



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Ιατρικής

Π.Μ.Σ Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική

Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική-Νοσοκομείο Αλεξάνδρα

**Μελέτη της ενεργότητας του ενισχυτή AR1 του καρδιακού δείκτη  
Nkx 2.5 σε βλαστικά κύτταρα μυός.**

Διπλωματική εργασία

**Τουρκοδημήτρη Μαγδαληνή-Ιωάννα**

Βιολόγος

## **ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΚΡΙΣΕΩΣ**

### **ΤΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**Της Μεταπτυχιακής Φοιτήτριας Τουρκοδημήτρη Μαγδαληνής-  
Ιωάννας**

#### **Εξεταστική Επιτροπή**

- Δρακάκης Πέτρος, Επιβλέπων
- Παπαναγιώτου Κωσταντίνος
- Μαυρογιάννη Δέσποινα

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή η οποία ορίσθηκε από την ΓΣΕΣ της Ιατρικής Σχολής του Παν. Αθηνών Συνεδρίαση της ...../...../..... για την αξιολόγηση και εξέταση της υποψηφίου Κας Τουρκοδημήτρη Μαγδαληνής-Ιωάννας, συνεδρίασε σήμερα .../.../....

Η Επιτροπή **διαπίστωσε** ότι η Διπλωματική Εργασία της Κας Τουρκοδημήτρη Μαγδαληνής-Ιωάννας με τίτλο «Μελέτη της ενεργότητας του ενισχυτή AR1 του καρδιακού δείκτη Nkx2.5 σε βλαστικά κύτταρα μυός» είναι πρωτότυπη, επιστημονικά και τεχνικά άρτια και η βιβλιογραφική πληροφορία ολοκληρωμένη και εμπεριστατωμένη.

Η εξεταστική επιτροπή αφού έλαβε υπ' όψιν το περιεχόμενο της εργασίας και τη συμβολή της στην επιστήμη, με ψήφους ..... προτείνει την απονομή στον παραπάνω Μεταπτυχιακό Φοιτητή την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Master's).

Στην ψηφοφορία για την βαθμολογία ο υποψήφιος έλαβε για τον βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» ψήφους ....., για τον βαθμό «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» ψήφους ....., και για τον βαθμό «ΚΑΛΩΣ» ψήφους ..... Κατά συνέπεια, απονέμεται ο βαθμός «.....».

Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

- Δρακάκης Πέτρος, Επιβλέπων (Υπογραφή) \_\_\_\_\_
- Μαυρογιάννη Δέσποινα, (Υπογραφή) \_\_\_\_\_
- Παπαναγιώτου Κωσταντίνος, (Υπογραφή) \_\_\_\_\_





ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Αθήνα,  
2020



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

*Επιβλέπων:* Παπαναγιώτου Κωστής

*Μέλος:* Δρακάκης Πέτρος

*Μέλος:* Μαυρογιάννη Δέσποινα

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική” του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πειραματικό σκέλος έλαβε χώρα στο εργαστήριο βασικής έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.IB.E.A.A) το διάστημα 2018-2020, υπό την καθοδήγηση του ερευνητή, κ. Παπαναγιώτου Κωστή.

Αρχικά οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα μου, ερευνητή Παπαναγιώτου Κωστή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα. Τον ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον, την εμπιστοσύνη και το χρόνο που μου αφιέρωσε. Καθ’ όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας ήταν διαθέσιμος και πρόθυμος να με βοηθήσει σε όποιο πρόβλημα μου παρουσιάστηκε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα-Μαρία Φούντα για τη καθοριστική και πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Οι συμβουλές και οι γνώσεις που μου προσέφερε θα με συνοδεύουν στην μετέπειτα πορεία μου.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κυρία Μαυρογιάννη Ντέπου και κύριο Δρακάκη Πέτρο, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, πολύτιμο στήριγμα μου σε ό,τι έχω προσπαθήσει. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και τη συμπαράσταση που μου έδειξε τα χρόνια των σπουδών μου, μα πρωτίστως την ευχαριστώ που με βοήθησε να γίνω σωστός άνθρωπος. Χωρίς αυτή δε θα είχα καταφέρει τίποτα.

«Η συγγραφέας βεβαιώνει ότι το περιεχόμενο του παρόντος έργου είναι αποτέλεσμα προσωπικής εργασίας και ότι έχει γίνει η κατάλληλη αναφορά στην εργασία τρίτων, όπου κάτι τέτοιο ήταν απαραίτητο, σύμφωνα με τους κανόνες της ακαδημαϊκής δεοντολογίας.»

στην αγαπημένη μου μητέρα,

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
Περίληψη.....	12
Σκοπός: .....	12
Υλικά και μέθοδοι: .....	12
Αποτελέσματα: .....	12
Συμπεράσματα: .....	13
Λέξεις-κλειδιά:.....	13
Αναγεννητική ιατρική.....	14
Μεταμοσχεύσεις οργάνων.....	14
Αναγεννητική Ιατρική.....	15
Βλαστικά κύτταρα .....	17
Βλαστικά κύτταρα και αναγεννητική ιατρική .....	17
Χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων .....	18
Τύποι βλαστικών κυττάρων .....	19
Κατασκευή οργάνων από βλαστοκύτταρα .....	20
Εμβρυολογία της καρδιάς.....	26
Καρδιά: δομή και λειτουργίες.....	26
Πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη .....	26
Γονιμοποίηση .....	26
Αυλάκωση.....	27
Γαστριδίωση-Οργανογένεση.....	28
Ανάπτυξη της καρδιάς.....	29
Ανάπτυξη ιστών μεσοδερμικής προέλευσης .....	29
Οργανογένεση της καρδιάς.....	30
Γονιδιακή ρύθμιση της καρδιογένεσης.....	32
Η οικογένεια ομοιοτικών γονιδίων NK .....	33
Ο ρόλος του γονιδίου Nκχ 2,5 .....	35
Έλεγχος της έκφρασης του Nκχ2-5.....	36
Κατασκευή αλλογενούς καρδιάς σε ποντίκι .....	39
Προτεινόμενη μεθοδολογία.....	40
Ο γενετικός τόπος Hipp11 (H11) .....	41
Κυτταρική σειρά δότη .....	41
Κυτταρική σειρά δέκτη.....	43

Σχηματισμός χιμαιρικών ζώων.....	44
Κατασκευή πλασμίδιων ελέγχου (control plasmids) .....	44
Πλασμίδιο ελέγχου Cf .....	45
Πλασμίδιο ελέγχου Ce.....	46
Πλασμίδιο ελέγχου CYCN.....	47
Πλασμίδιο ελέγχου CfYCN.....	48
Πλασμίδιο ελέγχου CYfCN.....	49
Πλασμίδιο ελέγχου CeYCN.....	50
Πλασμίδιο ελέγχου CYeCN.....	51
Σκοπός .....	52
Μέθοδοι & υλικά .....	53
I. Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας .....	53
II. Γενικό μέρος .....	54
Τεχνικές μοριακής βιολογίας .....	54
Μοριακή κλωνοποίηση .....	54
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) .....	55
Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα .....	57
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	58
Ένωση τμημάτων DNA (Ligation) .....	59
Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation) .....	60
Colony PCR.....	61
Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων .....	62
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	63
Μελέτη γονιδιακής έκφρασης .....	64
Απομόνωση RNA .....	64
DNase treatment.....	64
Καθαρισμός δειγμάτων με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) .	65
Σύνθεση cDNA .....	65
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-qPCR) ..	66
Αντίδραση Λουσιφεράσης .....	68
Καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων .....	69
Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.....	69
Σπάσιμο κυττάρων (cell splitting).....	70
Διαμόλυνση βλαστοκυττάρων (stem cells transfection) .....	71

Selection βλαστοκυπάρων με αντιβιοτικό .....	73
III. Ειδικό μέρος .....	74
Πλασμίδια Λουσιφεράσης .....	74
Πλασμίδιο pLHSE1bLuc .....	75
Πλασμίδιο pRHSE1bLuc .....	76
Πλασμίδιο pAR1E1bLuc .....	77
Πλασμίδιο pAR1fE1bLuc .....	77
Πλασμίδιο pIns1E1bLuc .....	78
Πλασμίδιο pIns2E1bLuc .....	79
Πλασμίδια ελέγχου .....	79
Πλασμίδιο CeYCN .....	79
Πλασμίδιο CfYCN .....	81
Πλασμίδιο CYCN .....	82
Πλασμίδιο CYeCN .....	83
Πλασμίδιο CYfCN .....	86
Αποτελέσματα .....	88
Δοκιμή λουσιφεράσης .....	88
Διαγνωστική πέψη πλασμιδίων ελέγχου .....	89
Real Time PCR .....	92
Συμπεράσματα-συζήτηση .....	93
Βιβλιογραφία .....	98

---

# Περίληψη

---

## Σκοπός:

Μεγάλη μερίδα της επιστημονικής κοινότητας, προσπαθώντας να λύσει το πρόβλημα της ανεπάρκειας οργάνων για μεταμοσχεύσεις, έχει καταφέρει να δημιουργήσει *in vivo* διάφορους ιστούς και όργανα, κάνοντας χρήση της τεχνικής της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης. Στα πλαίσια της προσπάθειας της ερευνητικής ομάδας του Κ. Παπαναγιώτου να σχηματίσει αλλογενή καρδιά σε ποντίκια, προτείνεται –αντί της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης– να χρησιμοποιηθούν δύο γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές εμβρυικών βλαστικών κυττάρων εκ των οποίων η μία θα συνεισφέρει σε καρδιακούς ιστούς και η άλλη σε μη καρδιακούς ιστούς στο αναπτυσσόμενο χιμαιρικό έμβρυο. Για να δημιουργηθούν οι δυο αυτές κυτταρικές σειρές, θα κατασκευαστεί εργαστηριακά από μια αλληλουχία DNA, η οποία θα εισαχθεί με τη μέθοδο CRISPR στο γενετικό τόπο *Hip11* του γονιδιώματος των mESC (αλληλουχία-δότη και αλληλουχία-δέκτη). Το *Nkx2.5* είναι ο πρώτος γνωστός δείκτης της καρδιακής γενεαλογίας, ενώ ο AR1 είναι το πρώτο ρυθμιστικό στοιχείο του γονιδίου *Nkx2.5* που ενεργοποιείται στο καρδιογενές μεσόδερμα την ημέρα E7.5. Και οι δύο αλληλουχίες που θα δημιουργηθούν θα εμπεριέχουν τον ενισχυτή του *Nkx2.5*, AR1. Είναι πολύ σημαντικό για την πειραματική διαδικασία να μην υπάρχει ενεργότητα του AR1 νωρίτερα από το φυσιολογικό δηλαδή την ημέρα E7.5, καθώς η πρόωρη έκφραση θα πυροδοτήσει μια σειρά ενεργειών που θα οδηγήσουν σε θάνατο τα κύτταρα που θα λάβουν την αλληλουχία-δέκτη. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η κατασκευή των πλασμιδίων ελέγχου, των πλασμιδίων δηλαδή τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η ενεργότητα του καρδιακού ενισχυτή AR1 του γονιδίου *Nkx2.5*.

## Υλικά και μέθοδοι:

Κατασκευάστηκαν σειρές πλασμιδίων με μεθόδους μοριακής κλωνοποίησης και η ορθότητα της αλληλουχίας τους ελέγχθηκε με διαγνωστικές πέψεις με το ένζυμο περιορισμού *PstI*. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για διαμόλυνση εμβρυικών βλαστοκυττάρων ποντικών (mESCs). Τα βλαστοκύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν για όσο ήταν απαραίτητο, συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης με χρήση των τεχνικών της Real-Time PCR και της δοκιμής Λουσιφεράσης. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν 6 πλασμίδια, κάθε ένα από τα οποία θα μας βοηθούσε να μελετήσουμε την ενεργότητα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου με τη μέθοδο της Λουσιφεράσης, και 5 πλασμίδια-ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η ενεργότητα του καρδιακού ενισχυτή AR1 του γονιδίου *Nkx2.5* με Real-Time PCR.

## Αποτελέσματα:

- 1) Βασισμένοι στη δοκιμή Λουσιφεράσης, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι αλληλουχίες με την μεγαλύτερη ενεργότητα είναι οι Insulator1 και AR1e.
- 2) Συγκρίνοντας τα αναμενόμενα αποτελέσματα που πήραμε από το λογισμικό AρΕ με αυτά που πήραμε από την ηλεκτροφόρηση των πέψεων των πλασμιδίων ελέγχου με το ένζυμο *PstI*, είδαμε ότι υπάρχει συμφωνία στο πρότυπο των μπαντών που προέκυψαν.

- 3) Η έκφραση του YFP ήταν υψηλότερη στο πλασμίδιο CeYCN το οποίο έφερε τον μερικό ενισχυτή πριν το γονίδιο YFP, ενώ την χαμηλότερη έκφραση παρατηρήσαμε στο πλασμίδιο CYfCN το οποίο έφερε ολόκληρο τον ενισχυτή μετά το γονίδιο YFP.

Συμπεράσματα:

Τόσο η θέση, όσο και η σύσταση του ενισχυτή AR1 επηρεάζουν την ενεργότητα του. Συγκεκριμένα, ολόκληρος ο ενισχυτής AR1 (AR1f) έχει χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τον μερικό ενισχυτή (AR1e), ενώ η ιδανικότερη θέση του είναι καθοδικά του γονιδίου YFP. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το πλασμίδιο CYfCN είναι το ιδανικότερο για χρήση στις αλληλουχίες δότη και δέκτη, καθώς τόσο η σύσταση όσο και η θέση του ενισχυτή AR1, πυροδοτούν ένα πολύ χαμηλό ποσοστό έκφρασης του YFP. Επιπροσθέτως, το συγκεκριμένο πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για την μελέτη της ενεργότητας και άλλων ενισχυτών.

Λέξεις-κλειδιά:

Αναγεννητική ιατρική, βλαστοκύτταρα, μεταμόσχευση οργάνων, συμπληρωματικότητα βλαστοκύττης, καρδιά, ενισχυτής AR1, γονίδιο *Nkx2.5*, CRISPR, γενετικός τόπος *Hip11*.

---

# Αναγεννητική Ιατρική

## Μεταμοσχεύσεις οργάνων

Η μεταμόσχευση οργάνου είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα όργανο ή ιστός αφαιρείται χειρουργικά από ένα άτομο(δότης) και τοποθετείται σε ένα άλλο άτομο (δέκτης). Η μεταμόσχευση είναι απαραίτητη επειδή το όργανο του δέκτη έχει λειτουργική ανεπάρκεια ή έχει υποστεί βλάβη από ασθένεια ή τραυματισμό. Οι δότες οργάνων μπορεί να είναι ζωντανοί, εγκεφαλικά νεκροί ή νεκροί μέσω κυκλοφορικού θανάτου (μη αναστρέψιμη λειτουργία καρδιάς ή πνευμόνων).

Η μεταμόσχευση οργάνου είναι συχνά η μόνη θεραπεία για ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από οργανική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Πριν από περίπου 60 χρόνια, με την πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνου (μεταμόσχευση νεφρού) που πραγματοποιήθηκε στη Βοστώνη από ομάδα με επικεφαλής τους Δρ. Joseph Murray, John Merrill και J. Hartwell Harrison, σηματοδοτήθηκε μια νέα, πολλά υποσχόμενη εποχή στην ιατρική επιστήμη<sup>1</sup>.

Παρόλα αυτά, στις μέρες μας, η μεγάλη ζήτηση μοσχευμάτων, σε συνδυασμό με την έλλειψη διαθεσιμότητας αυτών, θεωρείται μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να αναφέρει ότι μόνο το 10% της παγκόσμιας ανάγκης σε μοσχεύματα καλύπτεται<sup>2</sup>. Για παράδειγμα, μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ετησίως, γύρω στους 50.000 ασθενείς μπαίνουν σε λίστες αναμονής μοσχευμάτων, την ώρα που οι θάνατοι λόγω οργανικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, αγγίζουν τους 730.000<sup>3</sup>. Όσον αφορά στην Ευρώπη, τα στοιχεία δείχνουν ότι για το 2010, 91.798 ασθενείς είχαν ανάγκη μεταμόσχευσης νεφρού, ωστόσο διαθέσιμο μόσχευμα υπήρχε μόνο για 21.740 από αυτούς<sup>4</sup>.

Το πρόβλημα της διαθεσιμότητας οργάνων δεν περιορίζεται όμως μόνο εδώ. Για παράδειγμα, ενώ η Αφρική διαθέτει το 16% του παγκόσμιου πληθυσμού, πραγματοποιεί μόνο το 0,5% των παγκόσμιων μεταμοσχεύσεων.



Εικόνα 1 "The promise of organ and tissue preservation to transform medicine." Nature Biotechnology 35 (2017): 530-542.

1 (T. H.-2.-6. C Biben n.d.) Pedro M. Baptista, Anthony Atala, in Translating Regenerative Medicine to the Clinic, 2016

2 Jones B, Bes M. Keeping kidneys. Bull. World Health Organ. 2012

3 Israni AK et al., OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: deceased organ donation. Am. J. Transplant. 2014

4 [www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2010.pdf](http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2010.pdf)

Εξίσου ανησυχητικό επακόλουθο, είναι το φαινόμενο του μεταμοσχευτικού τουρισμού<sup>5</sup>. Στο Πακιστάν για παράδειγμα, πάνω από τα 2/3 των μεταμοσχεύσεων νεφρού το 2005, διενεργήθηκαν σε αλλοδαπού<sup>6</sup>. Εύκολα καταλαβαίνει κανείς τον κίνδυνο της εμπορευματοποίησης οργάνων και της εκμετάλλευσης των ευπαθών ομάδων. Για την διευθέτηση του επείγοντος και αναπτυσσόμενου προβλήματος του εμπορίου οργάνων, το Μάϊο του 2008, στην Κωνσταντινούπολη, πραγματοποιήθηκε μια συνάντηση με εκπροσώπους 157 χωρών ανά την υφήλιο, και υπεγράφη μια συμφωνία η οποία καταδικάζει το παράνομο εμπόριο οργάνων και θέτει το νομικό πλαίσιο, βάση του οποίου πρέπει να γίνονται οι δωρεές οργάνων και οι μεταμοσχεύσεις<sup>7</sup>.

