του μίγματος σταγόνα-σταγόνα σε διαφορετικά σημεία του well, ανακινούμε καλά και τοποθετούμε τα κύτταρα στον κλίβανο για 4 ώρες,

Μετά από 4 ώρες αυστηρώς για αποφυγή κυτταροτοξικότητας, το υλικό αντικαθίστανται με φρέσκο ReprobrewBasalMedium, Supplement και B18R.

Ημέρες 1- 4

Στις μέρες αυτές ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Η διαμόλυνση πρέπει να πραγματοποιείται όπως περιγράφτηκε στην ημέρα 0, καθημερινά την ίδια ώρα με μια μικρή απόκλιση πάνω κάτω 2 ωρών. Αυτό είναι απαραίτητο ώστε να διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα τα μετάγραφα mRNA και να υπάρχει συνεχής έκφραση παραγόντων πολυδυναμίας. Ο έλεγχος της επιτυχίας της διαμόλυνσης πραγματοποιείται με το mRNA της πράσινης φθορίζουσας πρωτεϊνης nGFP και παρατηρείται η έκφραση της σε ανάστροφο μικροσκόπιο κάθε επόμενη μέρα από την διαμόλυνση. Επαρκής διαμόλυνση θεωρείται όταν επιτυγχάνεται ένα ποσοστό >50% των κυττάρων στόχων.

Ημέρες 5 – 11

Στο στάδιο αυτό καθώς ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται λόγω πολλαπλασιασμού τους αυξάνεται και η ποσότητα των mRNAcocktail, Buffer και transfectionreagent. Η διαδικασία ακολουθείται κανονικά και οι μορφολογικές αλλαγές παρατηρούνται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Οι μορφολογικές αλλαγέςκαι η εμφάνιση αποικιών μπορεί να

παρατηρηθούν νωρίτερα στα BJ καθώς αποτελούν εύκολα επαναπρογραμματιζόμενα κύτταρα και λόγω αυτού να χρειαστεί να διακοπεί η διαμόλυνση νωρίτερα από ότι στα BM-MSCs.

Ημέρες 12 – 13

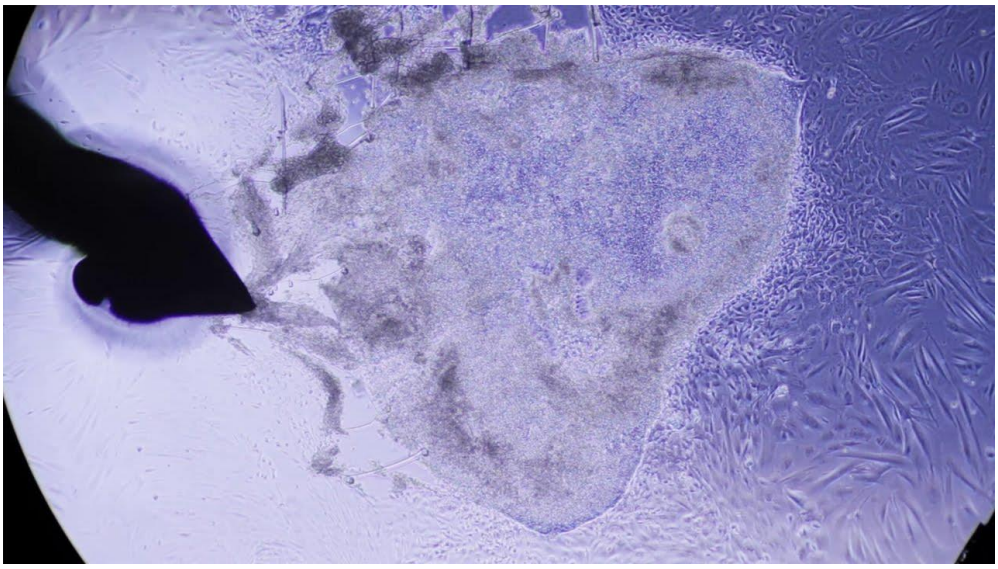
Έχουν αρχίσει να παρατηρούνται εμφανώς αποικίες αδιαφοροποίητων κυττάρων και στο στάδιο αυτό σταματάει η διαμόλυνση. Οι αποικίες συνεχίζουν να αυξάνονται με την προσθήκη μόνο Reprobrew XF και Supplement χωρίς την παρουσία B18R

Ημέρα 14

Στο σημείο αυτό, οι αρκετά αναπτυγμένες αποικίες αδιαφοροποίητων κυττάρων μπορούν να απομονωθούν και να οδηγηθούν στην διαδικασία δημιουργίας κυτταρικών σειρών μορφολογικά έστω (καθώς δεν έχουν ελεγχθεί παράγοντες πολυδυναμίας) όμοιες με επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων.

2. 5 Κυτταρικές σειρές επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων(inducedpluripotentstemcells - iPSCs)

Η κάθε αποικία που προέκυψε από τον επαναπρογραμματισμό απομονώνεται προσεκτικά, ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις από άλλες γειτονικές αποικίες , για να μπορέσει να δώσει μια νέα κυτταρική σειρά που θα προέρχεται μόνο από την αρχική αποικία αυτή. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω μηχανικής απομόνωσης(manual picking)



Εικόνα 2.2 Διαχωρισμός ορίων αποικίας από γειτονικά κύτταρα κατά τη μέθοδο μηχανικής απομόνωσης (manualpicking)

Τα iPSCs καλλιεργούνται σε plates ή φλάσκες επιστρωμένα με βοηθητικό υπόστρωμα προσκόλλησης BDMatrigel και υλικό mTSER1. Σε θάλαμο νηματικής ροής, μεταφέρεται ανάστροφο μικροσκόπιο, όπου τοποθετείται το plate επαναπρογραμματισμού και εντοπίζεται η επιθυμητή αποικία. Με την χρήση του tip της πιπέττας ξύνονται περιμετρικά τα όρια της αποικίας προσπαθώντας να διαχωριστεί από οποιαδήποτε γειτονικά της κύτταρα. Στην συνέχεια ξύνουμε το εσωτερικό της αποικίας ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από το υπόστρωμα και την μεταφέρουμε σε ένα νέο well με καλλιεργητικό υλικό. Κάθε αποικία μεταφέρεται και καλλιεργείται σε ξεχωριστό well. Στην διαδικασία αυτή θα πρέπει να αποφευχθεί η μετακίνηση κυττάρων σε άλλα σημεία του well κατά το ξύσιμο των αποικιών και η πρόσμιξη τους με γειτονικά κύτταρα άλλων αποικιών iPSCs ή και διαφοροποιημένων κυττάρων.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται και στην περίπτωση που σε μια καλλιέργεια iPSCs παρατηρούνται αρκετα διαφοροποιημένα κύτταρα, όπου δεν θέλουμε να τα μεταφερθούν σε νέα καλλιέργεια κάτι το οποίο θα γινόταν με την ενζυμική μέθοδο ανακαλλιέργειας.

2. 6 Καλλιέργειες πολλαπλασιασμού επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSCs)

Για την καλλιέργεια των iPSCs απαιτούνται στείρες συνθήκες και προσεκτικοί χειρισμοί για την αποφυγή επιμολύνσεων. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό mTSER1 που ανανεώνεται καθημερινά και εμπεριέχει όλους τους παράγοντες για την διατήρηση της πολυδυναμίας τους. Καθώς δεν έχουν την προσκολλητική ικανότητα σε πλαστικές επιφάνειες, χρησιμοποιείται βοηθητικό υπόστρωμα BDMatrigel που αποτελείται από μίγμα πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας. Τα iPSCs παρουσιάζουν έντονο κυτταρικό πολλαπλασιαστικό και στο σημείο όπου θα παρατηρούνται μεγάλες και πολλές αποικίες με πυκνό κέντρο που αρχίζουν να συγχωνεύονται καθώς και έντονη απόπτωση θα πρέπει να υπόκεινται σε ενζυμική αποκόλληση με την χρήση του ενζύμου dispase(ανακαλλιέργεια- passage, p)

- Τουλάχιστον 1 ώρα πριν την ανακαλλιέργεια επιστρώνονται wells (6-wellplate/ 12-wellplate) ή φλάσκες με BDMatrigel (253 dilutionfactor) 10,12 μl για 6 – wellplate σε 1mlDMEM/F12.
- Μετά από 1 ώρα αφαιρείται το DMEM/ F12 αντικαθίστανται με καλλιεργητικό υλικό mTSER1.
- Απόρριψη θρεπτικού υλικού από κύτταρα που είναι για ανακαλλιέργεια και διπλή έκπλυση με ποσότητα DPBS
- Απόμάκρυνση DPBS , προσθήκη 1mlDispase και επώαση για 1min σε κλίβανο

- Παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο ανασηκωμένων ορίων αποικιών αλλά προσκολλημένων κυττάρων.
- Απομάκρυνση Dispase, έκπλυση με DBPS και προσθήκη DMEM/F12
- Αποκόλληση αποικιών με την χρήση πιπέττας ή cellscrapper
- Συλλογή εναιωρήματος κυττάρων σε σωληνάριο φυγοκέντρησης και φυγοκέντρηση στις 1300rpm για 6 min
- Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος σε ποσότητα mTSER1
- Διαχωρισμός της ποσότητας των κυττάρων σε νέα wells, συνήθως με αναλογία 1:3.
- Επώαση των κυττάρων σε 37^0C, 5% CO_2 και 90% υγρασία

2 . 7 Μελέτη έκφρασης μοριακών δεικτών πολυδυναμίας στις iPSCs σειρές

2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA

Χρησιμοποιήθηκε το RneasyPlusMiniKit της Qiagen για την απομόνωση του ολικού RNA. Αρχικά πραγματοποιείται λύση των κυττάρων την καλλιέργειας που εχουν απομονωθεί, αδρανοποίηση των RNases ώστε να μην υπάρχει αλλοίωση και καταστροφή του RNA,απομάκρυνση του DNA και τέλος έκλουση του ολικού RNA. Απομόνωση RNA έγινε από τα εξής δείγματα:

BM- MSCs, DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10

- Απομόνωση συγκεκριμένης ποσότητας(< 1x 10^7 κύτταρα) επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων(iPSCs) που καλλιέργουνται μέσω ενζυμικής μεθόδου και φυγοκέτρηση στις 1300 rpm για 6 min.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα RLTBufferPlus + β-mercaptoethanol(β-ME):

  < 5x10^6κύτταρα → 350 μl RLT Buffer Plus + 3,5μl β-ME

  5x10^6 -1x10^7κύτταρα → 600 μl RLT Buffer Pus + 6μl β-ME

- Ομογενοποίηση του εναιωρήματος με τη χρηση Rnase – free σύριγγας και μεταφορά του σε gDNAEliminatorminispin στήλη που είναι τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής 2 ml.
- Φυγοκέντρηση σε 10000 rpm για 30 sec και απόρριψη στήλης καθώς το δείγμα έχει περάσει στο σωληνάριο συλλογής
- Προσθήκη 350 μl 70% αιθανόλης → έντονη ανάδευση
- Μεταφορά μέχρι και 700μl από το δείγμα σε μια RNeasyspin στήλη που είναι τοποθετημένη σε σωλληνάριο συλλογής 2 ml
- Φυγοκέντρηση 10000 rpm για 15 sec → απόρριψη σωληναρίου συλλογής
- Προσθήκη 700μlBufferRW1 στην στήλη , φυγοκέντρηση για 15 sec σε 10000rpm ώστε να εκπλυθεί η μεμβράνη της στήλης → απόρριψη σωληναρίου
- Προσθήκη 500μlBufferRPE , ίδια φυγοκέντρηση → απόρριψη σωληναρίου συλλογής
- Εκ νέου προσθήκη 500μlBufferRPE, φυγοκέντρηση και τοποθέτηση της Rneasyspin στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής 2 ml.
- Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 1 min και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής 1,5 ml
- Προσθήκη 30-50 μlRNase –free H_2O πάνω στην μεμβράνη της στήλης, φυγοκέντρηση στις ίδιες στροφές για 1min για να γίνει έκλουση του RNA
- Το περιεχόμενο ξανατοποθετείται στην ίδια στήλη με το ίδιο σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 1 min

2.7.2 PCR-ΑντίστροφηςΜεταγραφής(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Η συγκεκριμένη τεχνική PCR ενισχύει μικρή ποσότητα ριβονουκλεϊκού οξέος(RNA) μετατρέποντας το RNA στο συμπληρωματικό του DNA (complementaryDNA, cDNA) μέσω του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης(reversetranscriptase). Στην συγκεκριμένη τεχνική οι κατάλληλοι εκκινητές μπορεί να είναι τυχαίοι , συμπληρωματικοί ως προς το γονίδιο στόχο (ειδικοί) ή ολιγο-dTs στην περίπτωση του mRNA.

Χρησιμοποιούμε την PCR – Αντίστροφης μεταγραφής στο συγκεκριμένο πείραμα για να μελετήσουμε την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων OCT-4, NANOG, REX-1,SOX-2, ώστε να πιστοποιήσουμε την πολυδυναμία των iPSCs σειρών που δημιουργήθηκαν. Ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το ιδιοστατικό γονίδιο GAPDH, το οποίο αποτελεί ένα ''housekeeping gene '' δηλαδή εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και το χρησιμοποιούμε ώστε να αποκλείσουμε την πιθανότητα μη έκφρασης κάποιου μεταγραφικού παράγοντα λόγω λανθασμένου χειρισμού στην διαδικασία σύνθεσης του cDNA.

Τα Kit που χρησιμοποιήθηκαν μαζί με τα απαραίτητα συνοδευτικά τους αντιδραστήρια για την RT-PCR είναι :
DeoxyribonucleaseIAmplificationGrade(Invitrogen, Lot# 509114), SuperScriptIIReverseTranscriptase (Invitrogen, Lot# 1642395), RNAseOUTRibonucleaseInhibitorInvitrogen, Lot#1660883)

Καθαρισμός του απομονωμένου RNA

Απαραίτητο βήμα πριν την έναρξη σύνθεσης του cDNA είναι ο καθαρισμός του απομονωμένου RNA. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Σε Rnase –free σωληνάρια των 0,5 ml που είναι τοποθετημένα σε πάγο προστίθενται οι ακόλουθες ποσότητες για κάθε δείγμα:

Δείγμα RNA	1μg
10x DNase I Reaction Buffer	1μl
DNaseI,AmpGrade,1U/μl	1μl
DEPC- treated H_2O	έως 10 μl

- Επώαση των δειγμάτων για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1μlEDTA 25mM για αδρανοποίση της DNaseI
- Επώαση των δειγμάτων για 10 min στους 65^0C και το RNA είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση του CDNA

Διαδικασία σύνθεσης cDNA

- Σε σωληνάρια της PCR τοποθετούνται οι παρακάτω ποσότητες για κάθε δείγμα:

  RNA 10μl

  Oligo$(dT)_{12-18}$Primer (0,5μg/μl) 1μl

  dNTPs(10mM) 1μl

- Επώαση του μίγματος στους 65^0C για 5min και άμεση μεταφορά του σε πάγο
- Προσθήκη των εξής ποσοτήτων ανά δείγμα:

  5X First-Strand Buffer 4μl

  DDT(0,1M) 2μl

  RNaseOUT(40U/μl) 1μl

- Ανάδευση μίγματος και επώαση στους 42^0C για 2min
- Πρόσθήκη 1 μlSuperScriptIIRT(200 units/μl) σε κάθε δείγμα
- Ανάδευση μίγματος και επώαση στους 42^0C για 50 min
- Αύξηση της θερμοκρασίας στους 70^0C για 15min με στόχο την απενεργοποίηση της SuperScriptIIRT

Στο σημείο αυτό έχει δημιουργηθεί το cDNA και μπορεί να λειτουργήσει ως πρότυπο για την ενίσχυση με την τεχνική της PCR

Αντίδραση PCR

	OCT-4, Nanog, REX-1, GAPDH	**SOX-2**
Ανά αντίδραση	(μl)	(μl)
cDNA	1	2
5x PCR Buffer	10	10
25mM $MgCl_2$	4	4
Primer Forward(10μM)	2	2
Primer Reverse(10μM)	2	2
dNTPs	1	1
Taq DNA Polymerase	0.25	0.25

H_20	29.75	28.75
Total	50	50

Συνθήκες PCR

94^0C	2min	
94^0C	30sec	35 κύκλοι
55^0C	30sec	
72^0C	1min	
72^0C	10min	
10^0C	soak	

Γονίδιο πολυδυναμίας	Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος(bp)
GAPDH		
Forward	CAAGGCTGAGAACGGGAAGC	472 bp
Reverse	AGGGGGCAGAGATGATGACC	
OCT-4		
Forward	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	169bp
Reverse	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	
REX-1		
Forward	TGAAAGCCCACATCCTAACG	554bp
Reverse	CAAGCTATCCTCCTGCTTTGG	
NANOG		
Forward	CAAAGGCAAACAACCCACTT	398bp
Reverse	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	
SOX2		
Forward	ATGCACCGCTACGACGTGA	437bp
Reverse	CTTTTGCACCCCTCCCATTT	

Πίνακας: Αλληλουχίες εκκινητών μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας και μέγεθος προϊόντων αντιδράσεων PCR

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για τον έλεγχο έκφρασης των παραγόντων πολυδυναμίας σε πήκτωμα αγαρόζης 2% υπό σταθερή τάση 90V για περίπου 30 min, με την παράλληλη ηλεκτροφόρηση γνωστού μάρτυρα DNA.