Εκτός από το πρόβλημα της περιορισμένης διαθεσιμότητας οργάνων, ένα δεύτερο σημαντικό εμπόδιο όσον αφορά τις μεταμοσχεύσεις, είναι η ανοσολογική αντίδραση του δέκτη. Το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταμόσχευση. Οι σύνθετοι μηχανισμοί ανοσίας, οι οποίοι υπό κανονικές συνθήκες λειτουργούν για τον εντοπισμό ζένων μικροβίων και κατευθύνουν το ανοσοποιητικό σύστημα για να τα καταστρέψουν, αποτελούν σημαντικό εμπόδιο στην επιτυχή μεταμόσχευση. Η απόρριψη μιας μεταμόσχευσης συμβαίνει σε περιπτώσεις όπου το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει το μόσχευμα ως ξένο, προκαλώντας μια αντίδραση που τελικά θα το καταστρέψει<sup>8</sup>. Η ένταση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι του οργάνου ή του ιστού, εξαρτάται από τον τύπο μοσχεύματος και από τη γενετική απόσταση μεταξύ του δότη και του δέκτη. Για να μειωθεί η πιθανότητα απόρριψης, πριν τη μεταμόσχευση ο δότης και ο δέκτης εξετάζονται προσεκτικά για ανοσολογική συμβατότητα. Ωστόσο, ο περιορισμένος αριθμός επιλέξιμων δοτών κάνει το συγκεκριμένο εγχείρημα αρκετά δύσκολο, κάνοντας τις λίστες αναμονής για μόσχευμα εξαιρετικά μακροχρόνιες, ενώ, ταυτόχρονα, θα υπάρξει πάντα ένας βαθμός απόρριψης του μοσχεύματος. Η ανακάλυψη της κυκλοσπορίνης τη δεκαετία του 1980, ήρθε να δώσει μια λύση και έκτοτε οι εξελίξεις στον τομέα της ανοσοκαταστολής είναι ραγδαίες. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς πρέπει να παίρνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία εφόρου ζωής ώστε να εμποδίζεται η ανοσολογική απόκριση ενάντια στο μόσχευμα. Επακόλουθα αυτής της θεραπείας είναι ο αυξημένος κίνδυνος σοβαρών λοιμώξεων, διαβήτη, ακόμη και καρκίνου.

## Αναγεννητική Ιατρική

Τα ζητήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για νέες εξελίξεις στη μοριακή και κυτταρική βιολογία που άνοιξαν δρόμους σε αρκετές περιοχές της αναγεννητικής ιατρικής. Η αναγεννητική ιατρική, είναι ένας διεπιστημονικός κλάδος με έρευνα και κλινικές εφαρμογές που επικεντρώνονται στην επισκευή, την αντικατάσταση ή αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων με σκοπό την αποκατάσταση της μειωμένης

5 Shimazono Y. The state of the international organ trade: a provisional picture based on integration of available information. Bull World Health Organ. 2007;85(12):955–962. doi:10.2471/blt.06.039370

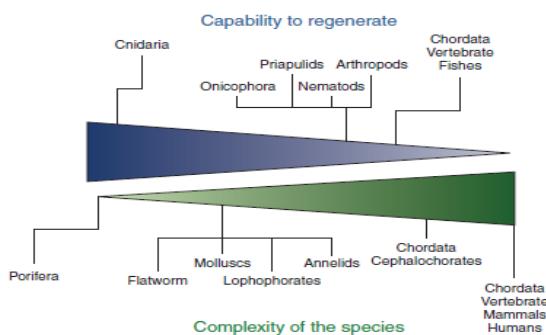
6 Anonymous. Second Global Consultation in Human Transplantation: Towards a Common Attitude to Transplantation. World Health Organization, 2007

7 International Summit on Transplant Tourism and Organ Trafficking. The Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3(5):1227–1231. doi:10.2215/CJN.03320708

8 Saidi RF, Hejazi Kenari SK. Clinical transplantation and tolerance: are we there yet? Int J Organ Transplant Med 2014;5(4):137–45

λειτουργίας τους που οφείλεται σε οποιαδήποτε αιτία (συγγενείς ανωμαλίες, ασθένειες, τραύματα και γήρανση).

Η αναγέννηση τμημάτων του σώματος είναι ένα σύνηθες φαινόμενο στη φύση. Για παράδειγμα, οι σαλαμάνδρες έχουν την ικανότητα να αναγεννούν ένα ακρωτηριασμένο άκρο μέσα σε μερικές ημέρες<sup>9</sup>. Το 1973, ο Ρώσος εμβρυολόγος P.P Ivanov, πρώτος διατύπωσε την άποψη ότι οι πιο απλά οργανωμένοι οργανισμοί, έχουν την ικανότητα να αναγεννούν μεγαλύτερα τμήματα του σώματος τους, σε σχέση με τους πιο πολύπλοκους, όπως τα θηλαστικά<sup>10</sup>.



**Figure 2.** The ability to regenerate inversely proportional to the degree of complexity of a species. Phylum Chordata are on the extreme segment of the spectrum, yet some vertebrate species like zebrafish have maintained the capacity to fully regenerate organs after amputation and so represent a formidable experimental model for organ bioengineering and regeneration investigations. Humans are instead at the very end of the spectrum.

Εικόνα 2:Giuseppe Orlando et al., Will Regenerative Medicine Replace Transplantation? Cold Spring Harb Perspect Med 2013

Αναγεννητική ικανότητα φαίνεται να υπάρχει και στους ανθρώπους, αν και χάνεται με την πάροδο των ετών. Για παράδειγμα, ένα τραυματισμένο δάκτυλο μπορεί να αναγεννηθεί μέχρι την ηλικία των 11 χρόνων<sup>11</sup>. Η δυνατότητα μάλιστα των ανθρώπων να αναγεννούν τμήματα του σώματος τους, φαίνεται να είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια. Ο Ήσιοδος, στο έργο του Θεογονία τον 8<sup>ο</sup> π.Χ. αιώνα, με τον μύθο του Προμηθέα, παρουσιάζει μια εικόνα αναγεννητικής ικανότητας<sup>12</sup>. Όταν ο Προμηθέας έκλεψε τη φωτιά από τους Θεούς για να τη δωρίσει στους ανθρώπους, ο Δίας, για να τον τιμωρήσει, τον αλυσόδεσε στον Καύκασο. Εκεί, ένας αετός, κάθε μέρα έτρωγε το ήπαρ του, το οποίο αναγεννιόταν κάθε βράδυ. Το μαρτύριο του διήρκησε 30000 χρόνια, έως ότου τον απελευθερώσει ο Ήρακλής<sup>13</sup>. Οι αρχαίοι Έλληνες, γνωρίζοντας την ικανότητα αναγέννησης του συκωτιού, το ονόμασαν ήπαρ, από το ρήμα ηπάομαι που σημαίνει διορθώνω/επισκευάζω.

Η Αναγεννητική Ιατρική είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις τρέχουσες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην έρευνα για την αναζωογόνηση ή και την

9 Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E. et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60–65 (2009) doi:10.1038/nature08152

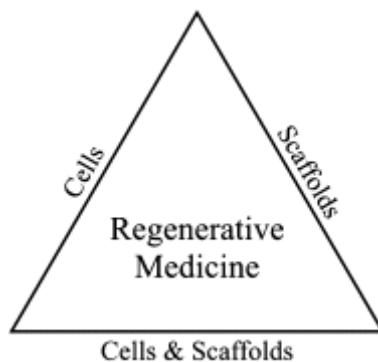
10 Orlando G, Soker S, Stratta RJ, Atala A. Will regenerative medicine replace transplantation? *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(8): a015693. Published 2013 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect. a015693

11 Illingworth CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. 1974, *Journal of Pediatric Surgery*, Volume 9, Issue 6, 853 - 858

12 Aeschylus. Prometheus bound. Athens: Patakis; 415 B.C.

13 Rosenthal N. Prometheus 's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 2003; 349:267-274 DOI: 10.1056/NEJMra020849

αντικατάσταση νεκρών ή κατεστραμμένων ιστών. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην έρευνα της Αναγεννητικής Ιατρικής όπως για παράδειγμα βιοϋλικά, ικριώματα, φαρμακευτική θεραπεία και πολλά άλλα (εικ.3). Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας της Αναγεννητικής Ιατρικής περιστρέφεται γύρω από τη χρήση των βλαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των εμβρυικών, των ενηλίκων και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) και είναι αυτό στο οποίο θα επικεντρωθούμε και θα αναλύσουμε στη συνέχεια.



Εικόνα 3:Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη αναγεννητική ιατρική.

Gianluca Sampogna, Salman Yousuf Guraya, Antonello Forgione, Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine, Journal of Microscopy and Ultrastructure, Volume 3, Issue 3, 2015

## Βλαστικά κύτταρα

### Βλαστικά κύτταρα και αναγεννητική ιατρική

Τα βλαστικά κύτταρα είναι αρχέγονα κύτταρα τα οποία αποτελούν προγονικές μορφές όλων των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην έρευνα γύρω από την Αναγεννητική Ιατρική και πληθώρα πιθανών εφαρμογών. Πρώτον, λόγω του ρόλου τους στην ανάπτυξη και της δυνατότητάς τους να αναπτυχθούν σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, τα βλαστοκύτταρα είναι ζωτικής σημασίας για τον τομέα της αναπτυξιακής βιολογίας. Οι αναπτυξιακοί βιολόγοι επιδιώκουν να αποκαλύψουν τα γονίδια και τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των κυττάρων και πώς μπορούν με κατάλληλους χειρισμούς να προγραμματίσουν αυτά τα κύτταρα για να δημιουργήσουν νέους υγιείς ιστούς. Δεύτερον, τα βλαστοκύτταρα μπορούν να εφαρμοστούν σε δοκιμές και ανάπτυξη φαρμάκων. Τα νέα φάρμακα που αναπτύσσονται θα μπορούσαν να δοκιμαστούν με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα χρησιμοποιώντας διαφοροποιημένα βλαστοκύτταρα. Αυτή η μέθοδος είναι ήδη σε εξέλιξη στον κόσμο της θεραπείας του καρκίνου. Τέλος, οι θεραπείες που στηρίζονται στη χρήση βλαστοκυττάρων μπορεί μία ημέρα να είναι σε θέση να αντικαταστήσουν τη δωρεά οργάνων και να εξαλείψουν τα προβλήματα που την συνοδεύουν, όπως η απόρριψη και η ανεπάρκεια των ιστών. Παρόλο που εξακολουθούν να υπάρχουν πολλές δυσκολίες γύρω από το πεδίο της έρευνας και της θεραπείας με τη χρήση βλαστικών κυττάρων, τις επόμενες δεκαετίες οι επιστήμονες ελπίζουν ότι θα συνεχίσουν να κάνουν ανακαλύψεις που θα επιτρέψουν να γίνουν πραγματικότητα οι δυνατότητες της κυτταροθεραπείας.

### Χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων

Για να θεωρείται ένα κύτταρο βλαστικό, θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις. Πρώτον, να έχει την ικανότητα της απεριόριστης αυτό-ανανέωσης, παράγοντας έτσι ένα ακριβές αντίγραφο του εαυτού του, και δεύτερον να μπορεί να διαφοροποιηθεί προς οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο<sup>14</sup>. Η ρύθμιση της διαφοροποίησης απαιτεί ένα σύνθετο ενδογενές ρυθμιστικό δίκτυο, μέσω γονιδίων, αλλά και εξωτερική σηματοδότηση μέσω ουσιών που εκκρίνονται από άλλα κύτταρα, από την φυσική επαφή με γειτονικά κύτταρα και από μόρια του μικροπεριβάλλοντος, και είναι ένας κλάδος με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι αλληλεπιδράσεις αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών, προκαλούν την απόκτηση επιγενετικών δεικτών πάνω στο κυτταρικό DNA, που περιορίζουν την κυτταρική του έκφραση<sup>15</sup>. Κατά την οργανογένεση των θηλαστικών, από το γονιμοποιημένο ωάριο, δημιουργείται ένας σύνθετος οργανισμός με 200 διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Αυτό το αναπτυξιακό δυναμικό προέρχεται από την ικανότητα των πρώιμων εμβρυϊκών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε όλες τις κυτταρικές σειρές<sup>16</sup>.

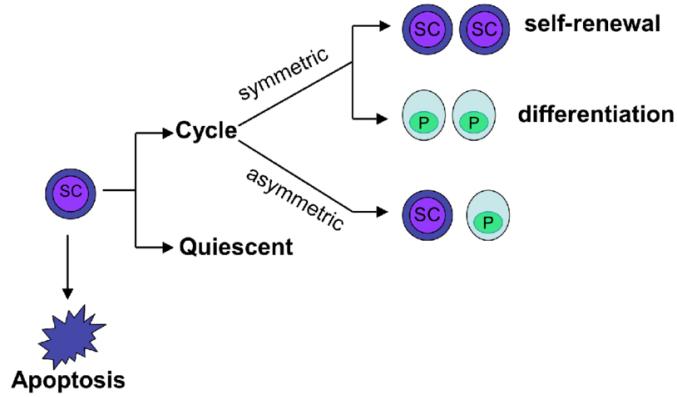
Με βάση αυτά τα δύο κύρια χαρακτηριστικά των βλαστοκυττάρων, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ένα βλαστικό κύτταρο έχει τέσσερις πιθανές “μοίρες” (εικ.4). Πρώτον, να παραμείνει αδρανές, δηλαδή αδιαίρετο και αδιαφοροποίητο, έως ότου έρθει το κατάλληλο ερέθισμα. Μια δεύτερη πιθανότητα είναι να διαιρεθεί συμμετρικά, δημιουργώντας έτσι δυο κύτταρα ακριβώς ίδια με το αρχικό. Σε αυτή την περίπτωση, δεν έχουμε διαφοροποιημένους απογόνους, απλά αύξηση του αριθμού των αδιαφοροποίητων βλαστοκυττάρων, τα οποία μπορεί να εξειδικευτούν σε επόμενες διαιρέσεις. Η τρίτη μοίρα, η ασύμμετρη αυτοανανέωση, συμβαίνει όταν από ένα βλαστικό κύτταρο προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα, το ένα αντίγραφο του γονέα, το άλλο ένα πιο εξειδικευμένο κύτταρο, που ονομάζεται σωματικό ή προγονικό κύτταρο. Η ασύμμετρη αυτοανανέωση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφοροποιημένων απογόνων απαραίτητων για την ανάπτυξη των ιστών του σώματος, διατηρώντας ταυτόχρονα την αποθήκη των βλαστικών κυττάρων για το μέλλον. Η τέταρτη μοίρα, είναι αυτή στην οποία ένα βλαστικό κύτταρο διαιρείται για να παράγει δυο διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα, διαφορετικά από το μητρικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο αριθμό των διαφοροποιημένων απογόνων, αλλά καθαρή απώλεια στην αποθήκη των βλαστικών κυττάρων<sup>17</sup>.

14 National Institutes of Health resource for stem cell research, 2008

15 Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009, 10:526–537

16 Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev. 2005; 85:635–678

17 Jesse K. Biehl, Brenda Russell. J Cardiovasc Nurs. 2009; 24(2): 98–105.



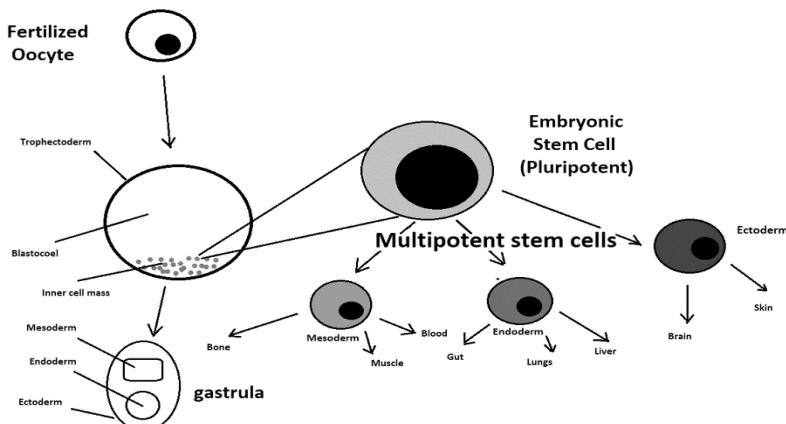
Εικόνα 4: Oakley, Erin. (2019). GENETIC REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL AGING.

### Τύποι βλαστικών κυττάρων

Ανάλογα με το δυναμικό διαφοροποίησης τους, τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

#### 1. Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Τα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα, είναι αυτά τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όλων των ιστών<sup>18</sup> (εικ.5). Εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας, είναι τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs) και τα επαγόμενα βλαστικά κύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs). Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, είναι η κύρια κατηγορία βλαστοκυττάρων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα σήμερα. Τα κύτταρα αυτά, απομονώνονται από την έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύτης και μπορούν να καλλιεργηθούν για πολλές γενιές σε ένα στρώμα κυττάρων feeders, διατηρώντας την ολοδυναμία τους.



Εικόνα 5: Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. et al. Stem Cell Res Ther (2019) 10: 68.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

<sup>18</sup> Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell. 2008;132(4):567–582. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015

Τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα, είναι σχετικά πρόσφατο επιστημονικό επίτευγμα, και δημιουργήθηκαν ανεξάρτητα από δυο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Πρόκειται στην ουσία για ενήλικα διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία “επέστρεψαν” πίσω στην ολοδύναμη κατάσταση τους με τους κατάλληλους μοριακούς χειρισμούς, και έχουν πλέον χαρακτηριστικά εμβρυικών βλαστοκυττάρων. Και οι δυο ομάδες, με τη χρήση ρετροιών, εισήγαγαν στα ενήλικα κύτταρα μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι καθιδήγησαν την έκφραση άλλων γονιδίων τα οποία επαναπρογραμμάτισαν τον πυρήνα των κυττάρων ώστε να επιστρέψει στην εμβρυική του κατάσταση. Και τα δυο ερευνητικά γκρουπ, χρησιμοποίησαν τους μεταγραφικούς παράγοντες Sox2 και Oct4. Η μεν ομάδα των Takahashi και Yamanaka, χρησιμοποίησε επίσης τους Klf4 και c-Myc<sup>19</sup>, ενώ η ομάδα του Yu, τους Lin28 and Nanog<sup>20</sup>.

## 2. Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, είναι κύτταρα ικανά να δώσουν μια πληθώρα κυτταρικών τύπων μιας συγκεκριμένης όμως κυτταρικής γενεαλογίας (ενδόδερμα, μεσόδερμα ή εξώδερμα). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια<sup>21</sup>. Τα γνωστότερα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι αυτά που βρίσκονται στον μυελό των οστών, και από το 1960, έχει ξεκινήσει η θεραπευτική τους χρήση για την αντιμετώπιση της λευχαιμίας, του μυελώματος και του λεμφώματος<sup>22</sup>.

## 3. Μονοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι συνήθως είτε πολυδύναμα, ή μονοδύναμα<sup>23</sup>. Τα μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα, είναι τα βλαστικά κύτταρα με τις λιγότερες δυνατότητες διαφοροποίησης και έχουν τη ικανότητα να δώσουν μόνο έναν εξιδεικευμένο κυτταρικό τύπο. Αν και η ικανότητα διαφοροποίησης είναι περιορισμένη, τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας των ιστών, αναπληρώνοντας γερασμένα ή κατεστραμμένα κύτταρα.