2 .8 Μελέτη γενετικής σταθερότητας των iPSCs σειρών

2. 8.1 Απομόνωση γενωμικού DNA:

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τα καλλιεργούμενα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με το QIAampDNAMinikit (Qiagen), με την χρήση στηλών φυγοκέντρησης.

Τα δείγματα στα οποία έγινε απομόνωση DNA είναι τα εξής:

BM- MSCs, DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10

- Αρχικά μαζεύονται τα απαραίτητα κύτταρα μέσω ενζυμικής μεθόδου και φυγοκέντρησης καθώς και επαναδιάλυσης των κυττάρων αυτών σε μικρή ποσότητα PBS
- Τα κύτταρα τοποθετούνται σε 1.5 ml σωληνάρια συλλογής
- Προσθήκη στα δείγματα 20 μl διαλύματος πρωτέασης K, που είναι υπεύθυνη για την λύση των κυττάρων
- Προσθήκη 200 μlBufferAL και καλή ανάδευση των δειγμάτων. Το BufferAL αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα λύσης όπου περιέχεται απορρυπαντικό και διάφορες αποδιατακτικές ουσίες. Καλή ανάδευση των δειγμάτων
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 56^0C για 10 min
- Σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη 200 μl απόλυτης αιθανόλης (96-100%), vortex για 15 sec.
- Μεταφορά του μείγματος σε μια QIampMini στήλη μέσα σε ένα σωληνάριο συλλογής 2 ml. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1min.
- Απόρριψη του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής και μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής
- Προσθήκη 500 μlBufferAW1 στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 min. Το συγκεκριμένο Buffer καθαρίζει από άλατα και απορρυπαντικά ($1^η$ πλύση)
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής 2 ml και απόρριψη του προηγούμενου

- Προσθήκη 500μlBufferAW2, φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3min(2η πλύση)

- Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής 2 ml (απόρριψη προηγουμένου), ξανά φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 1min

(Βήμα προαιρετικό, ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μεταφοράςBufferAW2)

- Μεταφορά της στήλης σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1.5 ml(απόρριψη προηγούμενου) και προσθήκη σε αυτή 200 μlBufferAE ή απιονισμένου νερού. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (15^{0}C - 25^{0}C) για 1min και τελική φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1min.

Απόρριψη της στήλης.

➡ Το απομονωμένο DNA θα βρίσκεται στο σωληνάριο 1.5 ml

2.8.2 ΣυγκριτικόςΓενωμικόςΥβριδισμός (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η τεχνική του Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού, γνωστή και ως Μοριακός Καρυότυπος, βασίζεται στις μικροσυστοιχίες DNA με στόχο να αναγνωρίσει μικροελλείμματα, μικροδιπλασιασμούς, χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, μεταθέσεις, αναστροφές(όταν υπάρχει ποσοτική αλλαγή) και χρωμοσωμικά θραύσματα. Βασίζεται στην αρχή του ανταγωνιστικού υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων.

1ο βήμα: Ποσοτικοποίηση γενωμικού DNA

Στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο για κάθε υπό μελέτη δείγμα(sample) υπάρχει και ένα γονιδίωμα αναφοράς(reference). Για να μπορέσουν αυτά τα δείγματα να συγκριθούν θα πρέπει να είναι ισομοριακά διότι η μέθοδος είναι συγκριτική. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων πραγματοποιείται με σπεκτοφωτόμετρο.

2ο βήμα: Πέψη γενωμικού DNA(gDNAdigestion)

Στο στάδιο αυτό συμβαίνει πέψη του DNA με τα περιοριστικά ένζυμα AluI και RsaI έτσι ώστε να προσδεθεί καλύτερα η φθορίζουσα χρωστική σε μετέπειτα στάδια.

Αν η ανάλυση γίνει σε 4 δείγματα, θα χρησιμοποιηθούν και 4 reference.

- Ετοιμάζονται 2 PCRstrip για δείγματα και reference και προστίθενται οι κατάλληλοι όγκοι ώστε να είναι ισομοριακά.
- Προετοιμασία του Μείγματος της Πέψης(DigestionReactionMix):

H_2O	2.0x8=16
10x buffer C	2.6x8=20.8
BSA	0.2x8=1.6
AluI	0.5x8=4
RsaI	0.5x8=4

-

- Συνεχής ανάδευση του μείγματος με πιπέτα και μοίρασμα 5.8μl από αυτό σε κάθε σωληνάριο των 2 strip.
- Μεταφορά των δειγμάτων και των reference στο θερμικό κυκλοποιητή (PCR μηχάνημα). Το πρόγραμμα που επιλέγεται είναι το εξής:

37^0C για 2 ώρες → δράση των περιοριστικών ενζύμων

65^0C για 20 λεπτά → απενεργοποίηση των ενζύμων

4^0C επώαση

<u>3ο βήμα :</u> Χρώση του κατακερματισμένου DNALabelingofdigestedgDNA)

- Σε κάθε σωληνάριο των 2 strip προστίθενται 5μlRandomprimers(Lot# 6370616)
- Ακολουθεί μεταφορά όλων των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή για 3 λεπτά και άμεση μεταφορά σε πάγο για 5 λεπτά.

Όσον αφορά την διαδικασία της χρώσης χρησιμοποιούνται διαφορετικές χρωστικές για το δείγμα και για το reference ώστε να μπορούν να διαχωριστούν.

Δείγμα: Cy5→ μπλε χρώμα, κόκκινος φθορισμός

Reference: Cy3→ κόκκινο χρώμα, πράσινος φθορισμός

Τα ακόλουθα βήματα γίνονται μόνο σε σκοτεινό δωμάτιο.

- Ετοιμάζονται 2 διαφορετικά μείγματα (LabelingMasterMix), ένα για κάθε χρωστική.

Lot# 6401765	**5x buffer**	**10x 4=40**
Lot# 6377581	10x dNTP	5x 4=20
Lot# SL1442	Cy-5UTP 1mM	3x 4=12
Lot# 6377579	Klenow frag.	1x 4=4

Lot# 6401765	**5x buffer**	**10x 4=40**
Lot# 6377581	10x dNTP	5x 4=20
Lot# SL1452	Cy-3UTP 1mM	3x 4=12
Lot# 6377579	Klenow frag.	1x 4=4

.

- Μοιράζονται 19 μl από το δείγμα στα σωληνάρια του αντίστοιχου strip.
- Μεταφορά όλων των σωληναρίων, καλυμμένων με αλουμινόχαρτο(διότι οι χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες), στον θερμικό κυκλοποιητή (PCR μηχάνημα), επιλέγοντας το πρόγραμμα που ονομάζεται arrayCGH/ labeling:

37^0C για 2 ώρες

65^0C για 10 λεπτά

Τα δείγματα διατηρούνται στους -20^0C

<u>4ο βήμα</u>: Washes

Αρχικά ρυθμίζονται τα 2 heatblocks στους 98^0C και 37^0C αντίστοιχα. Στο συγκεκριμένο στάδιο χρησιμοποιούνται σωληνάρια με φίλτρα(MicroconYM-30 filter)

- Η ποσότητα του δείγματος και του αντίστοιχου reference μεταφέρονται μαζί σε MicroconYM- 30 filter σωληνάριο. Προστίθενται 430μl TE σε 3 διαδοχικές δόσεις(3x143.3μl)

έτσι ώστε να ξεπλυθούν τα strips που περιείχαν τα δείγματα και τα reference.

- Φυγοκέντρηση γα 10 min σε 14.000g
- Απόρριψη του υπερκειμένου που βρίσκεται στο φίλτρο και προσθήκη 480 μl TE (3x 160μl) σε όλα τα σωληνάρια.
- Φυγοκέντρηση για 10 min σε 14.000g
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και αναποδογυρίζουμε το φίλτρο σε ένα καθαρό 1,5 ml σωληνάριο.
- Φυγοκέντρηση για 1min σε 1.000g.
- Συλλογή του δείγματος και ογκομέτρηση. Με τη διαδικασία αυτή έχει απομακρυνθεί περίσσεια χρωστικής, dNTPs, εκκινητές και έχει παραμείνει μόνο το σημασμένο DNA.

  - Εάν η ποσότητα του δείγματος είναι >39μl επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση.
  - Εάν η ποσότητα του δείγματος είναι <39μl προστίθεται TE ώστε ο όγκος να γίνει 39 μl.

Δείγματα	Μετρούμενος όγκος labeledDNA σε μl	Προσθήκη TE σε μL	Συνολική ποσότητα (μl)
BM- MSCs, p2+ reference	23	16	Vτελ=39μl
DOCK8 iPSCs, p0+ reference	27	12	
DOCK8(11)iPSCs, p5 + reference	23	16	

DOCK8(11)iPSCs, p10 +reference	23	16	

Το χρώμα του δείγματος στο σημείο αυτό θα πρέπει να βιολετί.

5ο βήμα: Υβριδισμός

- Προετοιμασία του μείγματος Υβριδισμού(Hybridizationmix)

	for 4x180K arrays	
Labeled gDNA mixture	39μl	
Cot- I DNA	5μl	Lot#6183457
10x blocking Agent	11μl	Lot#6214045
2x hybridization buffer	55μl	Lot#6324544
Σύνολο	110μl	

- blockingagent: παράγοντας που μειώνει την θερμοκρασία τήξης του DNA και εμποδίζει τον μη ειδικό υβριδισμό.
- HumanCot- IDNA: DNA με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες μπλοκάρουν το επαναλαμβανόμενο DNA που υπάρχει φυσιολογικά καθώς αυτό εμποδίζει την ποιότητα φθορισμού και οδηγεί σε αδυναμία ανίχνευσης ελλειμμάτων και διπλασιασμών.

- Καλή ανάδευση των δειγμάτων με την πιπέτα και τοποθέτηση τους στο heatblock, στους 98^0C για 3 min και στους 37^0C για 30min.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min σε 6.000g και μεταφορά 100μl από κάθε δείγμα στο αντίστοιχο πηγαδάκι του gasket.

Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array1_4
BM- MSCs, p2	DOCK8, p0	DOCK8(11), p5	DOCK8(11), p10

Barcode number μικροσυστοιχείας: 2520983047982

Ακολουθεί υβριδισμός των δειγμάτων στους 67^0C για 24 ώρες.

Μετά τις 24 ώρες υβριδισμού ακολουθεί ξέπλυμα του gasket:

1. Wash buffer 1 για 5 min
2. Wash buffer 2 για 1 min στους 37^0C
3. Rinse με ακετονυτρίλιο

Τέλος, πραγματοποιείται το σκανάρισμα και η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στη διαδικασία του σκαναρίσματος χτυπάει κάθε ένα probe, καταγράφει το σήμα φθορισμού και δημιουργείται φωτογραφία για κάθε slide. Η διαδικασία κρατάει περίπου 15 min για κάθε slide, Η μπλε χρωστική φθορίζει κόκκινη και η κόκκινη φθορίζει πράσινο.

Η στατιστική ανάλυση γίνεται μέσω αλγορίθμου σε κατάλληλο πρόγραμμα.

2.9 Μελέτη της αλληλουχίας και ταυτοποίηση μετάλλαξης στο DOCK8 γονίδιο στα BM- MSCs και στις iPSCs σειρές

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση sequencing στα αρχικά μεσεγχυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών της ασθενούς και στις κυτταρικές σειρές επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο. Η συγκεκριμένη αντίδραση συνέβη για να μελετηθεί η αλληλουχία του γονιδίου που μελετάται και να προσδιοριστεί η μετάλλαξη του γονιδίου DOCK8, που είχε ανιχνευθεί στα BM-MSCs, και στα iPSCs ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η τα συγκεκριμένα προέρχονται από τα αρχικά κύτταρα μετά

από επαναπρογραμματισμό και δεν αποτελούν διαφορετικά κύτταρα που μπορεί να οφείλονται σε επιμολύνσεις ή λανθασμένους χειρισμούς κατά την πειραματική διαδικασία. Οι αλληλουχίες που θα πάρουμε μετά την αντίδραση θα πρέπει να είναι όμοιες

2.9.1 Αντίδραση PCR με συγκεκριμένους εκκινητές για το DOCK8 γονίδιο

Σύμφωνα με τον μοριακό έλεγχο που είχε γίνει στην ασθενή για την εύρεση της αιτίας παθογένειας της, παρουσιάζεται μια ομόζυγη έλλειψη 4 βάσεων (AACT) στο DOCK8 γονίδιο στο χρωμόσωμα 9. Πραγματοποιήσαμε αντίδραση PCR με συγκεκριμένους εκκινητές του γονιδίου αυτού σε 4 δείγματα, τόσο στα αρχικά BM-MSCs όσο και στα iPSCs μετά από διάφορες ανακαλλιέργειες.