## Κατασκευή οργάνων από βλαστοκύτταρα

Η χρήση των ολοδύναμων (ESCs) και των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) στην αναγεννητική ιατρική είναι πολλά υποσχόμενη και έρχεται να δώσει λύση σε

19 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4):663–76

20 Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858):1917–20

21 Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169:338–346

22 Good RA, Meuwissen HJ, Hong R, Gatti RA. Bone marrow transplantation: correction of immune deficit in lymphopenic immunologic deficiency and correction of an immunologically induced pancytopenia. *Trans Assoc AM Physicians*. 1969; 82:278–85

23 Wagers AJ, Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639–648

πολλά από τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για παράδειγμα, τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα αποτελούν μια απεριόριστη πηγή κυττάρων τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο. Επιπροσθέτως, μπορούν να αποτελέσουν πηγή αυτόλογων κυττάρων, ξεπερνώντας έτσι το εμπόδιο της ασυμβατότητας και της απόρριψης του μοσχεύματος από το ανοσολογικό σύστημα του δέκτη. Χάρη σε αυτές τις ιδιότητές τους, έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα για σοβαρές ασθένειες, όπως διαβήτη, Πάρκινσον, τραυματισμό ήπατος<sup>24 25 26 27</sup>.

Η οργανογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, κατά την οποία απαιτούνται αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα διαφόρων ιστών οι οποίες θα δώσουν τα κατάλληλα σήματα όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι, η ανάπτυξη ενός οργάνου *in vitro* είναι πολύ δύσκολη εξαιτίας της περίπλοκης τρισδιάστατης δομής του. Γίνεται λοιπόν σαφές, ότι ένα *in vivo* σύστημα, όπως το αναπτυσσόμενο έμβρυο, είναι το καταλληλότερο για να λάβει χώρα ο σχηματισμός ενός οργάνου. Η κατασκευή συμπαγών οργάνων από βλαστοκύτταρα σε αναπτυσσόμενα έμβρυα, είναι δυνατή μέσω μιας τεχνικής που καλείται συμπληρωματικότητα βλαστοκύστης (blastocyst complementation). Η εν λόγω τεχνική περιλαμβάνει την έγχυση εμβρυικών βλαστοκυττάρων (ESCs) σε βλαστοκύστες στις οποίες έχει γίνει αποσιώπηση της έκφρασης ενός γονιδίου υπεύθυνου για τη δημιουργία ενός οργάνου-στόχου. Έτσι, δημιουργείται ο κατάλληλος χώρος (μια αναπτυξιακή φωλεά) στον οποίο μπορούν να ενσωματωθούν τα βλαστοκύτταρα και να σχηματίσουν το όργανο το οποίο λείπει<sup>28 29 30 31</sup>. Προκύπτει έτσι ένα χιμαιρικό ζώο, με το όργανο-στόχο κατασκευασμένο εξ ολοκλήρου από τα εγχυμένα βλαστοκύτταρα (εικ.6).

---

24 Vegas AJ, Veiseh O, Gürler M, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 2016;22(3):306–11.

25 . Tolosa L, Caron J, Hannoun Z, et al. Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(1):246

26 Bellamy V, Vanneaux V, Bel A, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* 2015;34(9):1198–207

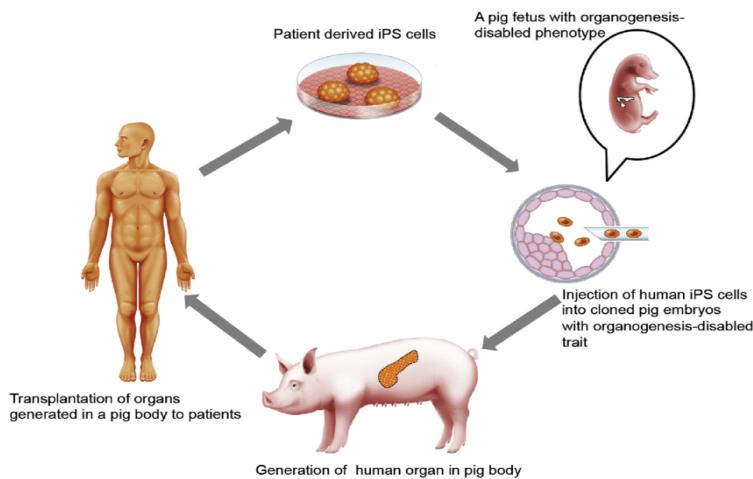
27 Kriks S, J-W Shim, J Piao, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011; 480(7378):547–51

28 Kobayashi et al., Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*. 2010 Sep 3;142(5):787-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.039.

29 Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenous pancreas *in vivo* in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(12):4557–4562. doi:10.1073/pnas.1222902110

30 Usui, Jo-ichi et al., Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *The American Journal of Pathology* 2012, Volume 180, Issue 6, 2417 – 2426.

31 Yamaguchi, T., Sato, H., Kato-Itoh, M. et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542, 191–196 (2017) doi:10.1038/nature21070



Εικόνα 6: Nagashima, Hiroshi & Matsunari, Hitomi. (2016). Growing human organs in pigs – a dream or reality? Theriogenology. 86. 10.1016/j.theriogenology.2016.04.056.

Το 1993 ήρθε η πρώτη απόδειξη ότι το συγκεκριμένο σύστημα μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά. Εμβρυικά βλαστοκύτταρα ποντικού (mESCs), εγχυθήκαν σε βλαστοκύστες γενετικά τροποποιημένες ώστε να αναπτυχθούν σε ποντίκια ανίκανα να παράγουν Τ και Β λεμφοκύτταρα ( $Rag2^{-/-}$  ποντίκια). Οι βλαστοκύστες αυτές, παρείχαν στα βλαστοκύτταρα μια “αναπτυξιακή φωλεά”, την οποία τα βλαστοκύτταρα κατέλαβαν και έτσι αναπτύχθηκαν επιτυχώς σε λεμφοκύτταρα. Τόσο τα Τ όσο και τα Β λεμφοκύτταρα, προέρχονταν αποκλειστικά από τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα του δότη<sup>32</sup>.

Με την πάροδο των ετών, η τεχνική εφαρμόστηκε και για τη δημιουργία τρισδιάστατων οργάνων. Έτσι, το 2010, μια ερευνητική ομάδα έκανε έγχυση ESCs και iPSCs από ποντίκια άγριου τύπου, σε βλαστοκύστες ποντικών knockout για το γονίδιο  $Pdx1$  ( $Pdx1^{-/-}$ ), έναν σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για την ανάπτυξη του παγκρέατος<sup>33</sup>. Οι άδειες αναπτυξιακές φωλεές που δημιουργήθηκαν λόγω της απουσίας του  $Pdx1$ , εποικίστηκαν από τα βλαστοκύτταρα που εγχύθηκαν και έτσι παράχθηκαν λειτουργικά παγρέατα, σώζοντας τα χιμαιρικά ζώα που προέκυψαν από το θάνατο. Οι παγκρεατικοί ιστοί που προέκυψαν, προέρχονταν σχεδόν αποκλειστικά από τα ESCs ή τα iPSCs. Η ερευνητές όμως δεν έμειναν μόνο εκεί. Προχώρησαν ένα βήμα παραπέρα, κάνοντας αυτή τη φορά έγχυση ESCs και iPSCs αρουραίων, στις βλαστοκύστες των  $Pdx1^{-/-}$  ποντικών. Τα ποντίκια που προέκυψαν διέθεταν λειτουργικά παγρέατα τα οποία προέρχονταν σχεδόν αποκλειστικά από τα κύτταρα των αρουραίων. Τα πειράματα αυτά ήταν μια πρώτη απόδειξη του ότι iPSCs δότη μπορούν να δώσουν λειτουργικά όργανα αν αναπτυχθούν σε ξενογενές περιβάλλον. Μερικά χρόνια αργότερα, η ίδια ομάδα κατάφερε να αποδείξει ότι η αρχή της συμπληρωματικότητας βλαστοκύστης μπορεί να εφαρμοστεί και σε μεγαλύτερα ζώα, δημιουργώντας αλλογενή

<sup>32</sup> Chen, J, R Lansford, V Stewart, F Young, and fw Alt. (1993). RAG-2- deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4528–4532.

<sup>33</sup> Kobayashi T, T Yamaguchi, S Hamanaka, M Kato-Itoh, Y Yamazaki, M Ibata, H Sato, YS Lee, J Usui, et al. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. Cell 142:787–799.

παγρέατα σε χοιρους χωρίς πάγκρεας<sup>34</sup>. Η μελέτη αυτή είναι ιδιαιτέρως σημαντική καθώς ανοίγει το δρόμο για την κατασκευή ανθρώπινων οργάνων σε μεγάλα θηλαστικά.

Παρόλο που οι ανωτέρω έρευνες είναι ένα μεγάλο βήμα προς τη δημιουργία ανθρώπινων οργάνων σε μεγάλα ζώα, αρκετά ζητήματα απαιτούν λύση. Αρχικά, τα βλαστοκύτταρα τα οποία εγχέονται στις βλαστοκύττες, μπορούν να αποικίσουν και άλλους ιστούς εκτός από το όργανο-στόχο, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Έτσι εγείρονται σοβαρά βιοηθικά ζητήματα όσον αφορά τη δημιουργία χιμαιρικών ζώων με τη χρήση ανθρώπινων PSCs. Για παράδειγμα, εάν αρκετά ανθρώπινα κύτταρα καταλήξουν στον εγκέφαλο του ζώου-δέκτη, τα χιμαιρικά ζώα που θα προκύψουν μπορεί να έχουν κάποιου βαθμού ανθρώπινη νοημοσύνη. Εξίσου σοβαρός είναι ο κίνδυνος να προκύψουν χιμαιρικά ζώα τα οποία θα παράγουν ανθρώπινα γαμετικά κύτταρα. Συνεπώς, θα ήταν χρήσιμο, να μπορεί να καθοδηγηθεί η διαφοροποίηση των ανθρώπινων PSCs μόνο προς ένα συγκεκριμένο όργανο-στόχο. Μια πιθανή λύση σε αυτό το πρόβλημα θα ήταν ο γενετικός χειρισμός των hPSCs ώστε να πεθαίνουν όταν πάνε να διαφοροποιηθούν σε κάποιο διαφορετικό ιστό, με τη χρήση κάποιου αποπτωτικού γονιδίου υπό τον έλεγχο ενός ιστο-ειδικού υποκινητή. Μια άλλη πιθανή λύση είναι η χρήση προγονικών κυττάρων “προσανατολισμένων” προς συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Πάνω σε αυτό, μια ομάδα έδειξε ότι mESCs προγραμματισμένα να εκφράζουν Mixl1, έναν μεταγραφικό παράγοντα υπεύθυνο για την ανάπτυξη του ενδοδέρματος, όταν τοποθετήθηκαν σε βλαστοκύττες ποντικών που δεν είχαν πάγκρεας, διαφοροποιήθηκαν μόνο σε ιστούς ενδοδερμικής προέλευσης, και δεν αποίκισαν το υπόλοιπο σώμα του εμβρύου<sup>35</sup>.

Ένα άλλο πρόβλημα, προκύπτει από το γεγονός ότι στους οργανισμούς που λειτουργούν ως δέκτες, έχει δημιουργηθεί μια μετάλλαξη (έλλειψη ενός γονιδίου υπεύθυνου για την ανάπτυξη συγκεκριμένου οργάνου), η οποία πιθανώς επηρεάζει και άλλες πτυχές της φυσιολογίας τους. Μια ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε την τεχνική της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύτης, για να αναπτύξει νεφρούς, σε ποντίκια knockout για το γονίδιο Sall1, απαραίτητο για την νεφρογένεση. Τα χιμαιρικά ποντίκια που προέκυψαν, είχαν φυσιολογικούς μορφολογικά νεφρούς, σχεδόν αποκλειστικά φτιαγμένους από τα ESCs ή τα iPSCs που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά πέθαιναν σύντομα μετά τη γέννηση. Οι ερευνητές, αφού παρατήρησαν απουσία γάλακτος στο στομάχι των νεαρών ποντικών μετά το θάνατό τους, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πιθανώς τα νεογέννητα ποντίκια δεν είχαν την ικανότητα να τραφούν σωστά. Καθώς το Sall1 εκφράζεται και στον εγκέφαλο, η έλλειψη του ίσως επηρέασε το νευρικό μονοπάτι το οποίο είναι υπεύθυνο για τον θηλασμό. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι η συγκεκριμένη ομάδα, ενώ κατόρθωσε να δημιουργήσει πάγκρεας αρουραίου σε Pdx<sup>-/-</sup> ποντίκια, δεν κατάφερε να δημιουργήσει νεφρούς αρουραίου σε Sall1<sup>-/-</sup> ποντίκια<sup>36</sup>. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσπάθεια της ομάδας του Izpisua Belmonte

<sup>34</sup> Matsunari H, H Nagashima, M Watanabe, K Umeyama, K Nakano, M Nagaya, T Kobayashi, T Yamaguchi, R Sumazaki, LA Herzenberg and H Nakauchi. (2013). Blastocyst complementation generates exogenous pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. Proc Natl Acad Sci USA 110:4557–4562.

<sup>35</sup> Kobayashi T, M Kato-Itoh, and H Nakauchi. (2014). Targeted Organ Generation Using Mixl1 Inducible Mouse Pluripotent Stem Cells in Blastocyst Complementation. Stem Cells and Development 24:182-189.

<sup>36</sup> Usui J, T Kobayashi, T Yamaguchi, AS Knisely, R Nishinakamura and H Nakauchi. (2012). Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. Am J Pathol 180:2417–2426.

να δημιουργήσει καρδιά σε *Nkx2.5*<sup>-/-</sup> ποντίκια εγχέοντας PSCs αρουραίων με τη μέθοδο της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης. Όπως είναι ήδη γνωστό<sup>37</sup>, η αποσιώπηση του σημαντικού καρδιακού δείκτη *Nkx2.5*, δεν οδηγεί σε πλήρη απουσία καρδίας, αλλά έχει ώς αποτέλεσμα έναν καρδιακό ιστό μη κανονικής μορφολογίας στα knock out ζώα. Κατ' επέκταση, η έγχυση των PSCs αρουραίων αν και έσωσε την μορφολογία του καρδιακού ιστού στα χιμαιρικά ζώα, δεν οδήγησε στο σχηματισμό του οργάνου αποκλειστικά από τα κύτταρα δότες. Επιπροσθέτως, οι ερευνητές δεν κατάφεραν να πάρουν ζωντανά χιμαιρικά ζώα<sup>38</sup>. Γίνεται λοιπόν κατανοητό, ότι η ανάπτυξη καρδιάς με τη συμπληρωματικότητα της βλαστοκύστης είναι μάλλον αδύνατη, καθώς η αποσιώπηση ενός και μόνο γονιδίου, δεν οδηγεί σε πλήρη έλλειψη του οργάνου.

Ένα τρίτο πρόβλημα, είναι το γεγονός ότι τα περισσότερα ανθρώπινα ESCs ή PSCs έχουν εξαιρετικά χαμηλή ικανότητα χιμαιρισμού. Αυτό διότι θεωρούνται PSCs από το στάδιο της επιβλάστης, ένα αναπτυξιακά πιο προηγμένο στάδιο, σε σχέση με αντίστοιχα κύτταρα των τρωκτικών<sup>39</sup>. Ωστόσο, μετέπειτα έρευνες παρουσίασαν δεδομένα σχετικά με μια πιο μακρόχρονη διατήρηση των ανθρώπινων PSCs σε “ανώριμο” επίπεδο, γεγονός το οποίο κάνει την κατασκευή αυτόλογων οργάνων από PSCs του ασθενή, να φαντάζει δυνατή<sup>40 41 42</sup>. Τέλος, δεν πρέπει να ξεχνάμε, ότι καθώς ο άνθρωπος και ο χοίρος, είναι εξελικτικά πολύ πιο μακριά σε σχέση με το ποντίκι και τον αρουραίο, η τεχνική της συμπληρωματικότητας βλαστοκύστης για την κατασκευή ανθρώπινων οργάνων είναι μια μεγάλη πρόκληση, και απαιτείται αρκετή ακόμη έρευνα και προσπάθεια. Έως σήμερα, όλες οι μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η έγχυση hPSCs σε βλαστοκύστες ποντικών, είναι αδύνατον να οδηγήσει σε χιμαιρα ανθρώπου-ποντικού<sup>43</sup>, πιθανότατα λόγω σημαντικών διαφορών στην εμβρυογένεση των δυο ειδών. Το 2017, δημοσιεύτηκε έρευνα στην οποία χρησιμοποιήθηκαν χοίροι και βοοειδή ως οργανισμοί-δέκτες στους οποίους εγχύθηκαν hPSCs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανώριμα και ενδιάμεσου σταδίου, αλλά όχι ωριμα hiPSCs, μπορούν να ενσωματωθούν στην προεμφυτευτική έσω κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass-ICM) των οργανισμών δεκτών<sup>44</sup>. Μετά την εμβρυομεταφορά, καταγράφηκαν χαμηλά ποσοστά χιμαιρισμού σε όλα τα είδη hiPSCs που χρησιμοποιήθηκαν. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα hiPSCs φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά τη φυσιολογική ανάπτυξη των

<sup>37</sup> I Lyons, L M Parsons, L Hartley, R Li, J E Andrews, L Robb, and R P Harvey, Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5, *Genes Dev.* July 1, 1995 9: 1654-1666; doi:10.1101/gad.9.13.1654

<sup>38</sup> Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell*.

2017;168(3):473–486.e15. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.036

<sup>39</sup> Nichols J and A Smith. (2009). Naïve and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4:487-492.

<sup>40</sup> Gafni O, L Weinberger, AA Mansour, YS Manor, E Chomsky, D Ben-Yosef, Y Kalma, S Viukov, I Maza, et al. (2013).

Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells. *Nature* 504:282-286.

<sup>41</sup> Chan YS, J Goke, JH Ng, X Lu, KA Gonzales, CP Tan, WQ Tng, ZZ Hong, YS Lim, HH Ng. (2013). Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* 13:663-675.

<sup>42</sup> Theunissen TW, BE Powell, H Wang, M Mitalipova, DA Faddah, J Reddy, ZP Fan, D Maetzel, K Ganz, et al. (2014).

Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naïve human pluripotency. *Cell Stem Cell* [Epub ahead of print]; DOI: 10.1016/j.stem.2014.07.002.

<sup>43</sup> De Los Angeles et al., (2015) - Hallmarks of pluripotency, *Nature* 525:469

<sup>44</sup> Wu, J., Platero-Luengo, A., Sakurai, M., Sugawara, A., Gil, M. A., Yamauchi, T., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2017). Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 168(3), 473–486.e15. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.036

χοίρων, κρίνοντας από το μεγάλο αριθμό αναπτυξιακά καθυστερημένων εμβρύων. Απαιτούνται πολλές ακόμη μελέτες με στόχο την βελτιστοποίηση του ποσοστού χιμαιρισμού με χρήση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων. Πιθανές λύσεις θα ήταν η δημιουργία hPSCs με μεγαλύτερο δυναμικό χιμαιρισμού, η εύρεση της καταλληλότερης στιγμής κατά την ανάπτυξη των εμβρύων για να γίνει η έγχυση ή η επιλογή ενός είδους-δέκτη πιο κοντά εξελικτικά στον άνθρωπο.

Συμπερασματικά, η χρήση των βλαστοκυττάρων στην αναγεννητική ιατρική είναι ιδιαιτέρως ελπιδοφόρα. Μια μεγάλη μερίδα επιστημόνων έχει ήδη στρέψει το ενδιαφέρον της σε αυτόν τον τομέα και έχει επιτελέσει σημαντική πρόοδο όσον αφορά την κατανόηση της ανθρώπινης εμβρυογένεσης. Η διευκόλυνση της ανάπτυξής και της εφαρμογής νέων φαρμάκων, η μελέτη της εξέλιξης σοβαρών ασθενειών σε *in vivo* μοντέλα, και φυσικά η ανάπτυξη ανθρώπινων μοσχευμάτων σε ξενογενή περιβάλλοντα, είναι μόνο μερικοί από τους μελλοντικούς στόχους της επιστήμης της αναγεννητικής ιατρικής.

# Εμβρυολογία της καρδιάς

## Καρδιά: δομή και λειτουργίες

Η καρδιά, είναι το κύριο όργανο του κυκλοφορικού συστήματος. Βρίσκεται ανάμεσα στους δύο πνεύμονες, πίσω από το στέρνο. Πρόκειται για μια αντλία, κατασκευασμένη από ένα χαρακτηριστικό είδος μυός, τον καρδιακό μυ. Η καρδιά του ανθρώπου, όπως και άλλων θηλαστικών και πτηνών, είναι τετράχωρη και αποτελείται από δύο κόλπους με λεπτά τοιχώματα, που βρίσκονται στο ανώτερο τμήμα της, και από δύο κοιλίες με παχύτερα τοιχώματα, που βρίσκονται στο κατώτερο τμήμα της. Οι δύο κοιλίες χωρίζονται μεταξύ τους με το μεσοκοιλιακό διάφραγμα και οι κόλποι με το μεσοκολπικό διάφραγμα. Μεταξύ των κόλπων και των κοιλιών υπάρχουν βαλβίδες που καθορίζουν τη μονόδρομη ροή του αίματος σε κάθε καρδιακή σύσπαση. Το αίμα κινείται από τους κόλπους προς τις κοιλίες, οι οποίες με τη συστολή τους το στέλνουν σε δύο αρτηρίες. Στο δεξιό κόλπο φτάνει το αποοξυγωνομένο αίμα από την περιφέρεια του σώματος, πλούσιο σε διοξείδιο του άνθρακα. Στον αριστερό κόλπο φτάνει το αίμα, που έχει ήδη περάσει από τους πνεύμονες και είναι πλούσιο σε οξυγόνο. Με τη συστολή των κόλπων το αίμα κινείται προς τις κοιλίες τη συνέχεια, με τη συστολή των κοιλιών, και ενώ οι βαλβίδες κλείνουν εμποδίζοντας την παλινδρόμηση του αίματος προς τους κόλπους, το αίμα διοχετεύεται στις αρτηρίες. Από την αριστερή κοιλία εισέρχεται στην αορτή και κινείται προς την περιφέρεια του σώματος, ενώ από τη δεξιά κοιλία εισέρχεται στην πνευμονική αρτηρία και κινείται προς τους πνεύμονες. Βαλβίδες που βρίσκονται στην είσοδο των δύο μεγάλων αρτηριών ελέγχουν τη ροή του αίματος από τις κοιλίες προς την αορτή και προς την πνευμονική αρτηρία<sup>45</sup>. Η λειτουργία της καρδιάς συντονίζεται από εσωτερικούς φυσικούς βηματοδότες με τη συνεργασία των κυττάρων του μυοκαρδίου, τα οποία μπορούν και συσπώνται απουσία νευρικής ή ορμονικής διέγερσης (αυτορρύθμιση). Οι φυσικοί βηματοδότες της καρδιάς βρίσκονται σε διάφορα σημεία, στον φλεβόκομβο, στον κολποκοιλιακό κόμβο και στις ίνες Purkinje<sup>46</sup>.

## Πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη

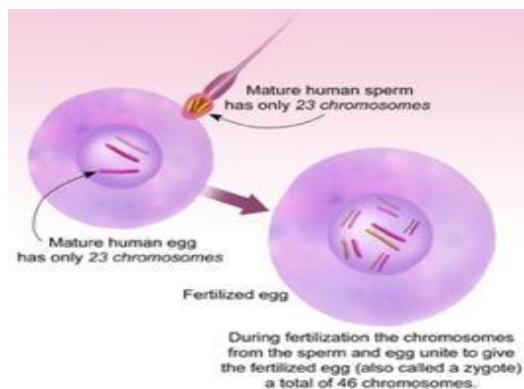
### Γονιμοποίηση

Η εμβρυογένεση όλων των διπλοειδών οργανισμών, έχεις ως πρώτο βήμα τη γονιμοποίηση, τη σύντηξη δηλαδή των απλοειδών γαμετών (σπέρμα και ωοκύτταρα), τη συγχώνευση των πυρήνων τους και τη δημιουργία του διπλοειδούς ζυγώτη. Αμέσως μετά τη σύντηξη των δύο γαμετών, πραγματοποιείται η αντίδραση φλοιού, η απελευθέρωση δηλαδή λυσοσωματικών ενζύμων από τα κοκκία του φλοιού του ωοκυττάρου, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της μοριακής δομής της διαφανούς ζώνης, καθιστώντας την αδιαπέραστη στα υπεράριθμα σπερματοζωάρια (αποφυγή πολυσπερμίας). Επιπρόσθετα, η σύντηξη ωαρίου-

<sup>45</sup> Anderson RH, Spicer DE, Hlavacek AM, Cook AC, Backer CL: Wilcox's surgical anatomy of the heart. 4th ed., Cambridge University Press, 2013.

<sup>46</sup> Zaza A, Rosen M: An introduction to cardiac electrophysiology. Taylor & Francis, 2000

σπερματοζωαρίου οδηγεί σε ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, μέσω του μονοπατιού της τριφοσφωρικής ινοσιτόλης. Έτσι, αυξάνεται η μεταβολική δραστηριότητα του ωαρίου και –στα σπονδυλωτά- δίνεται το έναυσμα για την έναρξη της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης<sup>47</sup>.



Εικόνα 7: Γονιμοποίηση ωαρίου <https://www.differenciatebetween.com/>

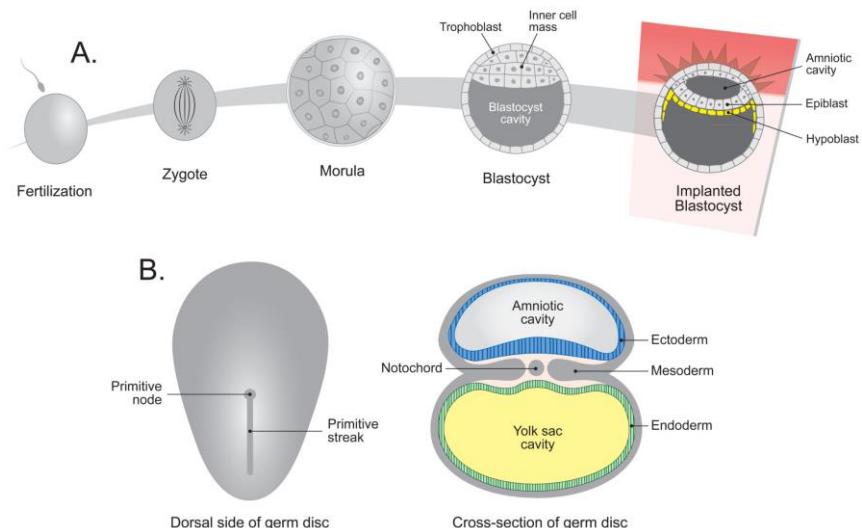
### Αυλάκωση

Σε αυτή τη φάση το ζωικό ζυγωτό είναι μικρό, σφαιρικό και πολωμένο κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα. Το άνω ημισφαίριο το οποίο φέρει τα πολικά σωμάτια, ονομάζεται ζωικό ημισφαίριο, ενώ το κάτω το οποίο είναι πλούσιο σε λέκιθο, φυτικό ημισφαίριο. Η αυλάκωση (cleavage), είναι το πρώτο στάδιο μετά τη γονιμοποίηση και χαρακτηρίζεται από πολλές διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Οι διαιρέσεις αυτές δεν είναι τυπικές μιτωτικές διαιρέσεις, καθώς τα κύτταρα που δημιουργούνται δεν συσσωρεύουν πρώτες ύλες, αλλά καταναλώνουν όσα υλικά έχουν κληρονομήσει από το κυτταρόπλασμα του ωαρίου, και έτσι, δεν αυξάνονται σε μέγεθος. Από τις αποθηκευμένες θρεπτικές ύλες αυτού του κυτταροπλάσματος προέρχονται τα υλικά που είναι απαραίτητα για όλες τις διαιρέσεις μέχρι την ολοκλήρωση του σταδίου της αυλάκωσης. Έτσι, το έμβρυο αποκτά ολοένα και περισσότερα κύτταρα, αλλά το μέγεθός του παραμένει σταθερό, ενώ αντιθέτως, το μέγεθος των κυττάρων που προκύπτουν από κάθε νέα διαιρέση είναι σχεδόν το μισό των προηγουμένων κυττάρων. Τα κύτταρα που δημιουργούνται από την αυλάκωση ονομάζονται βλαστομερίδια (blastomeres) και σχηματίζουν μια σφαίρα που στο εσωτερικό της είναι «κενή», δηλαδή δεν περιέχει κύτταρα, αλλά διογκώνεται μέσω πρόσληψης νερού.<sup>48</sup> Αυτή η κοιλότητα ονομάζεται βλαστική κοιλότητα ή βλαστόκοιλο (blastocoel) και το έμβρυο σ' αυτό το στάδιο ονομάζεται βλαστίδιο (blastula). Αξίζει να σημειωθεί ότι σημαντικό χαρακτηριστικό του βλαστίδιου σε ότι αφορά τη διαφοροποίηση και τη μορφογένεση. Όταν αρχίσουν οι κυτταρικές διαιρέσεις της αυλάκωσης, τα νέα κύτταρα δεν περιέχουν όλα τα ίδια ακριβώς συστατικά. Η 1η διαιρέση του ζυγωτού γίνεται κατά τον μεσημβρινό του ωαρίου και δίνει δύο κύτταρα που είναι μεταξύ τους πανομοιότυπα. Ομοίως, και από τη 2η διαιρέση (που επίσης γίνεται στο μεσημβρινό επίπεδο αλλά κάθετα προς το επίπεδο της 1ης

<sup>47</sup> Spermatogenesis — Fertilization — Contraception - Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction | S. Nieschlag | Springer

<sup>48</sup> Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης, 3η έκδοση, Jonathan M.W Slack

διαιρεσης) προκύπτουν συνολικώς τέσσερα κύτταρα που και αυτά είναι μεταξύ τους πανομοιότυπα. Όμως η επόμενη διαιρεση γίνεται στο επίπεδο του ισημερινού και πλέον δίνει δύο τετράδες κυττάρων που διαφέρουν μεταξύ τους. Η λέκιθος (αλλά και άλλες ουσίες) που διαιρούνταν ισομερώς στα τέσσερα πρώτα κύτταρα του εμβρύου, τώρα, με την 3η διαιρεση αρχίζει και διαφέρει σε κάθε ήμισυ του βλαστίδιου. Καθώς οι διαιρέσεις συνεχίζονται, τα κύτταρα κάθε πόλου του βλαστίδιου έχουν διαφορετικό περιεχόμενο και τελικά διαφορετικές ιδιότητες από τα κύτταρα του άλλου πόλου. Έχουμε με άλλα λόγια την πρώτη εκδήλωση διαφοροποίησης. Η αυλάκωση, τερματίζεται με τη διάρρηξη του περιβλήματος του βλαστίδιου. Τώρα, το βλαστίδιο ονομάζεται ελεύθερο βλαστίδιο και μπορεί πλέον να εμφυτευθεί στο ενδομήτριο<sup>49</sup>. Σύντομα μετά την εμφύτευση, το βλαστίδιο αποτελείται από δύο κυτταρικά στρώματα, την επιβλάστη και την υποβλάστη. Μια αύλακα που ονομάζεται πρωτόγονη ράβδος (primitive streak) σχηματίζεται στην επιβλάστη και εκτείνεται από την περιοχή του ουραίου, κεκλιμένα προς τον πρωτόγονο κόμβο (primitive node). Ο σχηματισμός της πρωτόγονης ράβδου καθορίζει τους κύριους άξονες του σώματος: τον κρανιο-ουραίου, τον κοιλιακό-ραχιαίο και τον αριστερό-δεξιό άξονα, προσανατολίζοντας έτσι την κυτταρική μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό<sup>50</sup>.



Εικόνα 8: Από το ζυγωτό στη βλαστοκύστη (Anesth Analg. Author manuscript; available in PMC 2017 September 01)

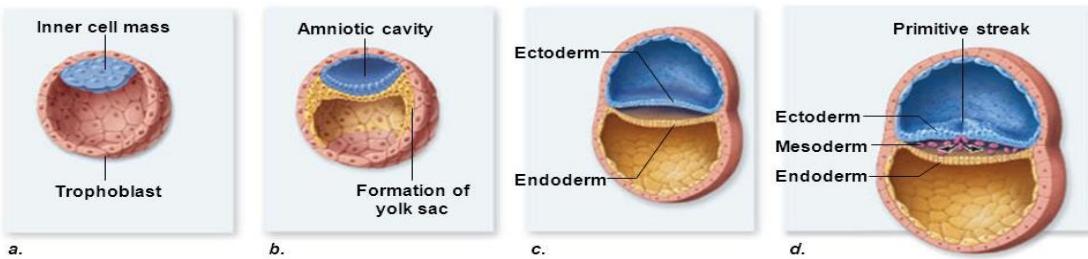
### Γαστριδίωση-Οργανογένεση

Με το πέρας της αυλάκωσης και τον σχηματισμό του ελευθέρου βλαστίδιου, οι κυτταρικές διαιρέσεις επιβραδύνονται πάρα πολύ και αρχίζει η επόμενη αναπτυξιακή φάση που ονομάζεται γαστριδίωση (gastrulation). Σ' αυτήν τη φάση, το έμβρυο, παύει να είναι μια απλή σφαίρα καθώς τα κύτταρα που το αποτελούν, αρχίζουν να μεταναστεύουν από την αρχική τους θέση και να οδηγούνται σε νέες θέσεις όπου πλέον θα συμμετάσχουν στο σχηματισμό των οργάνων. Η μετανάστευση των κυττάρων καθορίζεται από τη θέση τους στην επιβλάστη, κατά μήκος της πρωτογενούς αύλακας. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, το έμβρυο ονομάζεται γαστρίδιο (gastrula). Προκειμένου να σχηματιστεί το γαστρίδιο, τα κύτταρα του βλαστίδιου αναδιατάσσονται με τρόπο ώστε να σχηματίσουν τρεις διακριτές στιβάδες. Η

<sup>49</sup> Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης, 3<sup>η</sup> έκδοση, Jonathan M.W Slack

<sup>50</sup> Anesth Analg. Author manuscript; available in PMC 2017 September 01

εσωτερική στιβάδα καλείται ενδόδερμα (endoderm) και από αυτή θα αναπτυχθούν οι επιθηλιακοί ιστοί του εντέρου. Η εξωτερική στιβάδα, ονομάζεται εξώδερμα (ectoderm) και θα δώσει γένεση στην επιδερμίδα και το νευρικό σύστημα, ενώ η τρίτη στιβάδα ονομάζεται μεσόδερμα (mesoderm) και θα μας απασχολήσει στη συνέχεια. Τα κύτταρα κάθε στιβάδας αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένο τρόπο με τα κύτταρα των άλλων στιβάδων και αρχίζει πλέον η δημιουργία των οργάνων του σώματος (οργανογένεση).



Εικόνα 9: Γαστριδίωση στα θηλαστικά Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

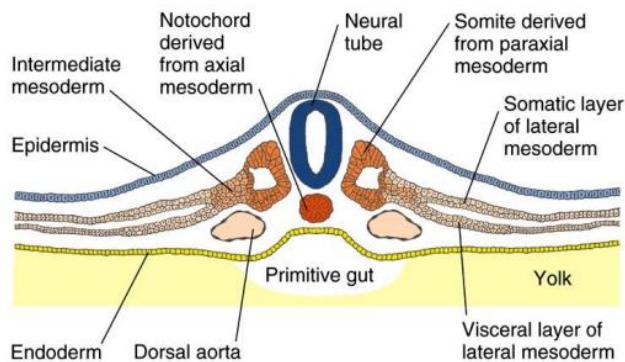
## Ανάπτυξη της καρδιάς

### Ανάπτυξη ιστών μεσοδερμικής προέλευσης

Το μεσόδερμα, είναι το μεσαίο βλαστόδερμα, το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στο ενδόδερμα και το εξώδερμα. Δίνει γένεση στους συνδετικούς ιστούς, τα περισσότερα οστά, τους χόνδρους, τους μύες, τους νεφρούς, το μυελό των οστών, το αίμα, τη λέμφο, τους ουρητήρες και την καρδιά. Σε ένα πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο, το μεσόδερμα διαχωρίζεται κατά μήκος του κεντρικού-περιφερικού άξονα σε 4 λωρίδες. Τη μέση γραμμή καταλαμβάνει η νωτοχορδή (notochord) ενώ εκατέρωθεν της βρίσκεται το παραξονικό μεσόδερμα (paraxial mesoderm), το οποίο θα δώσει τους σωμίτες. Πλευρικά από το παραξονικό μεσόδερμα, βρίσκεται το ενδιάμεσο μεσόδερμα (intermediate mesoderm) από το οποίο αναπτύσσονται οι γονάδες, οι νεφροί και τα επινεφρίδια. Πλευρικά από το ενδιάμεσο μεσόδερμα, βρίσκεται το μεσόδερμα του πλευρικού πετάλου (lateral plate), από το οποίο αναπτύσσονται τα τοιχώματα του σώματος, οι καταβολές των άκρων, τα αιμοφόρα αγγεία και η καρδιά<sup>51</sup>. Το πλευρικό πέταλο υποδιαιρείται από το κοιλωμα (coelom), στο εξωτερικό σωματικό μεσόδερμα (somatic mesoderm) από όπου θα αναπτυχθούν οι καταβολές των άκρων, και στο εσωτερικό σπλαχνικό μεσόδερμα (splanchnic mesoderm) από όπου θα προκύψει το μεσεντέριο και η καρδιά. Τέλος, ο σκελετός αναπτύσσεται από 3 περιοχές: το μεγαλύτερο μέρος του κρανίου αναπτύσσεται από τη νευρική ακρολοφία (neural crest), οι σπόνδυλοι από τους σωμίτες (somites) και ο σκελετός των άκρων από τις καταβολές των άκρων και τμήμα του παρακείμενου πλευρικού πετάλου.