DOCK8 NM_203447 C.4408_4411del AACT, P.N1470Vfs8

Εκκινητές για DOCK8 γονίδιο	
Primer Forward	CAGGGATTCAATGATGCTGTTC
Primer Reverse	GTCCACCTGAAGAGAGAAGTATG

Δείγματα για PCR:
1. BM-MSCs, p2
2. DOCK8 iPSCs, p0
3. DOCK8(11)iPSCS, p5
4. DOCK8(11)iPSCs, p10
5. τυφλό(blank)

Αντίδραση PCR(σε θερμοκρασία δωματίου):

Hot Star της Qiagen Multiplex	6 μl x 5	30μl
Primer F	1μl x 5	5μl

Primer R	1μl x 5	5μl
H_2O	5μl x 5	25μl

Συνθήκες PCR:

95^0C 15min

95^0C 30sec

55^0C 45sec

35 κύκλοι

72^0C 30sec

72^0C 8min

20^0Csoak

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα της PCR για κάθε δείγμα φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% TBE. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκαν 5μl δείγματος και 2μlLoadingDye καθώς και 3μl μάρτυρα μεγέθους(ΦΧ174DNA-HaeIIIDigest). Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση με διαφόρα δυναμικού στα 100mV

2.9.2 Αντίδραση Sanger Sequencing

- Ενζυμικός καθαρισμός

Καθαρισμός των παραπάνω PCR προϊόντων (8 δείγματα) με την χρήση 2 ενζύμων: ExoI, rSAP για να καθαριστούν τα προϊόντα από την πρώτη PCR από εκκινητές και dNTPs ώστε να να προχωρήσουμε σε sequencing των δειγμάτων.

- ExoI: η εξωνουκλεάση I αποικοδομεί τους εναπομείναντες εκκινητές της PCR σε κατεύθυνση 3΄ → 5΄
- rSAP: η recombinantShrimpAlkalinePhosphatase είναι αλκαλική φωσφατάση που αποσφωσφορυλιώνει τα εναπομείναντα dNTPs.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πάγο και για κάθε δείγμα έχουμε τις εξής ποσότητες: ExoI 0.25μl

rSAP 0.5μl

0.75μl(mastermix)

+ 2.5μl DNA(pcr προϊόν)

Συνθήκες καθαρισμού (σε θερμικό κυκλοποιητή)

37^0C 15min

80^0C 15min

10^0C soak

- Sequencing reaction

Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων(ddNTPs) που είναι χημικά ανάλογα των νουκλεοτιδίων με την διαφορά ότι στο 3' άκρο τους φέρουν -Η αντί για –ΟΗ. Κάθε ddNTP είναι σημασμένο με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική που απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος. Με την πραγματοποίηση capillaryelectrophoresis προσδιορίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία που επιθυμούμε.

Η αντίδραση πραγματοποείται σε πάγκο χρησιμοποιώντας coldrack των 96 θέσεων καθώς και :

- BigDye Term Buffer
- BigDye Term(enz)
- Εκκινητές M13(5μM), απλοί εκκινητές
- Plates για ABI

Στοιχειομετρία αντίδρασης ανά δείγμα:

BigDye Term Buffer	1,75μl
BigDye Term(enz)	0.25μl
Primer(5μM)	0.32μl
H_20	6.68μl
Συνολικός όγκος	9.00μl

+ 1μlPCR προϊόν

Η συνολική ποσότητα διαμοιράζεται στα πηγαδάκια του plate και στο τέλος προστίθεται η ποσότητα του PCR προϊόντος από το κάθε δείγμα. Το plate μπορεί να φυλαχθεί στο ψυγείο μέχρι το επόμενο βήμα που είναι ο καθαρισμός του sequencing

Συνθήκες αντίδρασης Sequencing:

96^0C	1min	25 κύκλοι
96^0C	10sec	
55^0C	5sec	
60^0C	4min	
4^0C	soak	

- <u>Καθαρισμός αντίδρασης με αιθανόλη(ethanolprecipitation)</u>

Τα δείγματα βρίσκονται σε PCRplate των 96 θέσεων και για τον καθαρισμό του sequencing θα πρέπει να καλυφθούν οι κενές θέσεις του plate με πλαστικό κάλυμμα.

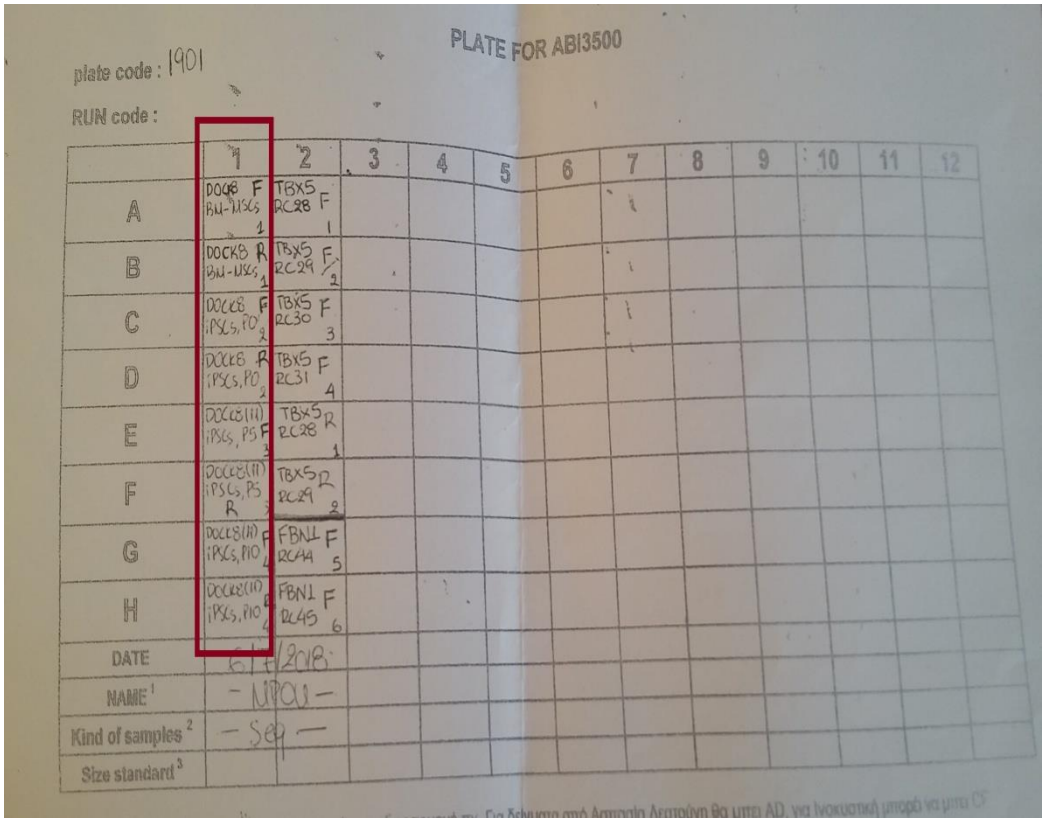
Σε σωληνάριο 15ml ετοιμάζεται το μείγμα EtOH/NH4Ac σε ποσότητες(ανά δείγμα):

EtOH(100%)	55μl
NH4Ac(7.5M)	2μl

- Αρχικά προστίθεται η ποσότητα EtOH στο σωληνάριο και στη συνέχεια αργά στα τοιχώματα γίνεται η προσθήκη NH4Ac
- Σε κάθε θέση του plate9(αντίδραση sequencing συνολικού όγκου 10μl) μεταφέρονται 29μl μίγματος με μια 8κάναλη πιπέττα και ακολουθεί ανάδευση. Η μεταφορά γίνεται προσεχτικά ακουμπώντας τα ρύγχη στον πάτο των θέσεων του plate
- Toplate καλύπτεται με μεμβράνη και αποθηκεύεται για 30min σε στο ψυγείο (4^0C). Σε περίπτωση που υπάρχει μόνο ένα plate δημιουργείται αντίβαρο με 39μl μίγματος σε κάθε πηγαδάκι
- Φυγοκέντρηση του plate σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σε 2210g για 30 min στους 4^0C
- Αφαίρεση πλαστικού καλύμματος από την επιφάνεια του plate και αναποδογύρισμα του πάνω σε χειροπετσέτες

- Τοποθέτηση αναποδογυρισμένου plate σε φυγόκεντρο και φυγοκέντρηση σε 200g για 2 min σε 4^0C
- Προσθήκη 50μlEtOH 70% σε κάθε δείγμα και φυγοκέντρηση σε 2210g για 3min σε 4^0C
- Επανάληψη ίδιας διαδικασίας αναποδογυρίσματος plate και φυγοκέντρηση σε 200g για 3min σε 4^0C
- Προσθήκη 10μl HiDi (αφού πρώτα έχει στεγνώσει το plate) σε κάθε πηγαδάκι με δείγμα , ανακίνηση σε vortex και “spin’’ στην φυγόκεντρο
- Το plate που χρησιμοποιήθηκε με κωδικό 1901 τοποθετείται στο ABI GeneticAnalyzer 3500 για τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και ακολουθεί ‘’διάβασμα’’ των αποτελεσμάτων

Τα δείγματα που έτρεξαν στο ABI εμφανίζονται με την μορφή κορυφών όπου κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία βάση. Οι βάσεις(και οι αντίστοιχες κορυφές) εμφανίζονται με διαφορετικό χρώμα και συνήθως συναντάμε τα εξής χρώματα : Α(αδενίνη), Τ(θυμίνη),G(γουανίνη), C(κυτοσίνη).



Εικόνα 2.3 Δείγματα με τη σειρά που φορτώθηκαν στο plate 1901 για να τρεξουν στο ABI: BM-MSCsF(A1),BM-MSCsR(B1), DOCK8 p0 F(C1), DOCK8 p0 R(D1), DOCK8(11)p5 F(E1), DOCK8(11) p5 R(F1), DOCK8(11)p10 F (G1), DOCK8(11) p10R(H1). F=forwARD, r=reverse

2. 10 Invitro έλεγχος της πολυδυναμίας των iPSCs σειρών με τη δημιουργία εμβρυϊκών σωματιδίων(embryoidbodies)

Τα εμβρυικά σωματίδια αποτελούν τρισδιάστατα συσσωματώματα που δημιουργούνται από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και μπορούν να διαφοροποιηθούν στα 3 βλαστικά δέρματα από τα οποία δημιουργούνται όλοι οι ιστοί του ανθρώπινου οργανισμου(Evansetal., 1981; Yingetal., 2008; Brickmanetal., 2018). Με την διαφοροποίηση των iPSCs σε embryoid bodies ελέγχεται η ικανότητα πολυδυναμίας τους. Για την δημιουργία των σωματιδίων αυτών είναι απαραίτητα τα τρυβλία χαμηλής προσδεσιμότητας, το EBSmedium και η απουσία bFGF.

<u>Για την παραγωγή EBs καλλιεργητικού υλικού:</u>

Knockout DMEM	1X
Knockout Serum Replacement	20%
MEM Non Essential Amino Acids	1%
L- Glutamine	1mM
B- Mercaptoethanol	0.1mM

Προσθήκη 2 ml EBs υλικού σε plates χαμηλής προσκόλλησης(Low-attachmentplates) και απομόνωση iPSCs με την διαδικασία ανακαλλιέργειας που προαναφέρθηκε. Επαναδιάλυση ιζήματος μετά την φυγοκέντρηση σε EBs υλικό χωρίς αναδεύσεις ώστε να έχουμε μεγάλα συσσωματώματα και όχι μικρά η μονήρη κύτταρα. Προσεκτική μεταφορά των κυττάρων στα plates για να μην σπάσουν τα συσσωματώματα, διότι στην αντίθετη περίπτωση δεν θα μπορέσουν να δημιουργηθούν εμβρυϊκά σωματίδια. Μεταφορά των κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο και αλλαγή υλικού κάθε 2-3 μέρες για μια εβδομάδα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων(iPSCs) μέσω επαναπρογραμματισμού με συνθετικά μόρια mRNA

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μέθοδος επαναπρογραμματισμού με τη χρήση μορίων mRNA που εκφράζουν τους εξής παράγοντες πολυδυναμίας: OCT4, Sox2, Lin28, KLf4 και c-Myc. Η απόδοση της διαπερατότητας των κυττάρων από τα mRNA , ελεγχόταν με mRNA της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης nGFP. Πειράματα επαναπρογραμματισμού εφαρμόστηκαν σε μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών(BM-MSCs) ασθενούς με Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας λόγω μετάλλαξης στο DOCK8 γονίδιο. Επίσης προγραμματίστηκαν και ανθρώπινοι ινοβλάστες (BJfibroblasts) που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας. Η διαμόλυνση των κυττάρων με mRNA πραγματοποιούταν καθημερινά για περίπου 14 ημέρες και παρατηρούνταν συνεχώς οι μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων αυτών καθώς και η έκφραση της nGFP πρωτεϊνης σε ανάστροφο μικροσκόπιο(σχήμα 3.1). Από την πρώτη εβδομάδα των πειραμάτων παρατηρήθηκε μετατροπή της μεσεγχυματικούς μορφολογίας των BM- MSCs και BJ σε επιθηλιακή μορφολογία. Πρώτες ενδείξεις για σχηματισμό iPSCs αποικιών εμφανίζονται από την $10^{η}$ ημέρα, ενώ τυπικές μορφολογικά αποικίες iPSCs από την $13^{η}$ ημέρα της πειραματικής διαδικασίας(σχήμα 3.2). Η απόδοση της διαμόλυνσης των BM-MSCs ανέρχεται στο 0.4%.

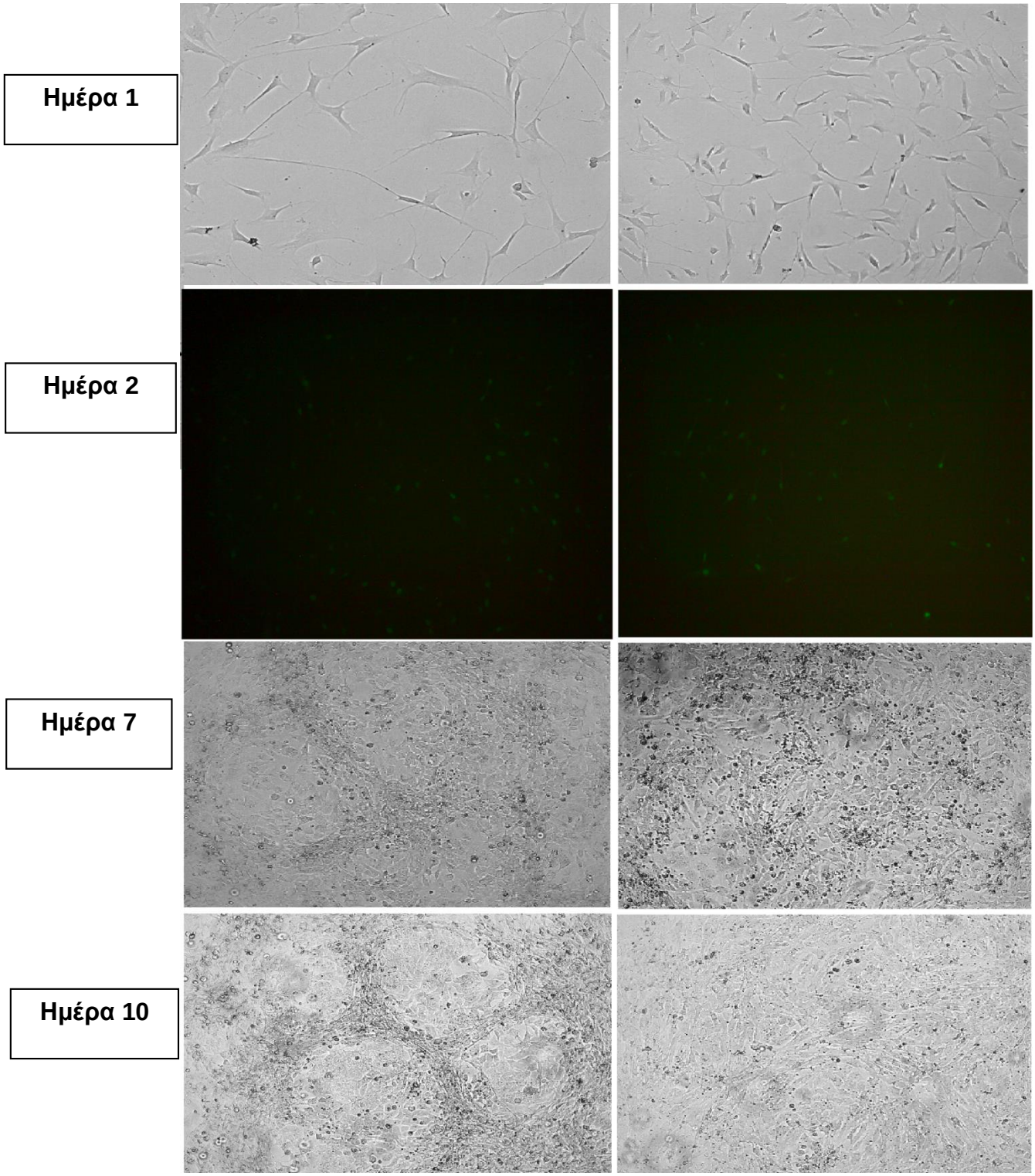
Στον πίνακα 3.1 αναφέρονται τα αποτελέσματα από την διαδικασία επαναπρογραμματισμού στις 2 κυτταρικές σειρές.