<sup>51</sup> Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης, 3<sup>η</sup> έκδοση, Jonathan M.W Slack

## Mesoderm differentiation



Εικόνα 10: Η διαφοροποίηση του μεσοδέρματος  
(<http://www.d.umn.edu/~pschoff/documents/EndodermalandMesodermalOrgans-part1-web>)

### Οργανογένεση της καρδιάς

Η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που γίνεται λειτουργικό στα έμβρυα των σπονδυλωτών. Μάλιστα, η σωστή ανάπτυξη και επιβίωση του εμβρύου εξαρτώνται από την ικανότητα του κυκλοφορικού συστήματος να διοχετεύει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Ο σχηματισμός της καρδιάς είναι μια επακριβώς συντονισμένη διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης και μορφογένεσης και ακόμη και μια μικρή διαταραχή αυτής της διαδικασίας είναι ικανή να προκαλέσει συγγενείς καρδιοπάθειες (CHD). Η ευαισθησία της καρδιάς στις δυσπλασίες αντανακλάται από τη μεγάλη συχνότητα εμφάνισης συγγενούς καρδιακής νόσου (σχεδόν το 1% των γεννήσεων) (American Heart Association, 2003).

Η ανάπτυξη της καρδιάς στις διάφορες τάξεις των σπονδυλωτών γίνεται με παρόμοιο τρόπο, παρόλο που η τελική δομή του οργάνου διαφέρει σημαντικά. Οι ιστοί του μεσοδέρματος οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό της, αρχίζουν να γίνονται εμφανείς κατά το στάδιο της γαστριδίωσης, όταν το προ-καρδιακό μεσόδερμα, σχηματίζει μια πρώιμη σωληνοειδή καρδιά<sup>52</sup>. Στο ανθρώπινο έμβρυο αυτό συμβαίνει κατά την διάρκεια της τρίτης εβδομάδας της ανάπτυξης, ενώ στο έμβρυο ποντικού, κατά την όγδοη ημέρα (Ε8)<sup>53</sup>. Από αυτό το σημείο και έπειτα, η καρδιά συνεχίζει την λειτουργία της ως “αντλία”, ενώ διαρκώς μετασχηματίζεται, μέχρι να πάρει την τελική μορφή του τετράχωρου οργάνου.

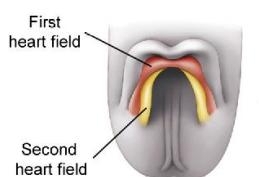
Γενικά, το πρότυπο σχηματισμού της καρδιάς μπορεί να συνοψιστεί στα εξής βήματα. Αρχικά, ένας αμφίπλευρος σωλήνας πρέπει να ενωθεί στην κοιλιακή μέση γραμμή για να σχηματίσει μια απλή σωληνοειδή καρδιά. Στην συνέχεια, ο σωλήνας “διπλώνει” και περιστρέφεται προς τα δεξιά (looping). Ακολουθεί ο σχηματισμός των 4 θαλάμων και ολοκληρώνεται με την ανάπτυξη της στεφανιαίας κυκλοφορίας, την νεύρωση από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και την ωρίμανση των βαλβίδων.

<sup>52</sup> Antoon Moorman et al., Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks, Heart 2013

<sup>53</sup> Sissman, Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: Comparative chronology 1970

Τα προγονικά καρδιογενή κύτταρα του μεσοδέρματος στο κρανιακό τμήμα της πρωτόγονης ράβδου μεταναστεύουν πλευρικά και σχηματίζουν μια δομή σχήματος ημισελήνου γύρω από τις κρανιακές νευρικές πτυχές που ονομάζονται πρωτογενές καρδιακό πεδίο (FHF) το οποίο θα αναπτυχθεί στην αριστερή κοιλία και σε τμήματα των κόλπων. Το δευτερογενές καρδιακό πεδίο (SHF) σχηματίζεται στο μέσον και ουραία από το πρωτογενές και συνεισφέρει στην δεξιά κοιλία, το σύστημα εκροής και τα λοιπά τμήματα των κόλπων, συμπεριλαμβανομένου του διαφράγματος. Αυτά τα πεδία είναι γενετικώς ευδιάκριτα, κατά την εμβρυική μέρα 7.5, μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων.

E7.5  
Cardiac crescent



Εικόνα 11: Πρώτο και Δεύτερο καρδιακό πεδίο (Cell metabolism 2015 Semaphorin signaling in cardiovascular development. Jonathan A. Epstein, Haig K Aghajanian, Manvendra K Singh)

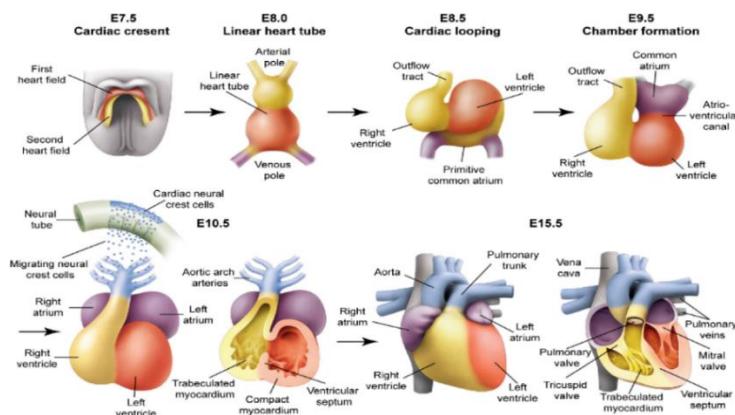
Τα κύτταρα αυτά, την 3η εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης στους ανθρώπους ή την μέρα E8 στα ποντίκια, θα κινηθούν κατά μήκος της αρχικής λωρίδας και θα σχηματίσουν δυο ενδοκαρδιακούς σωλήνες εκατέρωθεν του εμβρυικού άξονα. Η πλάγια και κεφαλική κάμψη του εμβρύου, οδηγεί στην επαφή των δυο σωλήνων στο θώρακα και την ένωση τους στον ενιαίο αρχέγονο καρδιακό σωλήνα (primitive heart tube). Ο σωλήνας αυτός αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα ενδοκαρδιακών κυττάρων και ένα εξωτερικό στρώμα μυοκαρδιακών κυττάρων, τα οποία διαχωρίζονται από μια εξωκυτταρική επιφάνεια, η οποία επιτρέπει την αμοιβαία σηματοδότηση μεταξύ των δύο στρωμάτων. Ταυτόχρονα αρχίζουν να σχηματίζονται εγκάρσιες εντομές και εκκολπώματα που οριοθετούν περιοχές με μελλοντικά διαφορετικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από τη φλεβική είσοδο και καταλήγοντας στην αρτηριακή έξοδο έχουμε: τον αρχέγονο κόλπο (primitive atrium), την αρχέγονη κοιλία (primitive ventricle), τον καρδιακό βολβό (bulbus cordis) και τον αρτηριακό κορμό (truncus arteriosus). Ο σωλήνας αυτός εσωτερικά αποτελείται από 3 στιβάδες: το ενδοκάρδιο, το μυοκάρδιο από το οποίο σχηματίζεται ο καρδιακός μυς και το περικάρδιο από το οποίο θα αναπτυχθεί ο συνδετικός ιστός που θα δώσει το περίβλημα της καρδιάς. Λίγο μετά τη σύντηξη των καταβολών, ο καρδιακός σωλήνας αρχίζει να εμφανίζει ρυθμικές συσπάσεις. Η ανάπτυξη του σφυγμού, είναι μια εγγενής ιδιότητα του καρδιακού μυός και στο ποντίκι καταγράφεται πρώτη φορά τη μέρα E8.5. Τα κύτταρα που προέρχονται από το πρωτογενές πεδίο της καρδιάς, παρέχουν κατά κύριο λόγο ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο τα κύτταρα από το δεύτερο καρδιακό πεδίο (SHF) μεταναστεύουν και κατασκευάζουν τους απαιτούμενους καρδιακούς θαλάμους<sup>54</sup>.

<sup>54</sup> Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nat Rev Genet 6, 826–835 (2005) doi:10.1038/nrg1710

Επόμενο βήμα είναι η καρδιακή αναδίπλωση (heart looping). Η αναδίπλωση της καρδιάς, είναι ένα πρώτο δείγμα ασυμμετρίας στον δεξιο-αριστερό άξονα κατά την εμβρυογένεση, με την καρδιά να “διπλώνει” πάντα προς τα δεξιά και οδηγεί σε ασύμμετρη έκφραση διάφορων μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη της καρδιάς.. Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι ιδιαιτέρως σημαντική, καθώς οι αρχικά διαδοχικά διατεταγμένες περιοχές του καρδιακού σωλήνα, θα έρθουν στη σωστή θέση ώστε να γίνει αργότερα ο σχηματισμός των καρδιακών θαλάμων, και να δημιουργηθούν τα δυο παράλληλα κυκλοφορικά συστήματα. Με τη διαδικασία αυτή, οι κόλποι μετακινούνται πίσω και άνω, ενώ η μελλοντική δεξιά κοιλία (καρδιακός βολβός) θα μετακινηθεί εμπρός, κάτω και δεξιά. Αξίζει να σημειωθεί, ότι από τον πρώιμα σχηματισμένο καρδιακό σωλήνα, δεν δύναται να αναπτυχθεί ολόκληρη η καρδιά. Ενώ λαμβάνει χώρα η αναδίπλωση, παρατηρείται ταυτόχρονη στρατολόγηση κι άλλων ιστών, οι οποίοι προέρχονται από το εμπρόσθιο ή δευτερογενές καρδιακό πεδίο. Η περιοχή αυτή έχει συσχετισθεί με την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Islet 1*, ενώ το πρωτογενές καρδιακό πεδίο σχετίζεται με την έκφραση του *Nkx2.5*. Παρόλα αυτά, όλα τα κύτταρα της καρδιακής γενεαλογίας εκφράζουν σε κάποιο βαθμό και τα δυο γονίδια.

Τελευταίο βήμα αυτής της πολύπλοκης διαδικασίας αποτελεί η ανάπτυξη των εσωτερικών διαφραγμάτων που θα σχηματίσουν την τετράχωρη καρδιά. Ο σχηματισμός των διαφραγμάτων είναι μια ιδιαιτέρως πολύπλοκη διαδικασία η οποία καταλήγει στη δημιουργία των εξής:

- Μεσοκολπικό διάφραγμα για τον διαχωρισμό των 2 κόλπων.
- Μεσοκοιλιακό διάφραγμα για τον διαχωρισμό των 2 κοιλιών.
- Ενδοκαρδιακά προσκεφάλαια για το διαχωρισμό των κολπο-κοιλιακών βαλβίδων.
- Προεκβολές για τον διαχωρισμό των μεγάλων αγγείων.



**Εικόνα 12: Οργανογένεση της καρδιάς, Epstein, Jonathan A. et al. "Semaphorin signaling in cardiovascular development." Cell metabolism 21 2 (2015): 163-173.**

### Γονιδιακή ρύθμιση της καρδιογένεσης

Τα γεγονότα τα οποία σχετίζονται με το σχηματισμό της καρδιάς, έχουν εκτενώς μελετηθεί, και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες έχει φανεί ότι ενεργοποιούνται μετά τη δημιουργία

των καρδιακών πεδίων<sup>55 56</sup>. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης των κυττάρων της επιβλάστης από την πρωτόγονη ράβδο (primitive streak), οδοί σηματοδότησης που περιλαμβάνουν BMP, NODAL, Wnt /β-κατενίνη και αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF) ενεργοποιούν την μεσοδερμική επαγγηγή προκαλώντας διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών σε μεσοδερμικά κύτταρα. Αυτά τα μεσοδερμικά κύτταρα, χαρακτηρίζονται από την έκφραση του παράγοντα μεταγραφής της T-box οικογένειας, Brachyury/T (Bry)<sup>57</sup> και μεταναστεύουν στο πλευρικό σπλαχνικό μεσόδερμα όπου υποβάλλονται σε διαφοροποίηση προς κύτταρα της καρδιακής γενεαλογίας. Το πρώτο στάδιο διαφοροποίησης περιλαμβάνει μείωση της σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης και την αύξηση της μη κανονικής σηματοδότησης Wnt, με αποτέλεσμα την έκφραση του VEGFR2 που χρησιμεύει ως δείκτης για κύτταρα δεσμευμένα στην καρδιογενή μοίρα. Στη συνέχεια, η σηματοδότηση μέσω ενός παράγοντα μεταγραφής T-box (esomesodermin) επάγει την έκφραση του γονιδίου mesoderm posterior 1 (MESP1). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα MESP1, έναν βασικό παράγοντα που εμπλέκεται στο προγραμματισμό των κυττάρων προς την καρδιακή γενεαλογία<sup>58</sup>. Το καρδιακό μεσόδερμα διαφοροποιείται περαιτέρω σε πρώτο και δεύτερο καρδιακό πεδίο. Η διαφοροποίηση στα κύτταρα του πρωτογενούς καρδιακού πεδίου προκαλείται μέσω της αυξημένης σηματοδότησης BMP και FGF και της μειωμένης σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης, με αποτέλεσμα την έκφραση των NKX2.5 και TBX5. Αύξηση της έκφρασης BMP, NOTCH και της μη κανονικής σηματοδότησης Wnt προκαλεί διαφοροποίηση σε κύτταρα του δευτερογενούς καρδιακού πεδίου με έκφραση Isl1, NKX2.5 και Flk1.<sup>59</sup>

#### Η οικογένεια ομοιοτικών γονιδίων NK

Από όλα τα γονίδια τα οποία προαναφέρθηκαν, ο πιο σημαντικός μάρτυρας της καρδιακής γενεαλογίας θεωρείται το Nkx2.5. Το Nkx2.5 (αλλιώς csx από το cardiac-specific homeobox), έχει ταυτοποιηθεί στα σπονδυλωτά και είναι το ομόλογο του γονιδίου *tinman* το οποίο συναντάται στη Drosophila melanogaster και είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του ραχιαίου αγγείου (αντίστοιχο της καρδιάς)<sup>60</sup>. Τέσσερα ομοιοτικά γονίδια τύπου NK ταυτοποιήθηκαν αρχικά στην Drosophila (NK1, NK2, NK3 και NK4) και στη συνέχεια η οικογένεια NK ταξινομήθηκε σε 2 υποοικογένειες, NK-1 (NK1 και τα ομόλογα αυτής) και NK-2 (NK2, NK3, NK4 και τα ομόλογα τους)<sup>61</sup>. Στα σπονδυλωτά έχουν βρεθεί πέντε Nk τύπου ομοιοτικά γονίδια ομόλογα με το *tinman* και εμπλέκονται στην ανάπτυξη της καρδιάς, το

55 T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, Development 1993 119: 419-431;

56 Schultheiss, T & Xydas, S & Lassar, Andrew. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. Development (Cambridge, England). 121. 4203-14.

57 Amy I Kavka, Jeremy B.A Green, Tales of tails: Brachyury and the T-box genes, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, Volume 1333, Issue 2, 1997.

58 Yu Liu & Robert J Schwartz (2013) Transient Mesp1 expression, Transcription, 4:3, 92-96, DOI: 10.4161/trns.24588

59 Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(10): a013847. Published 2013 Oct 1. doi:10.1101/cshperspect. a013847

60 R. Bodmer, the gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila, Development 1993 118: 719-729;

61 C Biben, T Hatzistavrou, R.P Harvey, Expression of NK-2 class homeobox gene Nkx2-6 in foregut endoderm and heart, Mechanisms of Development, Volume 73, Issue 1, 1998.

*Nkx2.3*<sup>62 63</sup>, το *Nkx2.5*<sup>64 65</sup>, το *Nkx2.6*<sup>66</sup>, το *Nkx2.7*<sup>67</sup>, και το *Nkx2.8*<sup>68</sup>. Από αυτά, το *Nkx2.5* εκφράζεται νωρίτερα και η έκφραση του διατηρείται τόσο σε προ εμβρυικό, όσο και σε μετά εμβρυικό στάδιο. Το όνομα Nkx2-5 από ταξινομική άποψη σημαίνει ότι είναι το πέμπτο γονίδιο σπονδυλωτού που αναγνωρίζεται στην οικογένεια ομοιοτικών γονιδίων NK-2<sup>69</sup>. Εκτός από την καρδιά, έκφραση του *Nkx2.5* παρατηρούμε σε μη καρδιακούς ιστούς, όπως στον φάρυγγα, το θυρεοειδή και το στομάχι<sup>70</sup>.

Οι πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια, συνήθως έχουν εξαιρετικά συντηρημένη δομή αποτελούμενη από την N-τελική περιοχή TN, την ομοιοεπικράτεια και την NK-2-ειδική περιοχή (NK2 specific domain- NK2-SD) προς την C-τελική πλευρά του πεπτιδίου<sup>71</sup>. Η ομοιοεπικράτεια του *Nkx2-5* έχει μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας που συνδέεται με την ειδική αλληλουχία DNA 5'T(C / T) AAGTG 3'<sup>72</sup>. Η περιοχή NK2-SD είναι πλούσια σε προλίνη και μπορεί να λειτουργήσει ως επιφάνεια διεπαφής και αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η λειτουργία της περιοχής TN παραμένει ασαφής.

62 Evans SM, Yan W, Murillo MP, Ponce J, Papalopulu N. *tinman*, a Drosophila homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of gene in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of *tinman*. *Development*. 1995; 121:3889–3899

63 A. Buchberger, K. Ragge, H.H. Arnold, the myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994), pp. 17289-17296

64 Komuro I, Izumo S. *Csx*: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):8145–8149. doi:10.1073/pnas.90.17.8145

65 T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development* 1993 119: 419-431;

66 C Biben, T Hatzistavrou, R.P Harvey, Expression of NK-2 class homeobox gene *Nkx2-6* in foregut endoderm and heart, *Mechanisms of Development*, Volume 73, Issue 1, 1998.

67 Kyu-Ho Lee, Qihong Xu, Roger E. Breitbart, A Newtinman-Related Gene, *nkx2.7*, Anticipates the Expression of *nkx2.5* and *nkx2.3* in Zebrafish Heart and Pharyngeal Endoderm, *Developmental Biology*, Volume 180, Issue 2, 1996

68 James M. Reecy, Miho Yamada, Kathleen Cummings, Drazen Sosic, Ching-Yi Chen, Gregor Eichele, Eric N. Olson, Robert J. Schwartz, Chicken *Nkx-2.8*: A Novel Homeobox Gene Expressed in Early Heart Progenitor Cells and Pharyngeal Pouch-2 and -3 Endoderm, *Developmental Biology*, Volume 188, Issue 2, 1997

69 T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development* 1993 119: 419-431;

70 C.L. Lien, C. Wu, B. Mercer, R. Webb, J.A. Richardson, E.N. Olson, Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer, *Development* 1999 126: 75-84;

<sup>71</sup> C Biben, T Hatzistavrou, R.P Harvey, Expression of NK-2 class homeobox gene *Nkx2-6* in foregut endoderm and heart, *Mechanisms of Development*, Volume 73, Issue 1, 1998

72 Ching Yi Chen and Robert J. Schwartz, Identification of Novel DNA Binding Targets and Regulatory Domains of a Murine Tinman Homeodomain Factor, *nkx-2.5*, 1995, *The Journal of Biological Chemistry* 270, 15628-15633.

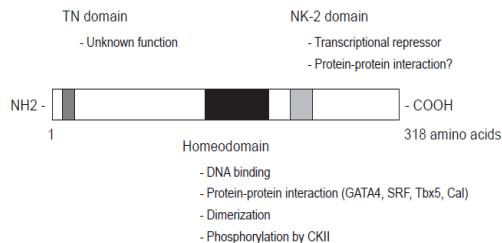


Fig. 1. Protein structure and functional domains of Csx/Nkx2-5. The homeodomain is indicated by a black box, TN domain with a dark grey box, and NK-2 domain with a light grey box.

**Εικόνα 13: C Biben, T Hatzistavrou, R.P Harvey, Expression of NK-2 class homeobox gene Nkx2-6 in foregut endoderm and heart, Mechanisms of Development, Volume 73, Issue 1, 1998**

### Ο ρόλος του γονιδίου Νκχ 2,5

Το *Nkx2-5*, είναι ο πρώτος γνωστός δείκτης της καρδιακής γενεαλογίας. Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα πρώιμα καρδιακά κύτταρα τόσο στο πρωτογενές, όσο και στο δευτερογενές καρδιακό πεδίο κατά την εμβρυογένεση του ποντικού, και συνεχίζει να εκφράζεται σε υψηλό επίπεδο στην καρδιά κατά την ενηλικίωση<sup>73 74 75 76</sup>. Ο ρόλος του *Nkx2-5* στην ανάπτυξη της καρδιάς έχει διερευνηθεί εκτενώς. Στα έμβρυα *Xenopus*, η υπερέκφραση είτε του *XNkx2-5* είτε του *XNkx2-3* προκάλεσε αύξηση του μεγέθους της καρδιάς λόγω αυξημένου αριθμού μυοκαρδιακών κυττάρων, δηλαδή υπερπλασίας<sup>77</sup>. Ομοίως, η έγχυση του *Nkx2-5* σε έμβρυα zebrafish οδήγησε σε μεγάλες υπερπλαστικές καρδιές<sup>78</sup>. Σε πειράματα αποσιώπησης γονιδίων φάνηκε ότι ποντίκια knock out για το *Nkx2.5*, πεθαίνουν την ημέρα E9.5 λόγω του μη φυσιολογικού σχηματισμού του καρδιακού σωλήνα<sup>79 80 81</sup>. Ωστόσο, σε αυτά τα ποντίκια, φάνηκε να υπάρχουν παλλόμενα καρδιομυοκύτταρα στο μη φυσιολογικά σχηματισμένο καρδιακό σωλήνα κάτι που δείχνει ότι στα σπονδυλωτά, άλλοι παράγοντες μεταγραφής τύπου NK2 μπορούν να αντισταθμίσουν σε ένα βαθμό την απουσία του *Nkx2*.<sup>82</sup> Ενώ τα προγονικά καρδιομυοκύτταρα φαίνεται να μπορούν να στραφούν προς την καρδιακή

<sup>73</sup>Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(17):8145-8149. doi:10.1073/pnas.90.17.8145

<sup>74</sup>T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, Development 1993 119: 419-431;

<sup>75</sup> Hideko Kasahara, Sonia Bartunkova, Martina Schinke, Makoto Tanaka, and Seigo Izumo, Cardiac and Extracardiac Expression of Csx/Nkx2.5 Homeodomain Protein, Circulation Research 1998;82(9). doi.org/10.1161/01.RES.82.9.936

<sup>76</sup> Edouard G Stanley, Christine Biben, Andrew Elefantiy, Louise Barnett, Frank Koentgen, Lorraine Robb and Richard P Harvey, Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5., Int. J. Dev. Biol. 46: 431 - 439 (2002)

<sup>77</sup> Cleaver OB, Patterson KD, Krieg PA, Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in *Xenopus* embryos results in myocardial hyperplasia, Development. 1996 Nov;122(11):3549-56.

<sup>78</sup>D.Y. Stainier, B. Fouquet, J.N. Chen, K.S. Warren, B.M. Weinstein, S.E. Meiler, M.A. Mohideen, S.C. Neuhauss, L. Solnica-Krezel, A.F. Schier, F. Zwartkruis, D.L. Stemple, J. Malicki, W. Driever, M.C. Fishman, Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo, Development 1996 123: 285-292;

<sup>79</sup> Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5.

I Lyons, L M Parsons, L Hartley, R Li, J E Andrews, L Robb, and R P Harvey Genes Dev. July 1, 1995 9: 1654-1666; doi:10.1101/gad.9.13.1654

<sup>80</sup> M. Tanaka, Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki, S. Izumo, the cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development, Development 1999 126: 1269-1280

<sup>81</sup> Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, et al. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. Cell. 2007;128(5):947-959. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.042

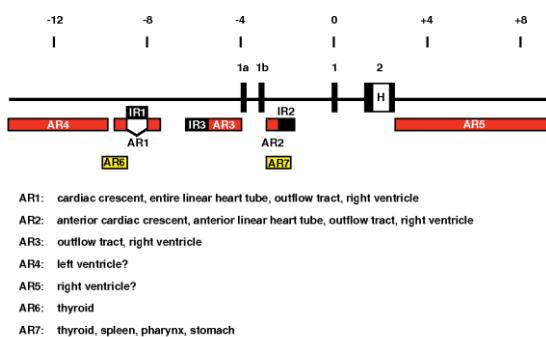
<sup>82</sup> G. Ranganayakulu, D.A. Elliott, R.P. Harvey, E.N. Olson, Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice, Development 1998 125: 3037-3048;

γενεαλογία απουσία του *Nkx2.5*, η έκφραση αρκετών μυοκαρδιακών γονιδίων (μεταξύ άλλων γονίδια που κωδικοποιούν την ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης 2v, το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο, το εγκεφαλικό νατριουρητικό πεπτίδιο) στην καρδιά *Nkx2.5*-/- εμβρύων, είναι μειωμένη<sup>83 84</sup>.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το *Nkx2.5* εξακολουθεί να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση αρκετών ειδικών για την καρδιά γονιδίων<sup>85</sup> και ότι υπερισχύει έναντι άλλων καρδιακών παραγόντων μεταγραφής.

### Έλεγχος της έκφρασης του *Nkx2.5*

Η ρύθμιση της έκφρασης του *Nkx2.5* είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Στο ποντίκι, η ρυθμιστική περιοχή του *Nkx2.5*, περιέχει πολλαπλούς ενισχυτές και καταστολείς που διεγείρουν την ιστο-ειδική έκφραση του γονιδίου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη<sup>86</sup>. Πιο συγκεκριμένα, σε μια περιοχή μήκους 23kb γύρω από το γονίδιο *Nkx2.5*, βρέθηκαν 7 περιοχές που δρουν ως ενεργοποιητές και 3 που δρουν σαν καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης. Μερικοί ενισχυτές του *Nkx2.5* είναι ενεργοί στις ίδιες περιοχές της καρδιάς και κάποιοι σχετίζονται με έκφραση συγκεκριμένων υποπληθυσμών καρδιομυοκυττάρων εντός των καρδιακών διαμερισμάτων, αλλά κανένας δεν μπορεί από μόνος του να εξηγήσει το πλήρες πρότυπο έκφρασης του γονιδίου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και μετά τη γέννηση.



Εικόνα 14: R.J. Schwartz, E.N. Olson, Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating *Nkx2-5* transcription

Μια σειρά αναλύσεων διαγραφής χαρτογράφησε έναν απομακρυσμένο καρδιακό ενισχυτή (περιοχή ενεργοποίησης 1, AR1), που βρίσκεται περίπου 9 kb άνωθεν του γονιδίου και αποτελείται από 2 θετικές ρυθμιστικές περιοχές με μια ενδιάμεση αρνητική ρυθμιστική περιοχή<sup>87</sup>. Αυτός ο ενισχυτής ρυθμίζει την έκφραση του *Csx* / *Nkx2.5* μέχρι την καρδιακή

<sup>83</sup> Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*.

I Lyons, L M Parsons, L Hartley, R Li, J E Andrews, L Robb, and R P Harvey Genes Dev. July 1, 1995 9: 1654-1666; doi:10.1101/gad.9.13.1654

<sup>84</sup> C Biben and R P Harvey, Homeodomain factor *Nkx2-5* controls left/right asymmetric expression of bHLH gene *eHand* during murine heart development., Genes Dev. June 1, 1997 11: 1357-1369; doi:10.1101/gad.11.11.1357

<sup>85</sup> Benoit G. Bruneau, Zheng-Zheng Bao, Makoto Tanaka, Jean-Jacques Schott, Seigo Izumo, Constance L. Cepko, J.G. Seidman, Christine E. Seidman, Cardiac Expression of the Ventricle-Specific Homeobox Gene *Irx4* Is Modulated by *Nkx2-5* and *dHand*, Developmental Biology, Volume 217, Issue 2,2000, doi.org/10.1006/dbio.1999.9548

<sup>86</sup> R.J. Schwartz, E.N. Olson, Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating *Nkx2-5* transcription Development 1999 126: 4187-4192;

<sup>87</sup> C.L. Lien, C. Wu, B. Mercer, R. Webb, J.A. Richardson, E.N. Olson, Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer, Development 1999 126: 75-84;

αναδίπλωση αλλά στη συνέχεια, η δραστηριότητα του περιορίζεται στη δεξιά κοιλία. Το γεγονός ότι ο ενισχυτής δεν εκφράζεται στην αριστερή κοιλία και την αορτή, δείχνει ότι υπάρχουν άλλα ρυθμιστικά στοιχεία για αυτές τις περιοχές. Περίπου 3 kb άνωθεν του γονιδίου, βρίσκεται ένας άλλος καρδιακός ενισχυτής (ενεργοποιητική περιοχή 2, AR2) ο οποίος συμβάλλει στην έκφραση του γονιδίου σε τμήμα της καρδιακής ημισελήνου, στον πρόσθιο καρδιακό σωλήνα, στον σωλήνα εκροής και στην δεξιά κοιλία<sup>88</sup>. Η έκφραση αυτού του ενισχυτή φαίνεται πολύ πιο περιορισμένη σε σχέση με αυτή του AR1 ο οποίος αντικατοπτρίζει την έκφραση του γονιδίου έως το στάδιο του looping. Επιπλέον, ένας ενισχυτής (περιοχή ενεργοποίησης 3, AR3) ταυτοποιήθηκε περίπου 5 kb άνωθεν του γονιδίου, που οδηγεί την έκφραση του στην οδό εκροής<sup>89</sup> και ένας ενισχυτής για έκφραση στη δεξιά κοιλία βρίσκεται 6kb κάτωθεν του γονιδίου<sup>90</sup>.

Οι ενισχυτές αυτοί δρουν σαν cis ρυθμιστικά στοιχεία, επηρεάζουν δηλαδή μόνο την έκφραση γειτονικών τους γονιδίων. Η ανάπτυξη της καρδιάς ενορχηστρώνεται από τους συντηρημένους παράγοντες καρδιακής μεταγραφής (TFs) που «δένουν» σε αυτά τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία (CREs). Ο απομακρυσμένος ενισχυτής AR1 περιέχει αρκετές θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες μεταγραφής GATA και μία από τις θέσεις δέσμευσης GATA είναι υπεύθυνη για την καρδιακή έκφραση. Μάλιστα, μετάλλαξη αυτής της θέσης καταργεί τη δραστηριότητα στην καρδιά καθώς και στον θυρεοειδή<sup>91</sup>. Παρομοίως, πολλαπλές θέσεις δέσμευσης GATA είναι παρούσες εντός του ενισχυτή AR2, και μεταλλάξεις σε δύο από αυτές τις θέσεις GATA οδηγούν σε διακοπή της δραστηριότητας του ενισχυτή στην καρδιά<sup>92</sup>. Οι παράγοντες GATA4, GATA5 και GATA6 έχουν ίδιο πρότυπο έκφρασης με το Nkx2-5 στην αναπτυσσόμενη καρδιά<sup>93</sup> ενώ ποντίκια knock out για τον GATA4 εμφάνισαν ελαττώματα στον σχηματισμό της καρδιάς τα οποία οδήγησαν στον θάνατο<sup>94</sup>. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι παράγοντες GATA εκφράζονται σε μεγαλύτερη ποικιλία εμβρυϊκών ιστών από εκείνους στους οποίους εκφράζεται και το Nkx2-5, η σηματοδότηση GATA από μόνη της δεν μπορεί να υποστηρίξει το επίπεδο έκφρασης Nkx2-5<sup>95</sup> και άρα είναι πιθανό ότι άλλα cis-ενεργά στοιχεία μπορεί να ανταποκρίνονται άμεσα στις οδούς σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τους καρδιογενείς επαγωγείς.

<sup>88</sup> R.D. Searcy, E.B. Vincent, C.M. Liberatore, K.E. Yutze, A GATA-dependent nκx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice, Development 1998 125: 4461-4470;

<sup>89</sup> J.M. Reecy, X. Li, M. Yamada, F.J. DeMayo, C.S. Newman, R.P. Harvey, R.J. Schwart, Identification of upstream regulatory regions in the heart-expressed homeobox gene Nkx2-5, Development 1999 126: 839-849;

<sup>90</sup> M. Tanaka, Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki, S. Izumo, the cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development, Development 1999 126: 1269-1280;

<sup>91</sup> C.L. Lien, C. Wu, B. Mercer, R. Webb, J.A. Richardson, E.N. Olson, Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer, Development 1999 126: 75-84;

<sup>92</sup> R.D. Searcy, E.B. Vincent, C.M. Liberatore, K.E. Yutze, A GATA-dependent nκx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice, Development 1998 125: 4461-4470;

<sup>93</sup> Laverriere A. C., MacNeill C., Mueller C., Poelmann R. E., Burch J. B., Evans T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. J. Biol. Chem. 269, 23177-23184

<sup>94</sup> J D Molkentin, Q Lin, S A Duncan, and E N Olson, Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis., Genes Dev. April 15, 1997 11: 1061-1072; doi:10.1101/gad.11.8.1061

<sup>95</sup> Jeffery D. Molkentin, The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6: UBIQUITOUSLY EXPRESSED REGULATORS OF TISSUE-SPECIFIC GENE EXPRESSION, J. Biol. Chem. 2000 275: 38949-. doi:10.1074/jbc.R000029200

Στην *Drosophila*, η μεσοδερμική έκφραση του *tinman* εξαρτάται από το στοιχείο απόκρισης *Decapentaplegic* (*Dpp*), ένα ομόλογο του *bmp-2* και -4<sup>96</sup>. Η πρωτεΐνη *Medea*, το ομόλογο της *Drosophila* για το *Smad4*, μπορεί να ρυθμίσει το *tinman* μέσω των θέσεων πρόσδεσης στην 3' περιοχή του<sup>97</sup>. Στην *Drosophila*, τα knock out έμβρυα για τη *Medea* δείχνουν σημαντική μείωση της έκφρασης του *tinman* στο προοπτικό καρδιακό μεσόδερμα που υποδεικνύει ότι η *Medea* είναι απαραίτητη για να ενεργοποιήσει την έκφραση του *tinman* σε απόκριση στο *Dpp*. Στο ποντίκι, τα *bmp2*<sup>-/-</sup> έμβρυα σχηματίζουν έναν υποτυπώδη καρδιακό σωλήνα ο οποίος αποτυγχάνει να σχηματίσει μια καρδιά τεσσάρων θαλάμων ή αδυνατούν εντελώς να σχηματίσουν μια καρδιά<sup>98</sup>. Η ανάγκη ύπαρξης μίας θέσης δεσμεύσεως *Smad* για την καρδιακή έκφραση του *Csx* / *Nkx2-5* είναι συντηρημένη εξελικτικά μεταξύ της *Drosophila*, του κοτόπουλου, του ποντικού και του ανθρώπου<sup>99</sup>.

Συμπερασματικά, φάνηκε ότι το BMP σηματοδοτικό μονοπάτι συμμετέχει σε μια διασταυρούμενη συζήτηση με καρδιακούς παράγοντες GATA μέσω της αλληλεπίδρασης *Smad-GATA* και της μεταγραφικής συνεργασίας<sup>100</sup>. Είναι πιθανό ότι άλλες οδοί και παράγοντες μεταγραφής θα συντονιστούν επίσης με αυτά τα σήματα, θετικά ή αρνητικά, για να ολοκληρωθεί η μετάβαση στην καρδιακή γενεαλογία και να αποδοθεί το πρότυπο έκφρασης του *Nkx2.5*.

---

96 Frasch, M. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464–467 (1995)

doi:10.1038/374464a0

97 Xu X, Yin Z, Hudson JB, Ferguson EL, Frasch M. Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* 1998;12(15):2354–2370. doi:10.1101/gad.12.15.2354

98 H. Zhang, A. Bradley, Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development *Development* 1996 122: 2977-2986;

99 Christine M. Liberatore, Robin D. Searcy-Schrick, Eric B. Vincent, Katherine E. Yutzey, Nkx-2.5 Gene Induction in Mice Is Mediated by a Smad Consensus Regulatory Region, *Developmental Biology*, Volume 244, Issue 2, 2002

100 Brown III, C. O., Chi, X., Garcia-Gras, E., Shirai, M., Feng, X. H., & Schwartz, R. J. (2004). The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer. *J Biol Chem* 279, 10659– 10669.).