Κυτταρική σειρά	Αριθμός αποικιών/10^4	Ημέρες διαμόλυνσης	Ημέρα εμφάνισης αποικίας	Συνολικές ημέρες εκτέλεσης πειράματος	Απόδοση (%)
BM-MSCs	40	14	10	62	0.4

BJ	37	14	12	25	3.7

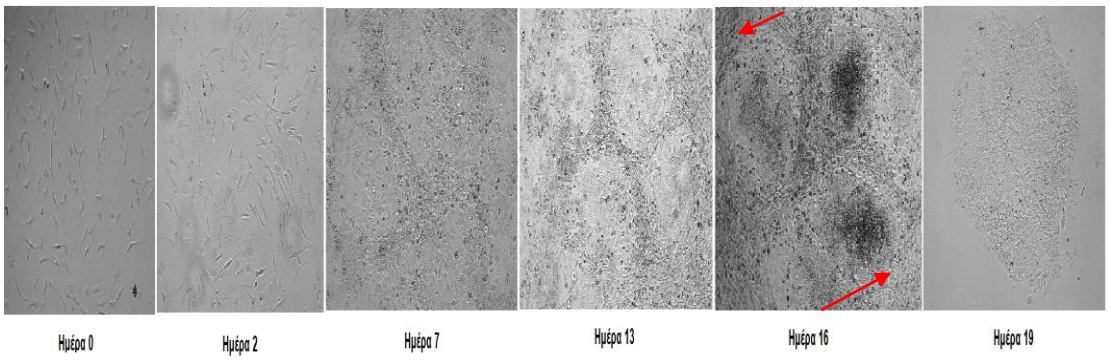
Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα διαδικασίας επαναπρογραμματισμού σε BM-MSCs και BJ. Ως απόδοση αναφέρεται το ποσοστό των κυττάρων-στόχων που επαναπρογραμματίζεται πλήρως και υπολογίζεται από το πηλίκο των iPSCs αποικιών που καταμετρώνται στο τέλος του πειράματος προς τον αρχικό αριθμό των κυττάρων- στόχων. Στην απόδοση του πειράματος παίζει σημαντικό ρόλο ο αρχικός αριθμός των κυττάρων που πρόκειται να επαναπρογραμματιστούν. Τα iPSCs από BJ, αφού καλλιεργήθηκαν για μια εβδομάδα μετά τον επαναπρογραμματισμό,καταψύχθηκαν ενώ τα iPSCs από BM-MSCs συνεχίστηκαν για την δημιουργία κυτταρικών σειρών.

BM - MSCs	**BJ**



Σχήμα 3. 1 Παρατήρηση και σύγκριση μορφολογικών αλλαγών μεταξύ των 2 κυτταρικών σειρών BM- MSCs και BJ σε διάφορες ημέρες κατά την διάρκεια του επαναπρογραμματισμού(ανάστροφο μικροσκόπιο, 10x). Στις εικόνες που αντιστοιχούν στην ημέρα 2, παρατηρείται ο αριθμός των κυττάρων που έχει διαμολυνθεί με τα mRNA μόρια , μέσω φθορισμού της nGFP πρωτεΐνης .

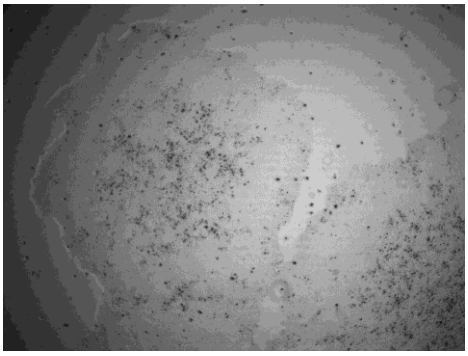
	Επίστρωση κυττάρων	Καθημερινή διαμόλυνση με συνθετικά mRNA	Αύξηση DOCK8iPSCs αποικιών	Απομόνωση DOCK8iPSC αποικιών
Ημέρες	**-2**	**0 – 13**	**14 - 16**	**16+**

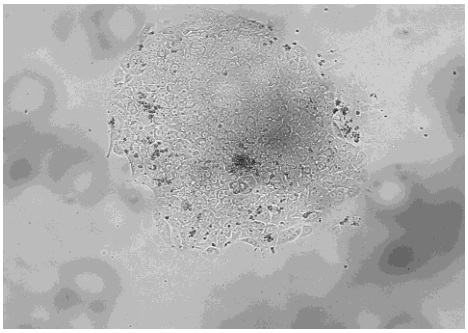


Σχήμα 3.2 Επαναπρογραμματισμός BM – MSCs ασθενούς με Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας λόγω μετάλλαξης στο DOCK8 γονίδιο. Στο σχήμα απεικονίζεται μια χρονολογική καταγραφή του πειράματος σε συνδυασμό με μορφολογικές απεικονίσεις.

3.2 Δημιουργία DOCK8 iPSCs σειρών

Κάθε αποικία iPSCs από την 16η μέρα και μετά, απομονωνόταν μέσω της τεχνικής manualpicking και τοποθετούταν σε διαφορετικό well με σκοπό κάθε μία από αυτές να δώσει μια ολόκληρη κυτταρική σειρά. Απομονώσαμε συνολικά 13 αποικίες, οι οποίες καλλιεργήθηκαν ξεχωριστά(εικόνα 3.1). Από αυτές η 2η και η 6η αποικία ακυρώθηκαν, διότι από την πρώτη ανακαλλιέργεια τους εμφάνισαν στην καλλιέργεια τους πολλά διαφοροποιημένα κύτταρα. Οι υπόλοιπες εμφάνισαν έντονο πολλαπλασιαστικό δυναμικό χωρίς τάση για διαφοροποίηση και μετά από τουλάχιστον 5 ανακαλλιέργειες δημιούργησαν διάφορες κυτταρικές σειρές. Η κάθε κυτταρική σειρά ονομαζόταν DOCK8 iPSCs και τον αριθμό απομόνωσης τους(π.χ DOCK8(13)iPSCs). Από αυτές επιλέχθηκε μόνο μία, η DOCK8(11)iPSCs, η οποία συνέχισε να καλλιεργείται και χρησιμοποιήθηκε για μοριακές και γενετικές μελέτες, ενώ οι άλλες καταψύχθηκαν με την μέθοδο της βαθμιαίας κρυοκατάψυξης. Η επιλογή της συγκεκριμένης σειράς έγινε με βάση τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος καλλιέργειας της, όπως το πολλαπλασιαστικό δυναμικό και την μορφολογία των αποικιών της.



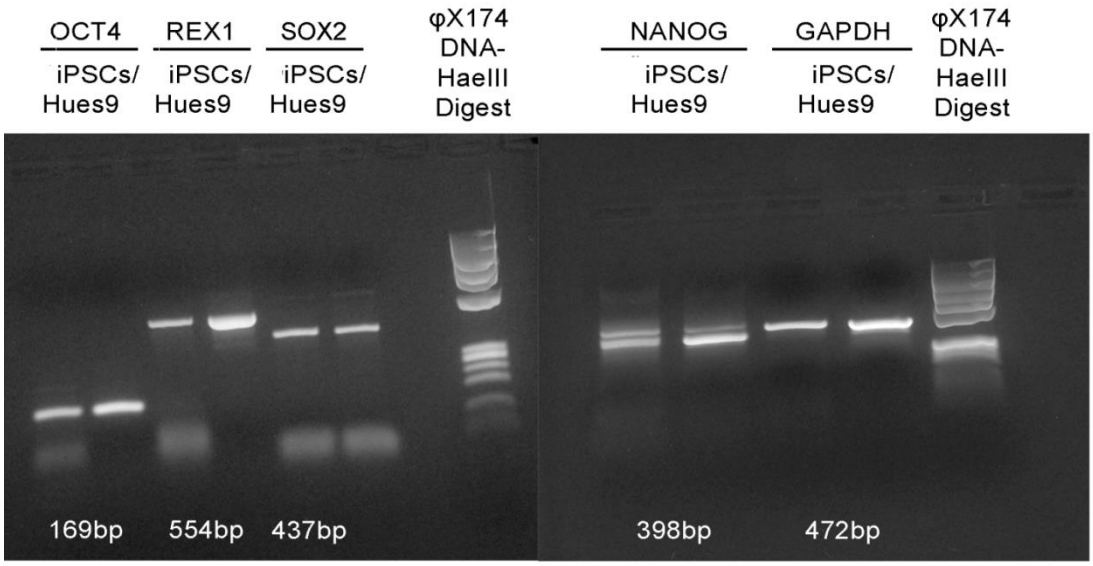


Εικόνα 3.1 Απεικόνιση DOCK8iPSCs αποικιών διαφόρων κυτταρικών σειρών(ανάστροφο μικροσκόπιο 10x, 4x) (i) DOCK8(7)iPSCsp3 (10x), (ii) DOCK8(11)iPSCsp5 (10x), (iii)DOCK8(13)iPSCsp2 (4x)

3.3 Χαρακτηρισμός DOCK8 iPSCs

3.3.1 Έλεγχος πολυδυναμίας DOCK8- iPSCs σειρών

Ο έλεγχος πολυδυναμίας των επαγόμενων πολυδύναμων κυτταρικών σειρών που δημιουργήθηκαν, έγινε με την τεχνικής της PCR- Αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR). Μελετήθηκε η έκφραση 4 παραγόντων πολυδυναμίας : OCT-4, NANOG, SOX2 και REX-1 στις DOCK8(11)iPSCs σειρές με γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας η κυτταρική σειρά εμβρυονικών βλαστοκυττάρων HUES-9. Το αποτέλεσμα του συγκεκριμένου ελέγχου έδειξε την υπερέκφραση όλων των παραγόντων αυτών σε επίπεδο mRNA στα DOCK8 iPSCs όπως είναι γνωστό ότι συμβαίνει και στα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, προσδιορίζοντας την πολυδυναμία των κυττάρων αυτών. Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα της RT- PCR των DOCK8 iPSCs σε σύγκριση με την σειρά HUES- 9 φαίνεται στην εικόνα 3. 2.



Εικόνα 3.2 Έκφραση μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας OCT4, REX1, SOX2, NANOG στις DOCK8 iPCS σειρές, με θετικό μάρτυρα την HUES- 9 κυτταρική σειρά και γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Ως μάρτυρας μεγέθους χρησιμοποιήθηκε φX174 DNA-HaeIIIDigest(η εικόνα αναφέρει αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος και αποτελεί μέρος της δημοσίευσης *Sfougatakietal., 2019).*

3.3.2 Αξιολόγηση γενετικής σταθερότητας DOCK8 iPSCs

Με σκοπό να ελεγχθεί εάν η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού με συνθετικά μόρια mRNA καθώς και οι συνεχείς ανακαλλιέργειες των iPSCS σειρών που προκύπτουν, επηρεάζουν την γενετική σταθερότητα και προσκαλούν γενετική αστάθεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος με μικροσυστοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού(aCGH). Η γενετική αστάθεια αναφέρεται σε ελλείμματα ή διπλασιασμούς του γενετικού υλικού. Ο γενετικός έλεγχος έγινε στα αρχικά BM – MSCs του ασθενούς, στα DOCK8 iPSCs μετά το τέλος του επαναπρογραμματισμού και πριν την πρώτη ανακαλλιέργεια(p0), στην σειρά DOCK8(11)iPSCs που επιλέχθηκε κατά την 5^{η} ανακαλλιέργεια(p5) και στα DOCK8(11)iPSCs κατά την 10^{η} ανακαλλιέργεια(p10). Η συγκεκριμένη επιλογή των δειγμάτων στηρίχτηκε στο γεγονός ότι χρειαζόμαστε τα αρχικά MSCs ώστε να συγκρίνουμε την συμβολή του επαναπρογραμματισμού, καθώς και στην δυνατότητα εντοπισμού γενετικής αστάθειας οφειλόμενη στο περιβάλλον καλλιέργειας και στη διαδικασία ανακαλλιεργειών.

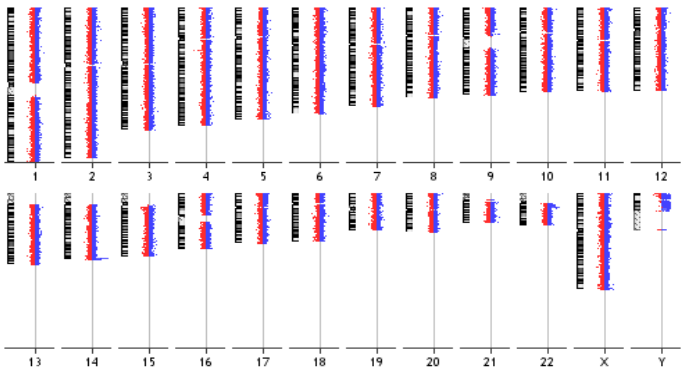
Τα αποτελέσματα του aCGH έδειξαν, ότι σε γενικότερο βαθμό μετά τον επαναπρογραμματισμό, τα iPSCs παρουσίαζαν ένα φυσιολογικό μοριακό καρυότυπο παρόμοιο με αυτό των BM–MSCs (εικόνα 3.3).Εντοπίστηκαν κάποια μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμοί (πίνακας 3.2) στο γενετικό υλικό των iPSCs, σε όλα τα στάδια της καλλιέργειας που ελέγχθηκαν(p0, p5,

p10), τα οποία όμως θεωρούνται κοινά και συνήθη και χαρακτηρίζονται ως φυσιολογικά CNVs(CopyNumberVariations). Τα συγκεκριμένα CNVs (πίνακας 3.) δεν ανευρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με ογκογένεση, σε ογκοκατασταλτικά γονίδια ή σε γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

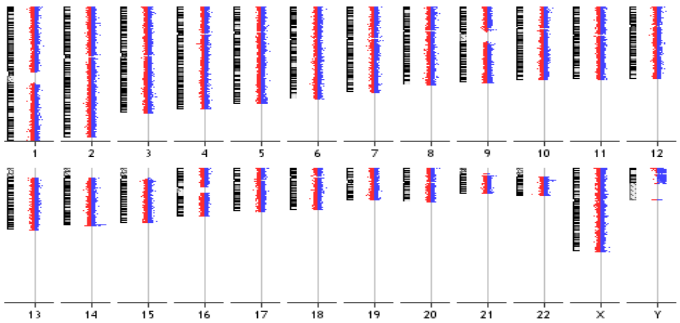
Χρωμοσωμική περιοχή	Μέγεθος (Kb)	αρχή-τέλος(hg19)	*Γονίδιο*	Κυτταρική σειρά
DEL 1q24.2	103	168849941-168952647	*LINC00970*	DOCK8(11)iPSCs p5
DUP 2p11.2	118	89141608-89258800	_	BM-MSCs/DOCK8p0/ DOCK8(11)p5/ DOCK8(11)p10
DEL 4q13.2	91	69392576-69483277	*UGT2B17*	BM-MSCs/ DOCK8(11) p5
DUP 5q13.2	1071	69238677-70309855	*LOC653080, SERF1A, SERF1B, SMN2,SMN1, SMA4, GUSBP3, GTF2H2B, SMA5, LOC441081,GUSBP9,NAIP*	DOCK8(11) P5
DUP 8p23.1	226.5	12241093-12467543	*FAM66A, DEFB109A, FAM90A25P, FAM86B2, LOC100506990, LOC729732*	DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10
DUP 8p11.22	122.6	39258894-39381514	*ADAM5, ADAM3A*	DOCK8 p0
DUP 9p12 – p11.2	153.67	43505843-43659512	*FAM74A7, SPATA31A6*	DOCK8 p0
DUP 14q32.33	166.8	106371690-106538480	*FAM30A, ADAM6*	BM- MSCs, DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10
DUP 14q32.33	397	106561123-106957950	*LINC00226, LINC00221*	BM-MSCs, DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10
DUP 17q21.31	327.3	44188441-44515744	*KANSL1, KANSL1-AS1, ARL17B, LRRC37A, ARL17A, NSFP1*	BM-MSCs, DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10

DUP 22q11.22	171.9	23056562-23228483	*MIR650, MIR5571*	BM-MSCs, DOCK8 p0, DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10
DEL 22q13.32	162.2	49010148-49172342	*FAM19A5*	DOCK8 p0

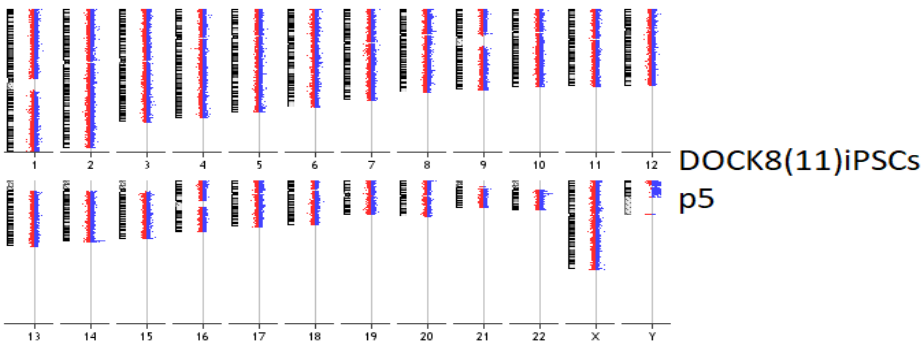
Πίνακας 3.2 Καταγραφή των μικροελλειμάτων και μικροδιπλασιασμών (aCGH) που παρατηρήθηκαν στα αρχικά BM- MSCs του ασθενούς και αυτών που διατηρήθηκαν ή προέκυψαν στα iPSCs μετά τον επαναγραμματισμό (DOCK8 p0) και τις επακόλουθες συνεχείς καλλιέργειες(DOCK8(11) p5, DOCK8(11) p10).

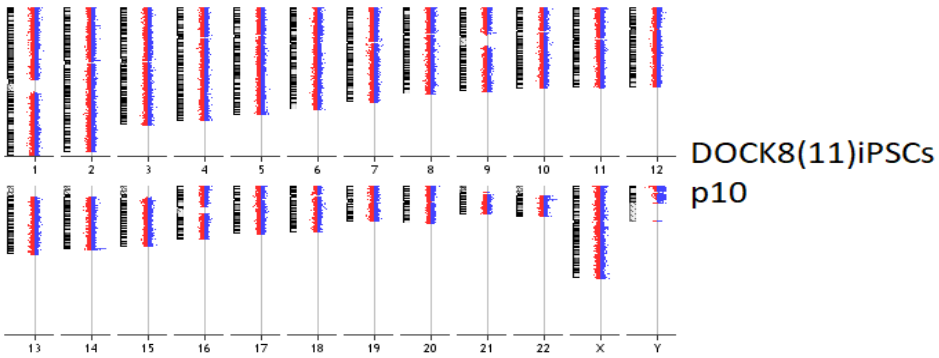


BM-MSCs



DOCK8iPSCs p0



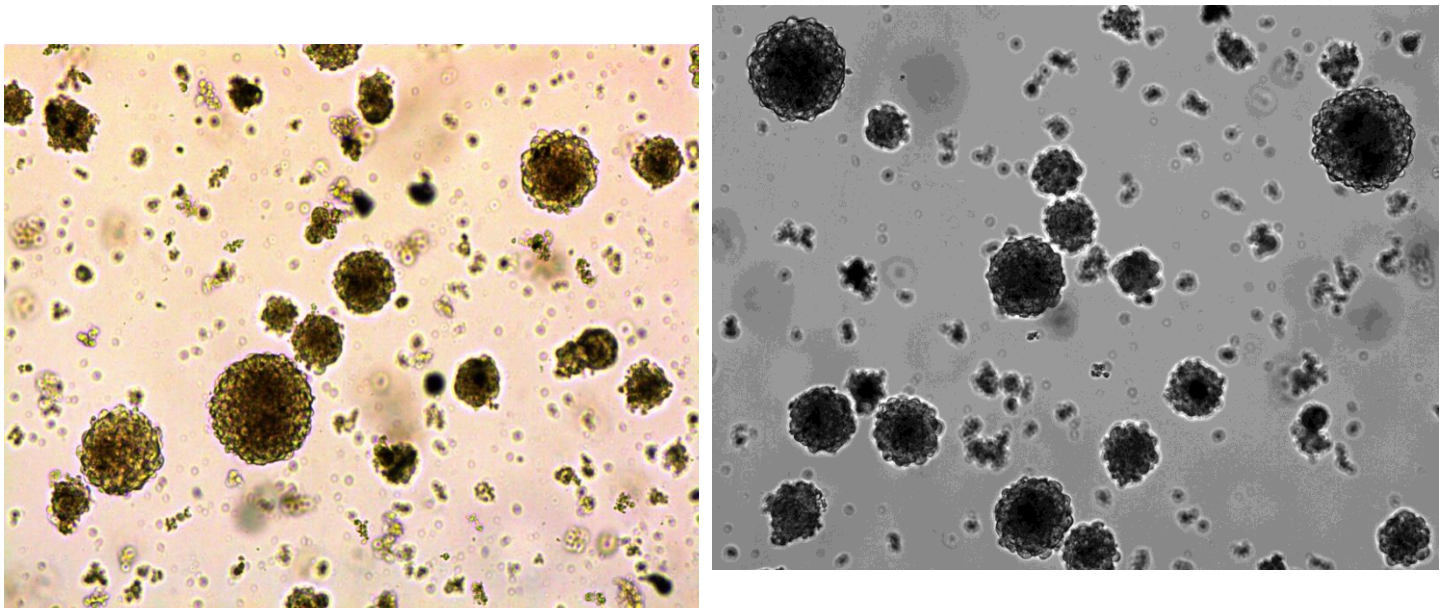


Εικόνα 3.3 Μοριακόςκαρυότυπος (aCGH) τωνBM-MSCs ασθενούςμε DOCK8 ανοσοανεπάρκεια, DOCK8iPSCs p0, DOCK8(11)iPSCs p5, DOCK8(11)iPSCs p10. Παρατηρείται γενετική σταθερότητα των iPSCs τόσο σε σύγκριση με τα αρχικά MSCs μετά τον επαναπρογραμματισμό, όσο και μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους.

3.3.3 In vitro μελέτη δυναμικού πολυδυναμίας

Για έναν πιο ολοκληρωμένο έλεγχο της πολυδυναμίας των iPSCs σειρών, αξιολογήθηκε η ικανότητα των κυττάρων αυτών να σχηματίζουν εμβρυϊκά σωματίδια(embryoidbodies).Σε χαμηλής προσκόλλησης plates με κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό, η καλλιέργεια των iPSCs για 7 ημέρες οδήγησε στην δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων (εικόνα 3.4). Τα σωματίδια άρχισαν να παρατηρούνται από τις πρώτες ημέρες καλλιέργειας. Η δημιουργία των τρισδιάστατων αυτών σωματιδίων είναι αποτέλεσμα

αυτόματης invitro διαφοροποίησης των iPSCs και αντιπροσωπεύει την διαφοροποίηση στα 3 βλαστικά δέρματα: ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα. Η επιτυχής δημιουργία εμβρυικών σωματιδίων από τα DOCK8iPSCs αποτελεί άλλη μια απόδειξη του δυναμικού πολυδυναμίας τους.



Εικόνα 3.4 Invitro διαφοροποίηση DOCK8 iPSCs σχηματίζοντας εμβρυϊκά σωματίδια. Οι εικόνες αποτελούν λήψεις(10x, ανάστροφο μικροσκόπιο) διαφορετικών περιοχών του ίδιου well(6-well, low attachment plate) κατά την 5η ημέρα καλλιέργειας.

3.3.4 Αξιολόγηση παραγωγής νοσοειδικών – iPSCs(disease – specific iPSCs)

Το BM-MSCs που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα προέρχονται από ασθενή με Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας λόγω μετάλλαξης στο DOCK8 γονίδιο. Η μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε αποτελεί μια ομόζυγη έλλειψη 4 βάσεων (AACT) στο DOCK8 γονίδιο του χρωμοσώματος 9. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η παραγωγή iPSCs σειρών που θα προέρχονται από τα αρχικά BM-MSCs, ειδικά για την συγκεκριμένη νόσο(νοσοειδικά–iPSCs) φέροντας την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αλληλουχίας του γονιδίου DOCK8 στο χρωμόσωμα 9 με τη μέθοδο SangerSequencing σε 4 δείγματα : BM- MSCs, DOCK8iPSCsp0, DOCK8(11)iPSCsp5, DOCK8(11)iPSCsp10. Τα αποτελέσματα της μεθόδου συγκρίθηκαν με την φυσιολογική αλληλουχία (253 bp) του DOCK8 γονιδίου, που επιλέχθηκε μέσω in silico (USCS) προγράμματος με συγκεκριμένους εκκινητές(σχήμα 3.3). Η ύπαρξη της μετάλλαξης επιβεβαιώθηκε όπως ήταν αναμενόμενο στα αρχικά κύτταρα αλλά και σε όλες τις iPSCs σειρές(εικόνα 3.5) υποδηλώνοντας ότι προέρχονται από τα BM- MSCs του ασθενούς μετά από

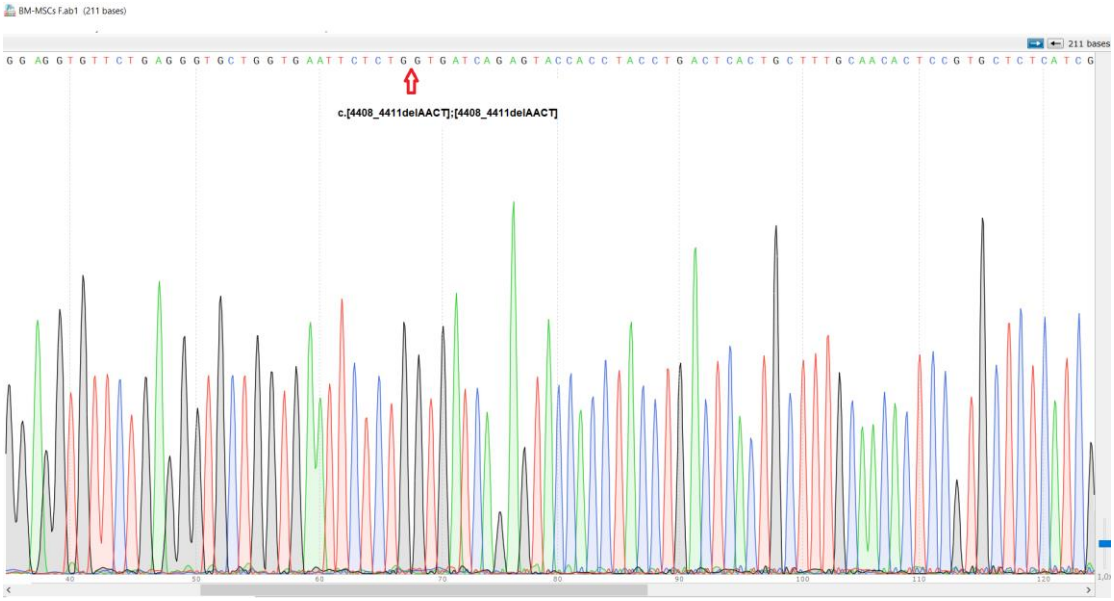
επαναπρογραμματισμό και δεν αποτελούν κάποια επιμόλυνση με διαφορετικό τύπο κυττάρων .

DOCK8 NM_203447 C.4408_4411delAACT, P.N1470Vfs8

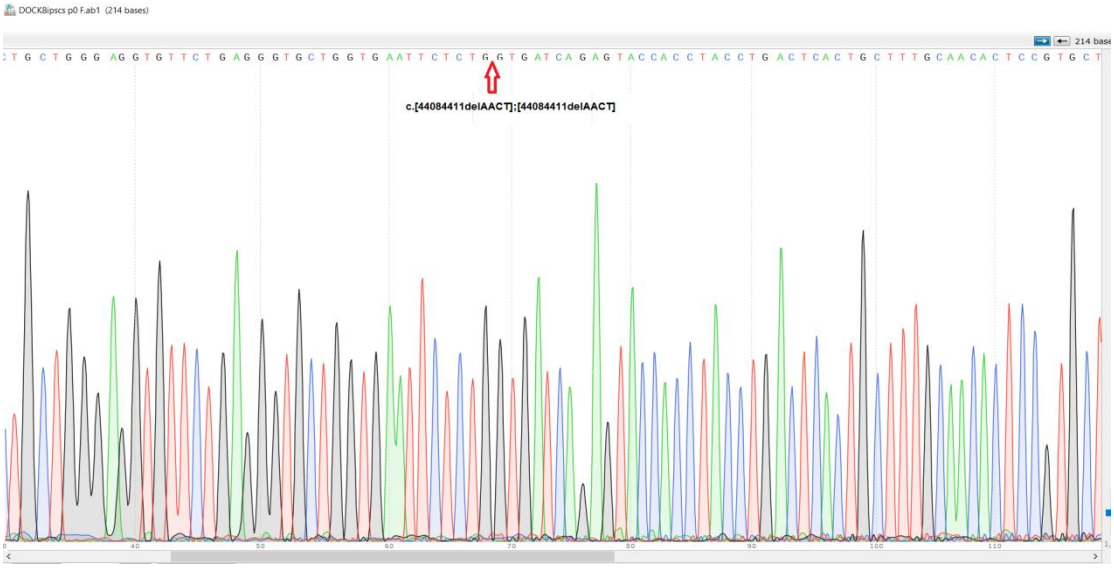
(GRCh38/hg38) chr9: 428326 + 428578 253bp
cagggattcaatgatgctgttcttccattcccccagGCGAGCTCGGCTCTGGACTGTAAAGACAGCCTGCTGG
GAGGTGTTCTGAGGGTGCTGGTGAATTCTCTGAACTGTGATCAGAGTACCACCTACCTGACTCAC
TGCTTTGCAACACTCCGTGCTCTCATCGCCAAGgtaaacttgggatgcttgttttcttcctcttaattaagagtaag
attctcatctagcttcatacttctctcttcaggtggaccaaaagtcacagagcatattaagtggcatcacacagtaaa

Σχήμα 3.3. Περιγραφή μετάλλαξης και αλληλουχίας αναφοράς(φυσιολογική αλληλουχία, 253bp) του DOCK8 γονιδίου στο χρωμόσωμα 9. Με πράσινο χρώμα σημαίνεται η αλληλουχία του εκκινητή forward, με κόκκινο του εκκινητή reverse και με κίτρινο χρώμα σημαίνονται οι 4 βάσεις ,η έλλειψη των οποίων χαρακτηρίζει την υπό μελέτη μετάλλαξη.