# Κατασκευή αλλογενούς καρδιάς σε ποντίκι

Οι σύγχρονες εξελίξεις σχετικά με την χρήση εμβρυικών και επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων στην Αναγεννητική Ιατρική, είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρες και υπόσχονται να λύσουν σοβαρά κοινωνικοοικονομικά ζητήματα που σχετίζονται με τις μεταμοσχεύσεις οργάνων. Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο κεφάλαιο αυτής της εργασίας, μια επιστημονική ομάδα έχει καταφέρει να δημιουργήσει *in vivo* διάφορους ιστούς και όργανα με τη μέθοδο της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύτταρης. Έως σήμερα, οι ερευνητές έχουν καταφέρει να δημιουργήσουν μεταξύ άλλων, Τ και Β λεμφοκύτταρα σε ποντίκια ανίκανα να τα παράγουν *en-dogenously*<sup>101</sup>, λειτουργικό πάγκρεας από βλαστοκύτταρα ποντικών και αρουραίων σε ποντίκια knockout για το γονίδιο *Pdx1* (*Pdx1<sup>-/-</sup>*), έναν σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για την ανάπτυξη του παγκρέατος<sup>102</sup>, λειτουργικό πάγκρεας σε *Pdx1<sup>+/+/-</sup>* χοίρους, νεφρούς από βλαστοκύτταρα ποντικών σε ποντίκια knockout για το γονίδιο *Sall1<sup>-/-</sup>*, απαραίτητο για τη νεφρογένεση<sup>103</sup>.

Ωστόσο, τα προβλήματα που προέκυψαν ήταν σημαντικά, κάνοντας αυτή τη τεχνική μάλλον ακατάλληλη για ανάπτυξη ανθρώπινων οργάνων σε ζωικούς φορείς. Αρχικά, τα βλαστοκύτταρα τα οποία εγχέονται στις βλαστοκύτταρες, μπορούν να αποικίσουν και άλλους ιστούς εκτός από το όργανο-στόχο, συμπεριλαμβανομένου του εγκέφαλου. Έτσι εγείρονται σοβαρά βιοηθικά ζητήματα όσον αφορά τη δημιουργία χιμαιρικών ζώων με τη χρήση ανθρώπινων PSCs, καθώς, εάν αρκετά ανθρώπινα κύτταρα καταλήξουν στον εγκέφαλο του ζώου-δέκτη, τα χιμαιρικά ζώα που θα προκύψουν ίσως έχουν κάποιου βαθμού ανθρώπινη νοημοσύνη. Εξίσου σοβαρός είναι ο κίνδυνος να προκύψουν χιμαιρικά ζώα τα οποία θα παράγουν ανθρώπινα γαμετικά κύτταρα. Ένα άλλο πρόβλημα, προκύπτει από το γεγονός ότι στους οργανισμούς που λειτουργούν ως δέκτες, έχει δημιουργηθεί μια μετάλλαξη (έλλειψη ενός γονιδίου υπεύθυνου για την ανάπτυξη συγκεκριμένου οργάνου), η οποία πιθανώς επηρεάζει και άλλες πτυχές της φυσιολογίας τους. Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα που επιχείρησε να αναπτύξει νεφρούς, σε ποντίκια knockout για το γονίδιο *Sall1*, απαραίτητο για την νεφρογένεση, παρατήρησε ότι ενώ τα χιμαιρικά ποντίκια που προέκυψαν, είχαν φυσιολογικούς μορφολογικά νεφρούς, σχεδόν αποκλειστικά φτιαγμένους από τα ESCs ή τα iPSCs που χρησιμοποιήθηκαν, πέθαιναν σύντομα μετά τη γέννηση, πιθανώς επειδή τα νεογέννητα ποντίκια δεν είχαν την ικανότητα να τραφούν σωστά. Καθώς το *Sall1* εκφράζεται και στον εγκέφαλο, η έλλειψη του ίσως επηρέασε το νευρικό μονοπάτι το οποίο είναι υπεύθυνο για τον θηλασμό Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσπάθεια της ομάδας του Izpisua Belmonte να δημιουργήσει καρδιά σε *Nkx2.5<sup>-/-</sup>*-ποντίκια εγχέοντας PSCs αρουραίων

<sup>101</sup> Chen, J, R Lansford, V Stewart, F Young, and fw Alt. (1993). RAG-2- deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4528–4532.

<sup>102</sup> Kobayashi T, T Yamaguchi, S Hamanaka, M Kato-Itoh, Y Yamazaki, M Ibata, H Sato, YS Lee, J Usui, et al. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. Cell 142:787–799.

<sup>103</sup> Usui J, T Kobayashi, T Yamaguchi, AS Knisely, R Nishinakamura and H Nakuchi. (2012). Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. Am J Pathol 180:2417–2426.

με τη μέθοδο της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης. Όπως είναι ήδη γνωστό<sup>104</sup>, η αποσιώπηση του σημαντικού καρδιακού δείκτη *Nkx2.5*, δεν οδηγεί σε πλήρη απουσία καρδίας, αλλά έχει ώς αποτέλεσμα έναν καρδιακό ιστό μη κανονικής μορφολογίας στα knock out ζώα. Κατ' επέκταση, η έγχυση των PSCs αφούραίων αν και έσωσε την μορφολογία του καρδιακού ιστού στα χιμαιρικά ζώα, δεν οδήγησε στο σχηματισμό του οργάνου αποκλειστικά από τα κύτταρα δότες. Επιπροσθέτως, οι ερευνητές δεν κατάφεραν να πάρουν ζωντανά χιμαιρικά ζώα<sup>105</sup>.

Για το λόγο αυτό, στο παρόν project, προτείνεται μια διαφορετική γενετική προσέγγιση, η οποία μπορεί να ξεπεράσει αυτά τα προβλήματα. Συγκεκριμένα, δεν γίνεται χρήση της τεχνικής της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης, κι έτσι δεν χρειάζεται να γίνουν μεταλλαγές σε γονίδια, τα οποία πιθανώς εξυπηρετούν κι άλλες λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν δύο γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές εμβρυικών βλαστικών κυττάρων εκ των οποίων η μία θα συνεισφέρει σε καρδιακούς ιστούς και η άλλη σε μη καρδιακούς ιστούς στο αναπτυσσόμενο χιμαιρικό έμβρυο. Τα μεν κύτταρα τα οποία θα συνεισφέρουν στους καρδιακούς ιστούς (κυτταρική σειρά δότη), εκφράζουν μια κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, ενώ τα κύτταρα τα οποία θα δώσουν όλους τους υπόλοιπους ιστούς του εμβρύου, θα εκφράζουν μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (κυτταρική σειρά δέκτη), ώστε να υπάρχει μια οπτικοποίηση της συνεισφοράς τους στο χιμαιρικό έμβρυο. Επιπροσθέτως, η τεχνική αυτή υπερέχει της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης καθώς τα κύτταρα τα οποία θα δώσουν το όργανο στόχο, δεν συνεισφέρουν στο υπόλοιπο σώμα της χιμαιρας. Έτσι, εάν αυτή η τεχνική χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ανθρώπινων οργάνων σε θηλαστικά, δεν θα προκύψουν βιοηθικοί προβληματισμοί καθώς τα ανθρώπινα κύτταρα θα αποκλειστούν από τον εγκέφαλο και τα γαμετικά κύτταρα του οργανισμού-δότη. Με μικρές παραλλαγές, η γενετική στρατηγική που προτείνεται σε αυτό το project, πιστεύεται ότι θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα στη μακρόχρονη και απαιτητική προσπάθεια δημιουργίας ανθρώπινων οργάνων προς μεταμόσχευση, σε θηλαστικά.

## Προτεινόμενη μεθοδολογία

Πρώτο βήμα αυτής της προσπάθειας, είναι η δημιουργία δύο διαφορετικών βλαστοκυτταρικών σειρών οι οποίες θα συνεισφέρουν με διαφορετικό τρόπο στο χιμαιρικό ποντίκι που θα προκύψει. Η σειρά των κυττάρων-δότη (*donor cells*) θα είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του οργάνου-στόχου, που στη παρούσα εργασία είναι η καρδιά, ενώ η σειρά των κυττάρων-δέκτη (*host cells*) θα δώσει γένεση σε όλους τους άλλους εμβρυικούς ιστούς εκτός από την καρδιά. Τόσο για τα κύτταρα του δότη όσο και για του δέκτη, θα δημιουργηθεί εργαστηριακά μια αλληλουχία DNA η οποία θα εισαχθεί με τη μέθοδο CRISPR, στο γενετικό τόπο *Hip11* του γονιδιώματος των mESC.

<sup>104</sup> I Lyons, L M Parsons, L Hartley, R Li, J E Andrews, L Robb, and R P Harvey ,Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5, Genes Dev. July 1, 1995 9: 1654-1666; doi:10.1101/gad.9.13.1654

<sup>105</sup> Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. Cell. 2017;168(3):473–486.e15. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.036

## Ο γενετικός τόπος Hipp11 (H11)

Η ύπαρξη ενός “ασφαλούς” γενετικού τόπου, που επιτρέπει δηλαδή την έκφραση των διαγονιδίων, χωρίς να διαταράσσει τη λειτουργία των εσωτερικών γονιδίων, είναι ένας κρίσιμος παράγοντας σε πειράματα κατασκευής διαγονιδιακών ζώων. Ο γενετικός τόπος Rosa26 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ποντίκια, ανθρώπους και χοίρους, ωστόσο αποδείχθηκε ότι δεν είναι ιδανικός για μερικές γονιδιακές παρεμβολές καθώς ο Rosa26 υποκινητής μπορούσε να παρέμβει στην έκφραση του διαγονιδίου<sup>106</sup>. Ένας εναλλακτικός γενετικός τόπος, ο τόπος Hipp11 (H11), περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον Hipprenmeyer et al.<sup>107</sup> το 2010 και περαιτέρω επικυρώθηκε σε διαγονιδιακούς ποντικούς<sup>108</sup> και σε ανθρώπινα βλαστοκύτταρα<sup>109</sup>. Σε ποντικούς, ο τόπος H11 βρίσκεται εντός μιας περιοχής μεταξύ των γονιδίων Eif4enif1 και Drg1, κοντά στο κεντρομερές του χρωμοσώματος 11. Πειράματα *in vivo* επαλήθευσαν ότι η ενσωμάτωση και η έκφραση των διαγονιδίων στον τόπο H11 δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα ή τη γονιμότητα του ποντικού. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ο τόπος H11 εμφανίζει υψηλότερο επίπεδο έκφρασης διαγονιδίων και υψηλότερο ποσοστό γενετικού ανασυνδιασμού σε σύγκριση με τον τόπο Rosa26 σε ποντίκια. Τέλος, ο τόπος H11 προτιμάται καθώς δεν περιέχει κανένα υποκινητή, επιτρέποντας έτσι στο γονίδιο που μας ενδιαφέρει να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του δικού του υποκινητή, για παράδειγμα, έναν ιστο-ειδικό υποκινητή που θα κατευθύνει ειδικά την έκφραση του γονιδίου στον ιστό αυτό.

## Κυτταρική σειρά δότη

Η αλληλουχία DNA που θα εισαχθεί στα κύτταρα του δότη θα τους προσδώσει δυο βασικά χαρακτηριστικά. Θα έχουν την ικανότητα να φθορίζουν κόκκινα και να επιβιώνουν μόνο στην καρδιά του εμβρύου, πεθαίνοντας στο υπόλοιπο σώμα.

Η αλληλουχία DNA περιέχει μια κασέτα tdTomato η οποία εκφράζει μια κυτταροπλασματική φθορίζουσα χρωστική, υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG. Ανάμεσα στην tdTomato και στον υποκινητή CAG, παρεμβάλλονται μια κασέτα του γονιδίου GFP (nuclear Enhanced Green Fluorescent Protein), μιας πυρηνικής πράσινης χρωστικής, ακολουθούμενου από το γονίδιο της διφθεροτοξίνης A (dtA) και από ένα σήμα πολυαδενυλώσης (pA). Ακολουθεί μια δεύτερη κασέτα του γονιδίου της ρεκομπινάσης φλιπάσης (FLP) υπό τον έλεγχο του μη ισχυρού υποκινητή E1b και του ενισχυτή του *Nkx2.5*, AR1<sup>110</sup>, όλα αυτά ανάμεσα σε δυο FRT αλληλουχίες ομάλογου ανασυνδιασμού. Ο AR1 είναι το πρώτο ρυθμιστικό στοιχείο του γονιδίου *Nkx2.5* που ενεργοποιείται στο καρδιογενές μεσόδερμα. Εκφράζεται στο πρωτογενές καρδιακό πεδίο από την ημέρα E7.5 και στο δευτερογενές καρδιακό πεδίο από την ημέρα E8.0. Το *Nkx2.5* εκφράζεται επίσης στον αναπτυσσόμενο φάρυγγα, θυρεοειδή και στομάχι, αλλά η έκφραση του εκεί ρυθμίζεται από άλλες ρυθμιστικές περιοχές και όχι από

106 Li, X. et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res* 24, 501–504 (2014).

107 Hippenmeyer, S. et al. Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. *Neuron* 68, 695–709 (2010).

108 Tasic, B. et al. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 7902–7907 (2011).

109 Zhu, F. et al. DICE, an efficient system for iterative genomic editing in human pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 42, e34 (2014).

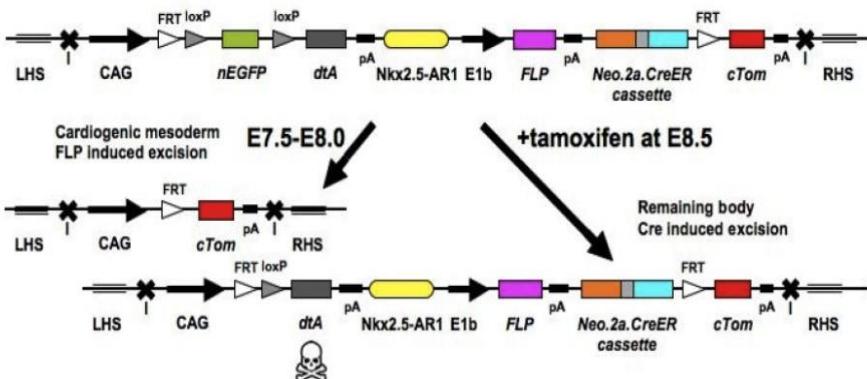
110 Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA and Olson EN. (1999). Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer. *Development* 126, 75-84.

τον AR1<sup>111</sup>. Τέλος, υπάρχει μια τρίτη κασέτα η οποία εκφράζει το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και μια CreER ρεκομπινάση εξαρτώμενη από ταμοξιφένη. Ακριβώς πριν τον CAG υποκινητή και μετά το γονίδιο TdTomato υπάρχουν δύο αλληλουχίες-μονωτές (I-Insulators), οι οποίες απομονώνουν την αλληλουχία από την επίδραση ρυθμιστικών περιοχών του γενετικού τόπου *Hipp11* στον οποίο θα εισαχθεί. Τέλος, εξωτερικά των δύο μονωτών βρίσκονται αλληλουχίες (Left and Right Homologous Sequences – LHS and RHS) ομόλογες των αλληλουχιών που βρίσκονται εκατέρωθεν ενός στόχου του ενζύμου Cas9 στον γενομικό τόπο *Hipp11*.

Η συγκεκριμένη αλληλουχία θα χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση των mESCs μαζί με ένα πλασμίδιο CRISPR το οποίο εκφράζει την νουκλεάση Cas9 και το gRNA το οποίο οδηγεί το ένζυμο σε συγκεκριμένη αλληλουχία στον γενετικό τόπο *Hipp11*. Οι περιοχές LHS και RHS στα άκρα της αλληλουχίας μας θα επιτρέψουν στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, να την εισάγει στο γενετικό τόπο, μέσω του μηχανισμού ομόλογου ανασυνδιασμού. Τα κύτταρα τα οποία θα ενσωματώσουν την αλληλουχία στο γονιδίωμα τους, θα αποκτήσουν ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και θα εκφράζουν στον πυρήνα τους την πράσινη φθορίζουσα χρωστική EGFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή CAG. Η διφθεροτοξίνη A (dtA) δεν θα παραχθεί καθώς το γονίδιο EGFP έχει τοποθετηθεί ανάμεσα στο γονίδιο της dtA και τον υποκινητή CAG και η ρεκομπινάση FLP δεν θα εκφραστεί αφού ο ενισχυτής Nkx2.5-AR1, δεν είναι ενεργός στα βλαστοκύτταρα. Όσον αφορά την κασέτα CreER, αυτή θα παράγει την CreER ρεκομπινάση η οποία όμως είναι ανενεργή απουσία ταμοξιφένης.

Μέχρι την ημέρα E7.5 τα κύτταρα του δότη θα βρίσκονται διάσπαρτα στα χιμαιρικά έμβρυα. Την ημέρα αυτή, ο Nkx2.5-AR1 θα ενεργοποιηθεί και η FLP ρεκομπινάση θα παραχθεί στο πρωτογενές καρδιακό πεδίο, ενώ την ημέρα E8.0 και στο δευτερογενές. Η FLP θα καταλύσει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις δύο FRT αλληλουχίες, αποκόπτοντας όλες τις ενδιάμεσες αλληλουχίες, και αφήνοντας στο καρδιογενές μεσόδερμα κύτταρα δότη που περιέχουν μόνο την κασέτα TdTomato, παράγοντας κόκκινη φθορίζουσα χρωστική. Την ημέρα E8.5, γίνεται προσθήκη ταμοξιφένης οπότε η CreER ρεκομπινάση ενεργοποιείται στα κύτταρα δότη έξω από το καρδιογενές μεσόδερμα και καταλύει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις IoxP περιοχές, αποκόπτοντας το γονίδιο της GFP. Έτσι, ο CAG υποκινητής θα βρεθεί δίπλα από την dtA, ενεργοποιώντας τη και σκοτώνοντας τα κύτταρα αυτά. Τα κύτταρα δότες επιζούν μόνο στο καρδιογενές μεσόδερμα καθώς η dtA έχει απομακρυνθεί με τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στα FRT.

111 Schwartz RJ, Olson EN. Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription. (1999) Development. 126(19):4187-92.