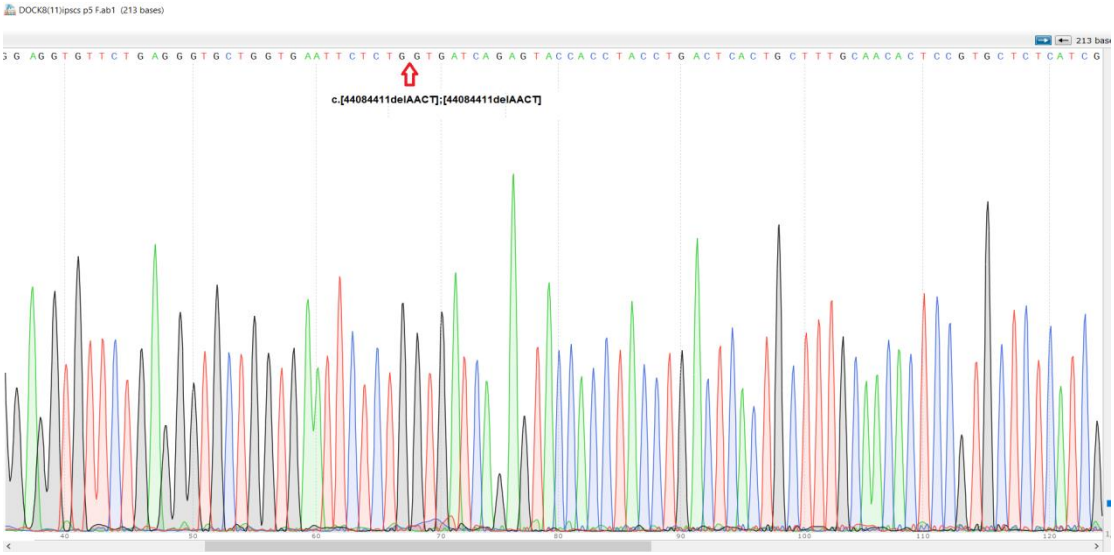
I. i.



I. ii.


DOCK8ipscs p0 F.ab1 (214 bases)
c.[44084411delAACT];[44084411delAACT]

iii.


DOCK8(11)ipscs p5 F.ab1 (213 bases)
c.[44084411delAACT];[44084411delAACT]

iv.

Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα μεθόδου SangerSequencing, μελέτη της αλληλουχίας DOCK8 γονιδίου και ανίχνευση μετάλλαξης **c**.[4408_4411delAACT];[4408_4411delAACT]. (i) BM-MSCs, (ii) DOCK8 iPSCs p0, (iii) DOCK8(11)iPSCs p5, (iv) DOCK8(11)iPSCs p10

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το 1958 για πρώτη φορά δημιουργήθηκε η ιδέα ότι τα σωματικά κύτταρα μπορούν να επιστρέψουν στην αδιαφοροποίητη μορφή τους, καθώς οι Gurdon et al., χρησιμοποίησαν την τεχνική της πυρηνικής μεταφοράς διαφοροποιημένου κυττάρου σε απύρηνο ωοκύτταρο. Το 2006, οι Takahasi and Yamanaka κατορθώνουν να υλοποιήσουν αυτή την ιδέα μέσω της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων και δημιουργώντας τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα(iPSCs), ανοίγοντας ένα νέο κεφάλαιο στην ιστορία της έρευνας και της εξατομικευμένης ιατρικής.

Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, με σκοπό την αποδοτική δημιουργία ασφαλών iPSCs για περαιτέρω εφαρμογή σε κλινικό επίπεδο. Οι τεχνικές αυτές είναι διαφόρων ειδών και περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση ή μη γενετικού υλικού. Οι αρχικές έρευνες για την παραγωγή iPSCs στηρίζονταν κυρίως στην χρήση ιϊκών φορέων για την διαμόλυνση των κυττάρων με τους μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας (Maherali et al., 2008). Η μέθοδος αυτή όμως παρόλο το υψηλό επίπεδο αποτελεσματικότητας ενέχει διαφόρους κινδύνους, όπως την ενσωματώση του γενετικού υλικού του φορέα και την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης και ογκογένεσης(Murkherjee et al., 2011). Για το λόγο αυτό άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως τεχνικές που αποφεύγουν την ενσωμάτωση και συνεχή έκφραση γενετικού υλικού. Στις τεχνικές αυτές ανήκει και η μέθοδος επαναπρογραμματισμού με συνθετικά μόρια mRNA, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Η επιλογή της μεθόδου στηρίχθηκε στα εξής: αποτελεί μια από τις ασφαλέστερες μεθόδους δημιουργίας iPSCs, εύκολα εφαρμόσιμη στο εργαστήριο και με ικανοποιητική απόδοση.(Warren et al., 2010). Εκτός όμως των πλεονεκτημάτων έναντι άλλων μεθόδων, ο επαναπρογραμματισμός με συνθετικά μόρια mRNA φαίνεται να απαιτεί καθημερινή διαμόλυνση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς η πείρα της μεθόδου είναι περιορισμένη, κυρίως σε εμβρυϊκούς και δερματικούς ινοβλάστες. Παρόλα αυτά, υποστηρίζεται ότι με

την βελτίωση των μειονεκτημάτων κάποιων πρωτοκόλλων, η χρήση των μορίων mRNA που εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες πολυδυναμίας θα αποτελεί την ασφαλέστερη μέθοδο κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, έστω όσον αφορά τις ανησυχίες για γονιδιακό αποτύπωμα των φορέων διαμόλυνσης στα iPSCs (Warren et al., 2018).

Στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ήταν ο επαναπρογραμματισμός μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων από τον μυελό των οστών παιδιού με DOCK8, Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας, μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής. Τα BM – MSCs αποτελούν ένα συχνό εργαλείο και μια υποσχόμενη πηγή δημιουργίας iPSCs, καθώς απομονώνονται εύκολα από διάφορους ιστούς και έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τους ινοβλάστες όπως προσκόλληση σε πλαστικές επιφάνειες και έντονο πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Επίσης, καθώς αποτελούν πλειοδύναμα ενήλικα στελεχιαία κύτταρα και υποστηρίζεται ότι έχουν μια πιο μεγάλη ροπή προς τον επαναπρογραμματισμό σε σχέση με τα ώριμα ενήλικα σωματικά κύτταρα (Kouroschetal., 2016). Γενικότερα έχουν δημιουργηθεί πολλές iPSCs σειρές από MSCs προερχόμενα από διαφόρους ιστούς, όπως από λιπώδη ιστό, οδοντικό πολφό, μυελό των όστων, λίγες όμως είναι οι αναφορές δημιουργίας iPSCs από MSCs με συνθετικά μόρια mRNA υποστηρίζοντας την περιορισμένη πείρα της μεθόδου σε ποικιλία κυτταρικών τύπων (Lister et al., 2011; Yan et al., 2010; Shao et al., 2013; Warren et al., 2018).

Τα BM – MSCs μετά από 14 μέρες διαμόλυνσης με μόρια mRNA εμφάνισαν αδιαφοροποίητες iPSCs αποικίες. Ο αριθμός των κυττάρων που τελικά θα επαναπρογραμματιστεί ποικίλει και εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων, η μέθοδος επαναπρογραμματισμού αλλά και ο κυτταρικός τύπος. Η απόδοση του επαναπρογραμματισμού ανέρχεται στο 0,4% για τα BM – MSCs ενώ στο 3,7% για τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Human BJ Foreskin Fibroblasts – BJ) που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας. Τα BM-MSCs εμφάνισαν ένα ικανοποιητικό ποσοστό επαναπρογραμματισμού για τη συγκεκριμένη μέθοδο που αντιστοιχεί περίπου σε 100 αποικίες ανά well, ενώ είναι σημαντικά υψηλό σε σχέση με άλλες μελέτες. Συγκεκριμένα, επαναπρογραμματισμός BM - MSCs παιδιών με αιματολογικές ασθένειεις,

όπως β – Θαλασσαιμία, DiamonBlackfan, Απλαστική αναιμία εμφανίζει απόδοση 0,05% - 0,26%(Varelaetal., 2014; Sfougatakietal., 2019). Επίσης, προηγούμενη μελέτη επαναπρογραμματισμού MSCs από λιπώδη ιστό ενήλικα παρουσίασε ποσοστό απόδοσης 0,05% (Heng et al., 2013). Η υψηλή απόδοση των BJείναι συγκρίσιμη με άλλες μελέτες επαναπρογραμματισμού ινοβλαστών με την ίδια μέθοδο, η οποία μπορεί να ανέρχεται μέχρι 4,4% (Warren et al., 2012), υποστηρίζοντας την άποψη ότι οι ινοβλάστες αποτελούν εύκολα επαναπρογραμματιζόμενα κύτταρα για αυτό και χρησιμοποιούνται ευρέως (Gonzalez et al., 2011).

Μετά από την 13η ημέρα του πρωτοκόλλου επαναπρογραμματισμού παρατηρήθηκαν αποικίες μορφολογικά έστω όμοιες με επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκυττάρα, οι οποίες στην συνέχεια απομονώθηκαν και έδωσαν διάφορες κυτταρικές σειρές. Η καλλιέργεια των iPSCs απαιτεί προσοχή, χειρισμούς υπό στείρες συνθήκες και καθημερινή αλλαγή κατάλληλου καλλιεργητικού υλικού που διατηρεί την κατάσταση πολυδυναμίας των κυττάρων (Lugwig et al., 2006). Επιπρόσθετα είναι πολύ σημαντικός ο καθημερινός έλεγχος του περιβάλλοντος καλλιέργειας και των αποικιών ώστε να πραγματοποιηθεί την κατάλληλη στιγμή η ανακαλλιέργεια των κυττάρων και να ελαχιστοποιηθεί η ύπαρξη διαφοροποιημένων κυττάρων και τοξικές συνθήκες καλλιέργειας. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία δημιουργήθηκαν επιτυχώς 13 αποικίες, και από αυτές μόνο δύο παρουσίασαν έντονη τάση για διαφοροποίηση και απορρίφθηκαν.

Τα iPSCs που δημιουργήθηκαν παρουσιάζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά των ESCs, σχηματίζοντας αποικίες με καθορισμένα όρια και δυνατότητα αυτοαναέωσης. Κρίνεται όμως απαραίτητος ο έλεγχος της πολυδυναμίας τους για τον πλήρη χαρακτηρισμό τους. Ο έλεγχος έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων OCT-4, Sox 2, Nanog, Rex-1 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο RT – PCR, όπου και επιβεβαιώθηκε η έκφραση τους και η πολυδυναμία όλων των iPSCs σειρών που δημιουργήθηκαν. Εκτός από την έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας, τα πλήρως επαναπρογραμματισμένα κύτταρα θα πρέπει να ελέγχονται και για την ικανότητα διαφοροποίησης τους καθώς η ίδια αποτελεί ένα ακόμη βασικό κριτήριο για τον χαρακτηρισμό ενός κυττάρου ως βλαστικό. Σύμφωνα με μελέτες, οι iPSCs σειρές που δημιουργούνται στην ίδια

πειραματική διαδικασία και προέρχονται από τα ίδια αρχικά κύτταρα, δεν αναπτύσσονται όλες με τον ίδιο ρυθμό και καθεμία μπορεί να είναι επιγενετικά μοναδική με διαφορετικό δυναμικό διαφοροποίησης (Hu e tal., 2010; Shao et al., 2013). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάθε κυτταρική σειρά που προκύπτει θα πρέπει να ελέγχεται και για το δυναμικό διαφοροποίησης της. Ο έλεγχος της πολυδυναμίας και της πιθανής διαφοροποίησης μπορεί να γίνει είτε invitro με τη δημιουργία εμβρυϊκών σωματιδίων είτε invivoμε τη δημιουργία τερατωμάτων σε ζωικά μοντέλα και συνήθως σε ποντίκια, ενώ ο συνδυασμός τους αποτελεί έναν ολοκληρωμένο έλεγχο των χαρακτηριστικών των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (Itskovitz et al.,200). Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε μόνο invitro έλεγχος πολυδυναμίας, καθώς λόγω περιορισμένου χρονικού περιθωρίου δεν ήταν εφικτή η δημιουργία τερατωμάτων. iPSCs σειρές από το DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας, υπό τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, δημιούργησαν επιτυχώς τρισδιάστατα κυτταρικά συσσωματώματα, τα εμβρυϊκά σωματίδια, επιβεβαιώνοντας για ακόμη μια φορά την πολυδυναμία τους σε invitro στάδιο. Έρευνες υποστηρίζουν ότι τα εμβρυϊκά σωματίδια μιμούνται έως ένα βαθμό ορισμένες πτυχές της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης,μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα των 3 βλαστικών δερμάτων, ενώ αποτελούν το αρχικό βήμα σε πρωτόκολλα κατευθυνόμενης διαφοροποίησης των iPSCs ως προς ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (Brickman et al., 2016).

Η επίπτωση του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού αλλά και της καλλιέργειας των iPSCs για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην γενετική σταθερότητα των ίδιων , αποτελεί ακόμη ένα πεδίο ανησυχίας για τους ερευνητές. Διάφορες μελέτες αναφέρουν γενετική αστάθεια στα iPSCs, η οποία δημιουργείται είτε από τον επαναπρογραμματισμό, ανεξάρτητα της μεθόδου, είτε από τις συνεχείς ανακαλλιέργειες (Mayshar et al., 2010; Taapken et al., 2011). Επίσης, είναι ευρέως γνωστό ότι χρωμοσωμικές μεταλλαγές, όπως ανευπλοειδίες και πολυμορφισμοί αριθμού αντιγράφων-Copy Number Variations (CNVs) παρατηρούνται συχνά στα iPSCs, η ανησυχία όμως εισέρχεται στο κατά πόσο αυτά επηρεάζουν περιοχές ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα και αν μπορούν να προκαλέσουν ογκογόνο

δυναμικό σε αυτά (Laurent et al., 2011; Kang et al., 2015). Η ανάλυση της γενετικής σταθερότητας των iPSCs σειρών που δημιουργήσαμε πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των μικροσυστοιχειών DNA (array-cCGH-aCGH), σε διάφορες ανακαλλιέργειες των κυττάρων(p0, p5, p10) ώστε να εντοπιστούν οι επιπτώσεις της μακροπρόθεσμής καλλιέργειας, αλλά η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και στα αρχικά BM- MSCs(θετικός μάρτυρας) ώστε να ανιχνευθούν οι επιπτώσεις του επαναπρογραμματισμού. Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν ότι τα DOCK8iPSCs σε σύγκριση με τα BM-MSCs εμφάνιζαν έναν φυσιολογικό σταθερό καρυότυπο μετά τον επαναπρογραμματισμό αλλά και σε όλα τα στάδια της καλλιέργειας που ελέγχθηκαν. Παρατηρήθηκαν επίσης, κάποια CNVs όπως ήταν αναμενόμενο, τα οποία όμως δεν θεωρούνται παθολογικά και δεν σχετίζονται με κίνδυνο ογκογένεσης. Σε γενικές γραμμές τα DOCK8iPSCs παρουσίασαν γενετική σταθερότητα , η οποία συνάδει και με άλλες μελέτες δημιουργίας ασφαλών και γενετικά σταθερών iPSCs (Laurent et al., 2011; Mayhar et al., 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, ένας από τους κύριους στόχους εφαρμογής των iPSCs είναι ο μοντελισμός ασθενειών με στόχο την εύρεση πιθανών θεραπειών. Μέχρι τώρα έχουν δημιουργηθεί iPSCs από διάφορες ασθένειες (Rowe et al., 2019) και ένας από τους σκοπούς της πειραματικής διαδικασίας ήταν η δημιουργία iPSCs σειρών από το DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας. Ο ασθενής που μελετήθηκε εμφάνιζε, όπως ήταν αναμενόμενο από τις βιβλιογραφικές αναφόρες της αιτιοπαθογένειας της νόσου, έλλειψη στο γονίδιο DOCK8 και συγκεκριμένα 4 βάσεων. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος με SangerSequencing στα iPSCs και στα BM-MSCs ώστε να ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη και να εξασφαλιστεί ότι όντως προέρχονται από την αρχικά BM- MSCs του ασθενούς με την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Σε σύγκριση με την φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου, προέκυψε ότι όλα τα iPSCs παρουσίαζαν την υπό μελέτη έλλειψη και χαρακτηρίστηκαν ως νοσοειδικά για το DOCK8 Σύνδρομο. Μέχρι τώρα, η μεγάλη ποικιλία βιβλιογραφικών αναφορών για νοσοειδικά iPSCs περιλαμβάνει και διάφορες ανοσοανεπάρκειες (Karagiannisetal., 2019). Συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί διάφορες μελέτες δημιουργίας iPSCs από

Πρωτογενή Σύνδρομα Ανοσοανεπάρκειας(PIDs),ενώ δεν έχει παρατηρηθεί ακόμη δημιουργία iPSCs από το DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας.

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα αποτελούν ένα μείζον πεδίο της έρευνας, το οποίο υπόσχεται πολλές και εντυπωσιακές εφαρμογές που θασυμβάλλουν στην βελτίωση της διάγνωσης και θεραπείας διαφόρων ασθενειών. Παρόλο η τεχνολογία δημιουργίας των iPSCs (κυτταρικός επαναπρογραμματισμός)από σωματικά κύτταρα, έχει διανύσει παραπάνω από μια δεκαετία από την πρώτη εφαρμογή, με συνεχείς προόδους στην εξέλιξη της τεχνολογία, παρατηρούνται ακόμη κάποια εμπόδια που τα κάνουν να απέχουν από την ευρεία εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Οι τρέχουσες προσπάθειες στρέφονται στην αντιμετώπιση των συγκεκριμένων προβλημάτων και επικεντρώνονται στα εξής βασικά ζητήματα: (i) εξέλιξή και δημιουργία ασφαλέστερων μεθόδων κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, (ii) συμβατή με GMP(Good Manufacturing Practices) παραγωγή, καλλιέργεια και διαφοροποίηση των κυττάρων, (iii) συμβολή της γενετικής επιδιόρθωσης, (iv) προκλινική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των κυττάρων (Haake et al., 2018).

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία δημιουργήθηκαν για πρώτη φορά, σύμφωνα με τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, νοσοειδικά iPSCs για το DOCK8 Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας με μια ασφαλή και υψηλής απόδοσης μέθοδο κυτταρικού επαναπρογραματισμού. Τα iPSCs εμφάνισαν γενετική σταθερότητα και ικανότητα πολυδυναμίας προσφέροντας θετικά αποτελέσματα και προδιαγραφές για την χρήση τους ως βάση στην μελέτη της αιτιοπαθογένειας της συγκεκριμένης νόσου. Οι αναφερόμενες κυτταρικές σειρές πληρούν αρκετά κριτήρια για να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για την μελέτη της αιτίας και της φυσιολογίας της νόσου. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί αυτό, κρίνονται απαραίτητες περαιτέρω μελέτες για έναν πιο ολοκληρωμένο έλεγχο σε *invitro* και σε *invivo* επίπεδο, της λειτουργικότητας, της ικανότητας διαφοροποίησης, αλλά και της ασφάλειας των DOCK8iPSCs, ώστε να αποτελέσουν ένα σημαντικό εργαλείο για την μοντελοποίηση του DOCK8 Συνδρόμου Ανοσοανεπάρκειας και την αναζήτηση πιθανών θεραπειών του.

5. Σχήματα, Εικόνες και Πίνακες

5.1 Παράθεση Σχημάτων

Σχήμα 3. 1. Παρατήρηση και σύγκριση μορφολογικών αλλαγών μεταξύ των 2 κυτταρικών σειρών BM- MSCs και BJ σε διάφορες ημέρες κατά την διάρκεια του επαναπρογραμματισμού

Σχήμα 3.2 Επαναπρογραμματισμός BM – MSCs ασθενούς με Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας λόγω μετάλλαξης στο DOCK8 γονίδιο.

Σχήμα 3.3. Περιγραφή μετάλλαξης και αλληλουχίας αναφοράς(φυσιολογική αλληλουχία, 253bp) του DOCK8 γονιδίου στο χρωμόσωμα 9.

5.2 Παράθεση Εικόνων

Εικόνα 1.1 Απεικόνιση αυτοανανέωσης βλαστικών στελεχιαίων κυττάρων

Εκόνα 1.2 Ιστορικό χρονόδιάγραμμα δημιουργίας και εξέλιξης iPSCs

Εικόνα 1.3 Δημιουργία iPSCs μέσω επαναγρομματισμού με παράγοντες πολυδυναμίας σωματικών κυττάρων και διαφοροποίηση τους σε διάφορους κυτταρικούς

Εικόνα 1.4 Διάφορες τεχνικές κυτταρικού επαναπρογραμματισμού για την δημιουργία iPSCs με την ενσωμάτωση ή όχι γενωμικού υλικού.

Εικόνα 1.5 Η χρήση των iPSCs στην έρευνα και την αναγγενητική ιατρική

Εικόνα 1.6 Ιδιότητες μεσεγχυματικών στελεχιαίων κυττάρων

Εικόνα 1.7 Ιδιότητες της πρωτεΐνης που εκφράζεται από το DOCK8 γονίδιο και συμβάλλει στην εμφάνιση DIDS

Εικόνα 2.1 Διαδικασία ανανέωσης θρεπτικού υλικού MSCs σε 25cm^2 φλάσκες σε θάλαμο νηματικής ροής

Εικόνα 2.2 Διαχωρισμός ορίων αποικίας από γειτονικά κύτταρα κατά τη μέθοδο μηχανικής απομόνωσης (manualpicking)

Εικόνα 2.3 Δείγματα με τη σειρά που φορτώθηκαν στο plate 1901 για να τρεξουν στο ABI

Εικόνα 3.1 Απεικόνιση DOCK8iPSCs αποικιών διαφόρων κυτταρικών σειρών

Εικόνα 3.2 Έκφραση μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας

Εικόνα 3.3 Μοριακόςκαρυότυπος (aCGH) τωνBM-MSCs ασθενούςμε DOCK8 ανοσοανεπάρκεια, DOCK8iPSCs p0, DOCK8(11)iPSCs p5, DOCK8(11)iPSCs p10

Εικόνα 3.4 Invitro διαφοροποίηση DOCK8 iPSCs σχηματίζοντας εμβρυϊκά σωματίδια

Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα μεθόδου Sanger Sequencing

5.3 Παράθεση Πινάκων

Πίνακας 1.1 Παραδείγματα iPSCs σειρών από σωματικά κύτταρα ασθενών διαφόρων νοσημάτων

Πίνακας 2.1 Αλληλουχίες εκκινητών μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας και μέγεθος προϊόντων αντιδράσεων PCR

Πίνακας 3.1. Αποτελέσματα διαδικασίας επαναπρογραμματισμού σε BM-MSCs και BJ

Πίνακας 3.2 Καταγραφή των μικροελλειμάτων και μικροδιπλασιασμών (aCGH)

6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

TA Transit – Amplifying cells

TD Terminally Differentiated

ICM Inner Cell Mass

ESCs Embryonic Stem Cells

iPSCs induced Pluripotent Stem Cells

hESCs human Embryonic Stem Cells

OCT4 Octamer – Binding Transcription factor 4

Sox2 SRY – box2

Klf4 Kruppel- Like factor 4

C – Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

OSKM Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

PB PiggyBac

SS Single Stranded

miRs microRNAs

HACs Human Artificial Chromosomes

aCGH Array Comparative Genomic Hybridization

MSCs Mesenchymal stromal cells

ADA-SCID Severe Combined Immunodeficiency Due to Adenosine DeaminaseDeficiency

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Mitalipov, Shoukhrat, and Don Wolf. “Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 114 (2009): 185–99.

[2] Rossant, Janet. “Stem Cells from the Mammalian Blastocyst.” *STEM CELLS* 19, no. 6 (2001): 477–82.

[3] Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffrey M. Jones. “Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.” *Science* 282, no. 5391 (November 6, 1998): 1145–47.

[4] Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126, no. 4 (August 25, 2006): 663–76.

[5] Menon Lata G., Sonia Picinich, Rajeth Koneru, Hui Gao, Siang Yo Lin, Mythili Koneru, Philipp Mayer-Kuckuk, John Glod, and Debabrata Banerjee. “Differential Gene Expression Associated with Migration of Mesenchymal Stem Cells to Conditioned Medium from Tumor Cells or Bone Marrow Cells.” *STEM CELLS* 25, no. 2 (2007): 520–28.

[6] Evans, M. J., and M. H. Kaufman. “Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos.” *Nature* 292, no. 5819 (July 1981): 154–56.

[7] Martin, G. R. “Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, no. 12 (December 1981): 7634–38.

[8] Abeyta, Michael J., Amander T. Clark, Ryan T. Rodriguez, Megan S. Bodnar, Renee A. Reijo Pera, and Meri T. Firpo. “Unique Gene Expression Signatures of Independently-Derived Human Embryonic Stem Cell Lines.” *Human Molecular Genetics* 13, no. 6 (March 15, 2004): 601–8.

[9] Gurdon J.B, Elsdale T.R and Fischberg M. “Sexually Mature Individuals of Xenopus Laevis f... - Xenbase Paper.” Accessed October 9, 2019.

[10] Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. Campbell. “Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells.” *Nature* 385, no. 6619 (February 27, 1997): 810–13.

[11] Patel, Shyam A., Justin R. Meyer, Steven J. Greco, Kelly E. Corcoran, Margarette Bryan, and Pranela Rameshwar. “Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-

Derived TGF-Beta." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184, no. 10 (May 15, 2010): 5885–94.

[12] Singh, Vimal K., Manisha Kalsan, Neeraj Kumar, Abhishek Saini, and Ramesh Chandra. "Induced Pluripotent Stem Cells: Applications in Regenerative Medicine, Disease Modeling, and Drug Discovery." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3 (2015): 2.

[13] Maherali, Nimet, Tim Ahfeldt, Alessandra Rigamonti, Jochen Utikal, Chad Cowan, and Konrad Hochedlinger. "A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 3, no. 3 (September 11, 2008): 340–45.

[14] Somers, Aba, Jyh-Chang Jean, Cesar A. Sommer, Amel Omari, Christopher C. Ford, Jason A. Mills, Lei Ying, et al. "Generation of Transgene-Free Lung Disease-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28, no. 10 (October 2010): 1728–40.

[15] Stadtfeld, Matthias, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, and Konrad Hochedlinger. "Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration." *Science (New York, N.Y.)* 322, no. 5903 (November 7, 2008): 945–49.

[16] "Methods for Making Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming à La Carte. - PubMed - NCBI." Accessed October 14, 2019.

[17] Pakzad, Mohammad, Mehdi Totonchi, Adeleh Taei, Ali Seifinejad, Seyedeh Nafiseh Hassani, and Hossein Baharvand. "Presence of a ROCK Inhibitor in Extracellular Matrix Supports More Undifferentiated Growth of Feeder-Free Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells upon Passaging." *Stem Cell Reviews and Reports* 6, no. 1 (March 2010): 96–107.

[18] Wernig, Marius, Jian-Ping Zhao, Jan Pruszak, Eva Hedlund, Dongdong Fu, Frank Soldner, Vania Broccoli, Martha Constantine-Paton, Ole Isacson, and Rudolf Jaenisch. "Neurons Derived from Reprogrammed Fibroblasts Functionally Integrate into the Fetal Brain and Improve Symptoms of Rats with Parkinson's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 15 (April 15, 2008): 5856–61.

[19] Chang, Chia-Wei, Yi-Shin Lai, Kevin M. Pawlik, Kaimao Liu, Chiao-Wang Sun, Chao Li, Trenton R. Schoeb, and Tim M. Townes. "Polycistronic Lentiviral Vector for 'Hit and Run' Reprogramming of Adult Skin Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27, no. 5 (May 2009): 1042–49.

[20] Graham, N. M., S. L. Zeger, L. P. Park, S. H. Vermund, R. Detels, C. R. Rinaldo, and J. P. Phair. "The Effects on Survival of Early Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection." *The New England Journal of Medicine* 326, no. 16 (April 16, 1992): 1037–42.

[21] "Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus That Does Not Integrate into ... - PubMed - NCBI." Accessed October 17, 2019.

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

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

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

[25] Nakagawa, Masato, Michiyo Koyanagi, Koji Tanabe, Kazutoshi Takahashi, Tomoko Ichisaka, Takashi Aoi, Keisuke Okita, Yuji Mochiduki, Nanako Takizawa, and Shinya Yamanaka. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells without Myc from Mouse and Human Fibroblasts." *Nature Biotechnology* 26, no. 1 (January 2008): 101–6.

[26] Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 122, no. 6 (September 23, 2005): 947–56.

[27] Loh, Yuin-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. "The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells." *Nature Genetics* 38, no. 4 (April 2006): 431–40.

[28] Chen, Yen Shun, Rebecca A. Pelekanos, Rebecca L. Ellis, Rachel Horne, Ernst J. Wolvetang, and Nicholas M. Fisk. "Small Molecule Mesengenic Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Generate Mesenchymal Stem/Stromal Cells." *Stem Cells Translational Medicine* 1, no. 2 (February 2012): 83–95.

[29] Li, Ronghui, Jialiang Liang, Su Ni, Ting Zhou, Xiaobing Qing, Huapeng Li, Wenzhi He, et al. "A Mesenchymal-to-Epithelial Transition Initiates and Is Required for the Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts." *Cell Stem Cell* 7, no. 1 (July 2, 2010): 51–63.

[26] Samavarchi-Tehrani, Payman, Azadeh Golipour, Laurent David, Hoon-Ki Sung, Tobias A. Beyer, Alessandro Datti, Knut Woltjen, Andras Nagy, and Jeffrey L. Wrana. "Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming." *Cell Stem Cell* 7, no. 1 (July 2, 2010): 64–77.

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

[28] Rossant, Janet. “Stem Cells and Early Lineage Development.” *Cell* 132, no. 4 (February 22, 2008): 527–31.

[29] Park, In-Hyun, Natasha Arora, Hongguang Huo, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Akiko Shimamura, M. William Lensch, Chad Cowan, Konrad Hochedlinger, and George Q. Daley. “Disease-Specific Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells.” *Cell* 134, no. 5 (September 5, 2008): 877–86.

[30] Dimos, John T., Kit T. Rodolfa, Kathy K. Niakan, Laurin M. Weisenthal, Hiroshi Mitsumoto, Wendy Chung, Gist F. Croft, et al. “Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons.” *Science (New York, N.Y.)* 321, no. 5893 (August 29, 2008): 1218–21.

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

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

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

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

[35] “Drug Screening for Human Genetic Diseases Using IPSC Models.” Accessed October 18, 2019.

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

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

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

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

[40] Alper, Joe. “Geron Gets Green Light for Human Trial of ES Cell–Derived Product.” News. Nature Biotechnology. Accessed October 20, 2019.

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

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

[43] Haake, Kathrin, Mania Ackermann, and Nico Lachmann. “Concise Review: Towards the Clinical Translation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Blood Cells—Ready for Take-Off.” *Stem Cells Translational Medicine* 8, no. 4 (December 26, 2018): 332–39.

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

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

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

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

[48] KYOTO UNIVERSITY. “Clinical trial begins for iPS cell-based therapy for Parkinson’s disease (30 July 2018). [49] Gore, Athurva, Zhe Li, Ho-Lim Fung, Jessica E. Young, Suneet Agarwal, Jessica Antosiewicz-Bourget, Isabel Canto, et al. “Somatic Coding Mutations in Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 471, no. 7336 (March 3, 2011): 63–67.

[50] Araki, Ryoko, Eiji Mizutani, Yuko Hoki, Misato Sunayama, Sayaka Wakayama, Hiroaki Nagatomo, Yasuji Kasama, Miki Nakamura, Teruhiko Wakayama, and

Masumi Abe. “The Number of Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells and Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Depends on the Method and Somatic Cell Type Used for Their Generation.” *STEM CELLS* 35, no. 5 (2017): 1189–96.

[51] Deng, Jie, Robert Shoemaker, Bin Xie, Athurva Gore, Emily M. LeProust, Jessica Antosiewicz-Bourget, Dieter Egli, et al. “Targeted Bisulfite Sequencing Reveals Changes in DNA Methylation Associated with Nuclear Reprogramming.” *Nature Biotechnology* 27, no. 4 (April 2009): 353–60.

[52] Hochedlinger, Konrad, and Rudolf Jaenisch. “Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, no. 12 (December 2015).

[53] Kuttler, F., and S. Mai. “C-Myc, Genomic Instability and Disease.” *Genome Dynamics* 1 (2006): 171–90.

[54] Doss, Michael Xavier, and Agapios Sachinidis. “Current Challenges of IPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications.” *Cells* 8, no. 5 (30 2019).

[55] Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, and I. V. Keiliss-Borok. “Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues. Cloning in Vitro and Retransplantation in Vivo.” *Transplantation* 17, no. 4 (April 1974): 331–40.

[56] Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina. “Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs.” *Experimental Hematology* 4, no. 5 (September 1976): 267–74.

[57] Zomorodian, Elham, and Mohamadreza Baghaban Eslaminejad. “Mesenchymal Stem Cells as a Potent Cell Source for Bone Regeneration.” *Stem Cells International* 2012 (2012): 1–9.

[58] Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. “Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 8, no. 4 (2006): 315–17.

[59] Elahi, Kourosch C., Gerd Klein, Meltem Avci-Adali, Karl D. Sievert, Sheila MacNeil, and Wilhelm K. Aicher. “Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns.” *Stem Cells International* 2016 (2016).

[60] Caplan, Arnold I., and James E. Dennis. “Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators.” *Journal of Cellular Biochemistry* 98, no. 5 (August 1, 2006): 1076–84.

[61] Le Blanc, Katarina, Cecilia Götherström, Olle Ringdén, Moustapha Hassan, Robert McMahon, Edwin Horwitz, Göran Anneren, et al. “Fetal Mesenchymal Stem-Cell Engraftment in Bone after in Utero Transplantation in a Patient with Severe Osteogenesis Imperfecta.” *Transplantation* 79, no. 11 (June 15, 2005): 1607–14.

[62] Bianco, Paolo, Xu Cao, Paul S. Frenette, Jeremy J. Mao, Pamela G. Robey, Paul J. Simmons, and Cun-Yu Wang. “The Meaning, the Sense and the Significance: Translating the Science of Mesenchymal Stem Cells into Medicine.” *Nature Medicine* 19, no. 1 (January 2013): 35–42.

[63] Bernardo, Maria Ester, Angela Maria Cometa, Daria Pagliara, Luciana Vinti, Francesca Rossi, Rosaria Cristantielli, Giuseppe Palumbo, and Franco Locatelli. “Ex Vivo Expansion of Mesenchymal Stromal Cells.” *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 24, no. 1 (March 2011): 73–81.

[64] Hass, Ralf, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm, and Roland Jacobs. “Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC.” *Cell Communication and Signaling: CCS* 9 (May 14, 2011): 12.

[65] Engelhardt, Karin R., Sean McGhee, Sabine Winkler, Atfa Sassi, Cristina Woellner, Gabriela Lopez-Herrera, Andrew Chen, et al. “Large Deletions and Point Mutations Involving the Dedicator of Cytokinesis 8 (DOCK8) in the Autosomal-Recessive Form of Hyper-IgE Syndrome.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, no. 6 (December 2009): 1289-1302.e4.

[66] Keles, Sevgi, Louis Marie Charbonnier, Venkataraman Kabaleeswaran, Ismail Reisli, Ferah Genel, Nesrin Gulez, Waleed Al-Herz, et al. “Dedicator of Cytokinesis 8 Regulates Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation and Promotes TH17 Cell Differentiation.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138, no. 5 (November 1, 2016): 1384-1394.e2.

[67] Biggs, Catherine M., Sevgi Keles, and Talal A. Chatila. “DOCK8 Deficiency: Insights into Pathophysiology, Clinical Features and Management.” *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 181 (2017): 75–82.

[68] Zhang, Qian, Huie Jing, and Helen C. Su. “Recent Advances in DOCK8 Immunodeficiency Syndrome.” *Journal of Clinical Immunology* 36, no. 5 (July 2016): 441–49.

[69] Xu, X. F., Y. J. Sheng, X. F. Tao, Y. N. Shao, L. F. Tang, and Z. M. Chen. “[New point variation of DOCK8 gene in hyper IgE syndrome].” *Zhonghua Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Pediatrics* 57, no. 3 (March 2, 2019): 227–29.

[70] French, Andrew J., CatharinFe A. Adams, Linda S. Anderson, John R. Kitchen, Marcus R. Hughes, and Samuel H. Wood. “Development of Human Cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer with Adult Fibroblasts.” *Stem Cells* 26, no. 2 (February 2008): 485–93.

[71] Mukherjee, Sayandip, and Adrian J. Thrasher. “IPSCs: Unstable Origins?” *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19, no. 7 (July 2011): 1188–90.

[72] Warren, Curtis R., and Chad A. Cowan. “Humanity in a Dish: Population Genetics with IPSCs.” *Trends in Cell Biology* 28, no. 1 (January 2018): 46–57.

[73] Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Yasuyuki S. Kida, R. David Hawkins, Joseph R. Nery, Gary Hon, Jessica Antosiewicz-Bourget, et al. “Hotspots of Aberrant Epigenomic Reprogramming in Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 471, no. 7336 (March 2011): 68–73.

[74] Shao, Kaifeng, Carmen Koch, Manoj K Gupta, Qiong Lin, Michael Lenz, Stephanie Laufs, Bernd Denecke, et al. “Induced Pluripotent Mesenchymal Stromal Cell Clones Retain Donor-Derived Differences in DNA Methylation Profiles.” *Molecular Therapy* 21, no. 1 (January 2013): 240–50.

[75] Varela, Ioanna, Angeliki Karagiannidou, Vasilis Oikonomakis, Maria Tzetis, Marianna Tzanoudaki, Elena-Konstantina Siapati, George Vassilopoulos, Stelios Graphakos, Emmanuel Kanavakis, and Evgenios Goussetis. “Generation of Human β-Thalassemia Induced Pluripotent Cell Lines by Reprogramming of Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stromal Cells Using Modified MRNA.” *Cellular Reprogramming* 16, no. 6 (December 2014): 447–55.

[76] Sfougataki, Irene, Ioannis Grafakos, Ioanna Varela, Anastasios Mitrakos, Angeliki Karagiannidou, Marianna Tzannoudaki, Myrto Poulou, et al. “Reprogramming of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells to Human Induced Pluripotent Stem Cells from Pediatric Patients with Hematological Diseases Using a Commercial MRNA Kit.” *Blood Cells, Molecules & Diseases* 76 (2019): 32–39.

[77] Heng, Boon Chin, Karl Heinimann, Peter Miny, Giandomenica Iezzi, Katharina Glatz, Arnaud Scherberich, Henryk Zulewski, and Martin Fussenegger. “MRNA Transfection-Based, Feeder-Free, Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Adipose Tissue of a 50-Year-Old Patient.” *Metabolic Engineering* 18 (July 2013): 9–24.

[78] Warren, Luigi, Yuhui Ni, Jiwu Wang, and Xirong Guo. “Feeder-Free Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells with Messenger RNA.” *Scientific Reports* 2 (September 14, 2012): 657.

[79] González, Federico, Stéphanie Boué, and Juan Carlos Izpisúa Belmonte. “Methods for Making Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming à La Carte.” *Nature Reviews Genetics* 12, no. 4 (April 2011): 231–42.

[80] Ludwig, Tenneille E., Veit Bergendahl, Mark E. Levenstein, Junying Yu, Mitchell D. Probasco, and James A. Thomson. “Feeder-Independent Culture of Human Embryonic Stem Cells.” *Nature Methods* 3, no. 8 (August 2006): 637–46.

[81] Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, and N. Benvenisty. “Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Compromising the Three Embryonic Germ Layers.” *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 6, no. 2 (February 2000): 88–95.

[82] Hu, Bao-Yang, Jason P. Weick, Junying Yu, Li-Xiang Ma, Xiao-Qing Zhang, James A. Thomson, and Su-Chun Zhang. “Neural Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Follows Developmental Principles but with Variable Potency.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, no. 9 (March 2, 2010): 4335–40.

[83] Mayshar, Yoav, Uri Ben-David, Neta Lavon, Juan-Carlos Biancotti, Benjamin Yakir, Amander T. Clark, Kathrin Plath, William E. Lowry, and Nissim Benvenisty. "Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 7, no. 4 (October 8, 2010): 521–31.

[84] Taapken, Seth M., Benjamin S. Nisler, Michael A. Newton, Tori L. Sampsell-Barron, Kimberly A. Leonhard, Erik M. McIntire, and Karen D. Montgomery. "Karotypic Abnormalities in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 29, no. 4 (April 2011): 313–14.

[85] Laurent, Louise C., Igor Ulitsky, Ileana Slavin, Ha Tran, Andrew Schork, Robert Morey, Candace Lynch, et al. "Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ESCs and IPSCs during Reprogramming and Time in Culture." *Cell Stem Cell* 8, no. 1 (January 7, 2011): 106–18.

[86] Kang, Xiangjin, Qian Yu, Yuling Huang, Bing Song, Yaoyong Chen, Xingcheng Gao, Wenyin He, Xiaofang Sun, and Yong Fan. "Effects of Integrating and Non-Integrating Reprogramming Methods on Copy Number Variation and Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells." *PLoS ONE* 10, no. 7 (July 1, 2015).

[87] Karagiannis, Peter, Shinya Yamanaka, and Megumu K. Saito. "Application of Induced Pluripotent Stem Cells to Primary Immunodeficiency Diseases." *Experimental Hematology* 71 (2019): 43–50.

[88] Karagiannidou, Angeliki, Ioanna Varela, Krinio Giannikou, Maria Tzetis, Antonia Spyropoulos, George Paterakis, Eftichia Petrakou, Maria Theodosaki, Evgenios Goussetis, and Emmanuel Kanavakis. "Mesenchymal Derivatives of Genetically Unstable Human Embryonic Stem Cells Are Maintained Unstable but Undergo Senescence in Culture as Do Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Cellular Reprogramming* 16, no. 1 (February 2014): 1–8.

[89] Tzetis, Maria, Sofia Kitsiou-Tzeli, Helen Frysira, Athena Xaidara, and Emmanuel Kanavakis. "The Clinical Utility of Molecular Karyotyping Using High-Resolution Array-Comparative Genomic Hybridization." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 12, no. 5 (June 2012): 449–57.

[90] Okita, Keisuke, Tatsuya Yamakawa, Yasuko Matsumura, Yoshiko Sato, Naoki Amano, Akira Watanabe, Naoki Goshima, and Shinya Yamanaka. "An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31, no. 3 (March 2013): 458–66.

[91] Sivapatham, R., and X. Zeng. "Generation and Characterization of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell for Disease Modeling." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1353 (2016): 25–44.

[92] Mandal, Pankaj K., and Derrick J. Rossi. “Reprogramming Human Fibroblasts to Pluripotency Using Modified MRNA.” *Nature Protocols* 8, no. 3 (March 2013): 568–82.

[93] Poleganov, Marco Alexander, Sarah Eminli, Tim Beissert, Stephanie Herz, Jung-Il Moon, Johanna Goldmann, Arianne Beyer, et al. “Efficient Reprogramming of Human Fibroblasts and Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells Using Nonmodified RNA for Reprogramming and Immune Evasion.” *Human Gene Therapy* 26, no. 11 (November 2015): 751–66.

[94] Kogut, Igor, Sandra M. McCarthy, Maryna Pavlova, David P. Astling, Xiaomi Chen, Ana Jakimenko, Kenneth L. Jones, et al. “High-Efficiency RNA-Based Reprogramming of Human Primary Fibroblasts.” *Nature Communications* 9, no. 1 (21 2018): 745.

[95] Ou, Zhanhui, Xiaohua Niu, Wenyin He, Yuchang Chen, Bing Song, Yexing Xian, Di Fan, Daolin Tang, and Xiaofang Sun. “The Combination of CRISPR/Cas9 and IPSC Technologies in the Gene Therapy of Human β-Thalassemia in Mice.” *Scientific Reports* 6 (01 2016): 32463.

[96] Ma, Hong, Robert Morey, Ryan C. O’Neil, Yupeng He, Brittany Daughtry, Matthew D. Schultz, Manoj Hariharan, et al. “Abnormalities in Human Pluripotent Cells Due to Reprogramming Mechanisms.” *Nature* 511, no. 7508 (July 10, 2014): 177–83.

[97] Goussetis, E., I. Peristeri, V. Kitra, G. Vessalas, A. Paisiou, M. Theodosaki, E. Petrakou, M. N. Dimopoulou, and S. Graphakos. “HLA-Matched Sibling Stem Cell Transplantation in Children with β-Thalassemia with Anti-Thymocyte Globulin as Part of the Preparative Regimen: The Greek Experience.” *Bone Marrow Transplantation* 47, no. 8 (August 2012): 1061–66.

[98] Beers, Jeanette, Kaari L. Linask, Jane A. Chen, Lauren I. Siniscalchi, Yongshun Lin, Wei Zheng, Mahendra Rao, and Guokai Chen. “A Cost-Effective and Efficient Reprogramming Platform for Large-Scale Production of Integration-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells in Chemically Defined Culture.” *Scientific Reports* 5 (June 11, 2015): 11319.