Εικόνα 15: Donor cell line. C. Papanayotou

### Κυτταρική σειρά δέκτη

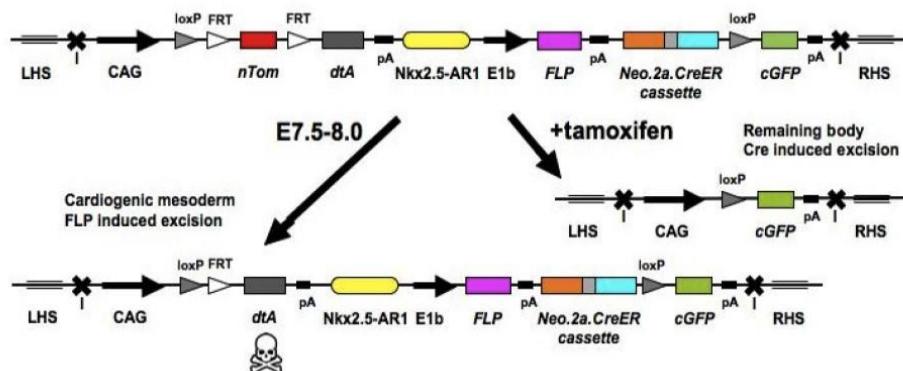
Η αλληλουχία DNA που θα εισαχθεί στα κύτταρα του δέκτη θα τους προσδώσει δυο βασικά χαρακτηριστικά. Θα έχουν την ικανότητα να φθορίζουν πράσινα και να επιβιώνουν σε όλο το σώμα του εμβρύου, πεθαίνοντας στην καρδιά.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία περιέχει μακριά κασέτα EGFP η οποία εκφράζει μια κυτταροπλασματική πράσινη χρωστική, υπό τον έλεγχο του υποκινητή CAG. Ανάμεσά τους παρεμβάλλονται μια κασέτα tdTomato ανάμεσα σε δύο FRT αλληλουχίες, το γονίδιο της διφθεροτοξίνης (dtA) και ένα σήμα πολυαδενυλώσης (pA). Ακολουθεί η κασέτα η οποία εκφράζει την φλιπάση υπό τον έλεγχο του ελάχιστου υποκινητή E1b και του ενισχυτή Nkx2.5-AR1. Τέλος, υπάρχει μια τρίτη κασέτα η οποία εκφράζει το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη και μια CreER ρεκομπινάση εξαρτώμενη από ταμοξιφένη. Οι τρεις κασέτες βρίσκονται ανάμεσα σε δύο FRT αλληλουχίες ομόλογου ανασυνδιασμού. Όπως και στην περίπτωση των κυττάρων-δότη, όλη η αλληλουχία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο αλληλουχίες-μονωτές (Insulators-I) ώστε να προστατεύεται από την επίδραση ρυθμιστικών περιοχών του γενετικού τόπου *Hipp11* στον οποίο θα εισαχθεί. Τέλος, εξωτερικά των δύο μονωτών βρίσκονται αλληλουχίες (Left and Right Homologous Sequences – LHS and RHS) ομόλογες των αλληλουχιών που βρίσκονται εκατέρωθεν ενός στόχου του ενζύμου Cas9 στον γενομικό τόπο *Hipp11*.

Η συγκεκριμένη αλληλουχία θα χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση των mESCs μαζί με ένα πλασμίδιο CRISPR το οποίο εκφράζει την νουκλεάση Cas9 και το gRNA το οποίο οδηγεί το ένζυμο σε συγκεκριμένη αλληλουχία στον γενετικό τόπο *Hipp11*. Οι περιοχές LHS και RHS στα άκρα της αλληλουχίας μας θα επιτρέψουν στον επιδιορθωτικό μηχανισμό του DNA να την εισάγει στο γενετικό τόπο, μέσω του μηχανισμού ομόλογου ανασυνδιασμού. Τα κύτταρα τα οποία θα ενσωματώσουν την αλληλουχία στο γονιδίωμα τους, θα αποκτήσουν ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και θα εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική tdTomato υπό τον έλεγχο του υποκινητή CAG. Η διφθεροτοξίνη A (dtA) δεν θα παραχθεί καθώς το γονίδιο tdTomato έχει τοποθετηθεί ανάμεσα στο γονίδιο της dtA και τον υποκινητή CAG και η ρεκομπινάση FLP δεν θα εκφραστεί αφού ο ενισχυτής Nkx2.5-AR1, δεν είναι ενεργός στα

βλαστοκύτταρα. Όσον αφορά την κασέτα CreER, αυτή θα παράγει την CreER ρεκομπινάση η οποία όμως είναι ανενεργή απουσία ταμοξιφένης.

Μέχρι την ημέρα E7.5 τα κύτταρα του δέκτη θα βρίσκονται διάσπαρτα στα χιμαιρικά έμβρυα. Την ημέρα αυτή, ο *Nkx2.5-AR1* θα ενεργοποιηθεί και η FLP ρεκομπινάση θα παραχθεί στο πρωτογενές καρδιακό πεδίο, ενώ την ημέρα E8.0 στο δευτερογενές. Η FLP θα καταλύσει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις δυο FRT αλληλουχίες, αποκόπτοντας την κασέτα *tdTomato*. Έτσι, ο CAG υποκινητής βρίσκεται δίπλα από την *dtA*, ενεργοποιώντας τη και σκοτώνοντας τα κύτταρα στην καρδιά του εμβρύου. Την ημέρα E8.5 γίνεται προσθήκη ταμοξιφένης οπότε η CreER ρεκομπινάση ενεργοποιείται στα κύτταρα δέκτες που βρίσκονται έξω από το καρδιογενές μεσόδερμα και καταλύει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις *IoxP* περιοχές, αποκόπτοντας όλες τις ενδιάμεσες αλληλουχίες, αφήνοντας μόνο την κασέτα *GFP*. Τα κύτταρα δέκτη επιζούν μόνο στο σώμα του εμβρύου καθώς η *dtA* έχει απομακρυνθεί με τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στα FRT.



Εικόνα 16: Host cell line. C. Papanayotou

### Σχηματισμός χιμαιρικών ζώων

Όταν ολοκληρωθεί η κατασκευή των δυο κυτταρικών σειρών (δότη-δέκτη), τα κύτταρα θα χρησιμοποιηθούν για τον σχηματισμό χιμαιρικών ποντικιών μέσω της τεχνικής της τετραπλοειδικής συσσωμάτωσης. Τετραπλοειδικά έμβρυα στην φάση των 8 κυττάρων θα τοποθετηθούν μαζί με τα mESCs που δημιουργήθηκαν. Μόνο τα mESCs θα μπορέσουν να συνεισφέρουν στο έμβρυο, λόγω της τετραπλοειδίας των υπολοίπων, τα οποία θα συνεισφέρουν στους έξω-εμβρυικούς ιστούς<sup>112</sup>. Έτσι, το αναπτυσσόμενο έμβρυο θα αποτελείται από τις δυο κυτταρικές σειρές που δημιουργήσαμε. Την ημέρα E8.5 θα χορηγηθεί ταμοξιφένη με αποτέλεσμα την επιβίωση των κυττάρων-δότη μόνο στην καρδιά, η οποία έτσι θα φθορίζει κόκκινη, και των κυττάρων-δέκτη σε όλο το υπόλοιπο σώμα εκτός της καρδιάς, το οποίο θα φθορίζει πράσινο.

### Κατασκευή πλασμιδίων ελέγχου (control plasmids)

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η κατασκευή των πλασμιδίων ελέγχου, των πλασμιδίων δηλαδή τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η ενεργότητα του

<sup>112</sup> Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development

Patrick P. L. Tam, Janet Rossant, Development 2003 130: 6155-6163; doi: 10.1242/dev.00893

καρδιακού ενισχυτή AR1 του γονιδίου *Nkx2.5*. Το γονίδιο *Nkx2.5*, θεωρείται ο γνωστότερος και σημαντικότερος δείκτης της καρδιακής γενεαλογίας. Σε μια περιοχή μήκους 23kb γύρω από το γονίδιο *Nkx2.5*, έχουν ταυτοποιηθεί 7 περιοχές που δρουν ως ενεργοποιητές και 3 που δρουν σαν καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης, αλλά κανένας ενισχυτές δεν μπορεί από μόνος του να εξηγήσει το πλήρες πρότυπο έκφρασης του γονιδίου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και μετά τη γέννηση<sup>113</sup>. Ο ενισχυτής AR1, βρίσκεται περίπου 9 kb άνωθεν του γονιδίου και αποτελείται από 2 θετικές ρυθμιστικές περιοχές (Enhancer και Potentiator) με μια ενδιάμεση αρνητική ρυθμιστική περιοχή (Inhibitor)<sup>114</sup>. Αυτός ο ενισχυτής ρυθμίζει την έκφραση του *Csx / Nkx2.5* από τα πρώτα στάδια της καρδιογένεσης μέχρι την καρδιακή αναδίπλωση αλλά στη συνέχεια, η δραστηριότητα του περιορίζεται στη δεξιά κοιλία, αφήνοντας άλλες ρυθμιστικές περιοχές να αναλάβουν την γονιδιακή έκφραση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>115</sup>, η ρυθμιστική περιοχή “Enhancer” είναι ικανή από μόνη της να επάγει την έκφραση του *Nkx2.5* στην καρδιά, ενώ η ρυθμιστική περιοχή του Potentiator δεν έχει αυτόνομη δραστηριότητα. Για τον λόγο αυτό κατασκευάσαμε 2 τύπους πλασμιδίων-ελέγχου. Τα πλασμίδια ελέγχου Cf (Control full) που διαθέτουν ολόκληρο τον ενισχυτή AR1 (Enhancer-Inhibitor -Potentiator), και τα πλασμίδια ελέγχου Ce (Control enhancer) που διαθέτουν μόνο το κομμάτι “Enhancer”. Και στις δυο περιπτώσεις, ο ενισχυτής AR1 ελέγχει την έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής YFP (Yellow Fluorescent Protein). Η YFP (ή Venus) είναι μια κίτρινη φθορίζουσα χρωστική η οποία αποτελεί μετάλλαξη της πράσινης χρωστικής GFP (Green Fluorescent Protein) και πρώτο κυκλοφόρησε το 2002<sup>116</sup>. Εφόσον ο ενισχυτής *Nkx2.5-AR1*, φυσιολογικά δεν είναι ενεργός, παρά μόνο την ημέρα E7.5 στο μορφογενετικό πεδίο της καρδιάς, τα βλαστοκύτταρα τα οποία ενσωματώσουν τα πλασμίδια ελέγχου δεν πρέπει να εκφράζουν την YFP, παρά μόνο όταν διαφοροποιηθούν προς καρδιοκύτταρα.

Η σημασία της μελέτης της ενεργότητας του ενισχυτή είναι μεγάλη, καθώς εάν αυτός εκφράζεται πρόωρα στα βλαστοκύτταρα τα οποία θα επιμολύνουμε αργότερα με τα πλασμίδια του δέκτη, θα ενεργοποιήσει την FLP η οποία θα καταλύσει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις δυο FRT αλληλουχίες, αποκόπτοντας την κασέτα tdTomato. Έτσι, ο CAG υποκινητής θα βρεθεί δίπλα από την dtA, ενεργοποιώντας τη και σκοτώνοντας όσα βλαστοκύτταρα δέκτη το έχουν λάβει, οδηγώντας σε αποτυχία του πειράματος. Για τον λόγο αυτό στο εργαστήριο είχαν αρχικά κατασκευαστεί 2 πλασμίδια ελέγχου, ένα με όλον τον ενισχυτή *Nkx2.5-AR1* (Cf) και ένα μόνο με το κομμάτι του enhancer (Ce), τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

### Πλασμίδιο ελέγχου Cf

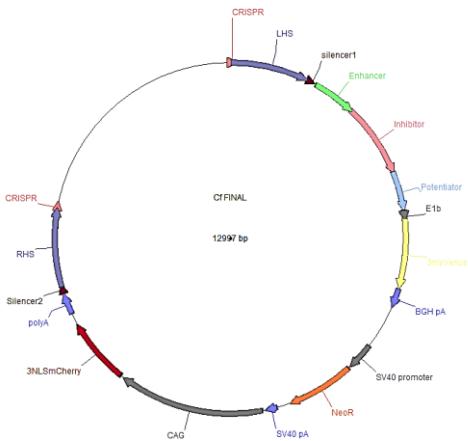
Το πλασμίδιο ελέγχου Cf, είναι ένα πλασμίδιο μήκους 12997bp, το οποίο περιέχει ολόκληρο τον ενισχυτή *Nkx2.5-AR1*.

<sup>113</sup> Schwartz and Olson, Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating *Nkx2-5* transcription. Development. 1999 Oct;126(19):4187-92.

<sup>114</sup> Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN. Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer. Development. 1999;126(1):75-84.

<sup>115</sup> Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN. Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer. Development. 1999;126(1):75-84.

<sup>116</sup> Nagai, T; Ibata, K; Park, E. S.; Kubota, M; Mikoshiba, K; Miyawaki, A (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications". Nature Biotechnology. 20 (1): 87–90. doi:10.1038/nbt0102-87. PMID 11753368.

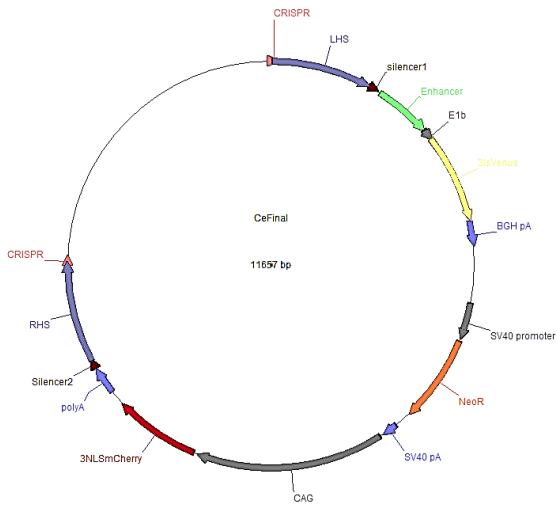


Εικόνα 17: Πλασμίδιο ελέγχου Cf

Το πλασμίδιο διαθέτει στα άκρα του τις περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο Hipp11. Η Cas9 νουκλεάση θα αναγνωρίσει αυτή την αλληλουχία τόσο στο γονιδιώμα, όσο και στο πλασμίδιο και θα κόψει εκεί, αφήνοντας το πλασμίδιο γραμμικό και το γενομικό DNA κομμένο. Δίπλα ακριβώς από τις περιοχές της CRISPR, βρίσκονται οι RHS και LHS (Right Homologous Sequence και Left Homologous Sequence), περιοχές ομολογίας με τα άκρα που έχει δημιουργήσει η πέψη της Cas9 στο γενομικό DNA. Μέσω οιμόλογου ανασυνδιασμού, το γραμμικό πλέον ένθεμα που έχουμε κατασκευάσει, θα τοποθετηθεί στο ακριβές σημείο που θέλουμε στο γενετικό τόπο Hipp11. Ακολουθεί το γονίδιο της φθορίζουσας χρωστικής YFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή E1b συνοδευόμενη από το polyA της, και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή SV40 και το polyA της. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη είναι απαραίτητο ώστε να γίνει η επιλογή των βλαστοκυττάρων που έχουν λάβει το ένθεμα, μετά τη χορήγησης του αντιβιοτικού νεομυκίνη. Στη συνέχεια βρίσκεται το γονίδιο της χρωστικής mCherry υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG, ακολουθούμενο από το σήμα polyA. Το γονίδιο mCherry θα μας επιτρέψει να δούμε τα κύτταρα τα οποία ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο, να φθορίζουν κόκκινα. Τέλος, ακριβώς μετά την αλληλουχία LHS και πριν την RHS, υπάρχουν οι περιοχές Insulators, οι οποίες προστατεύουν την αλληλουχία από την επίδραση ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος.

### Πλασμίδιο ελέγχου Ce

Το πλασμίδιο ελέγχου Ce, είναι ένα πλασμίδιο μήκους 11657bp, στο οποίο βρίσκεται μόνο το κομμάτι του enhancer του ενισχυτή *Nkx2.5-AR1*.



Εικόνα 18: Πλασμίδιο ελέγχου Ce

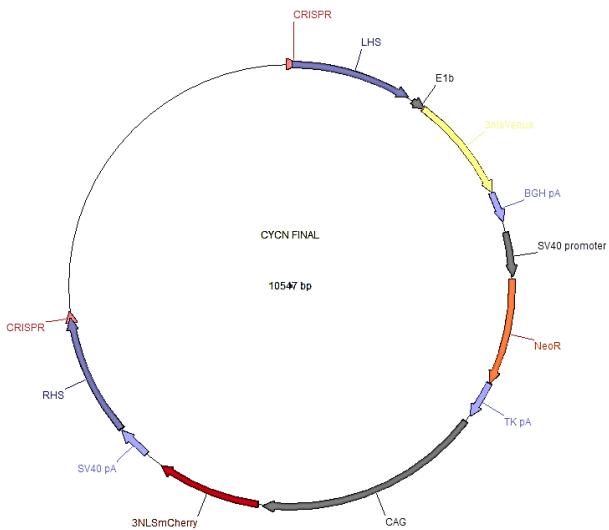
Η βασική κατασκευή του πλασμιδίου Ce, ομοιάζει με αυτή του Cf. Διαθέτει στα άκρα του τις περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο Hipp11 και δίπλα ακριβώς, βρίσκονται οι RHS και LHS. Ακολουθεί το γονίδιο της φθορίζουσας χρωστικής YFP υπό τον έλεγχο του τμήματος του Enhancer του ενισχυτή Nkx2.5-AR1. Ακολουθεί ο υποκινητής E1b και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή SV40. Τέλος, βρίσκεται το γονίδιο της χρωστικής mCherry υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG, ενώ ακριβώς δίπλα από τις LHS και RHS, βρίσκονται οι Insulators.

Τα πλασμίδια αυτά, χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση βλαστοκυττάρων και στη συνέχεια μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με χρήση qPCR και λουσιφεράσης. Βάση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών, φάνηκε απαραίτητη η αφαίρεση των αλληλουχιών των δυο Insulators.

Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκαν νέα πλασμίδια ελέγχου από τα οποία απουσιάζουν πλήρως, οι αλληλουχίες των Insulators. Όπως και τα προηγούμενα, όλα τα πλασμίδια διατηρούν κάποιες κοινές γονιδιακές αλληλουχίες οι οποίες επιτρέπουν την εισαγωγή του πλασμιδίου στο επιθυμητό σημείο του γενετικού τόπου Hipp11(αλληλουχίες CRISPR, LHS, RHS) και την επιλογή των βλαστοκυττάρων που έχουν ενσωματώσει το ένθεμα (κασέτα αντίστασης στη νεομυκίνη). Επιπροσθέτως, θέλοντας να μελετήσουμε εάν η θέση του ενισχυτή παίζει κάποιο ρόλο στην γονιδιακή έκφραση, κατασκευάσαμε πλασμίδια ελέγχου τα οποία διαφέρουν ως προς τη θέση του Nkx2.5-AR1 σε σχέση με το γονίδιο YFP. Τα 5 πλασμίδια ελέγχου, περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

### Πλασμίδιο ελέγχου CYCN

Το πλασμίδιο ελέγχου CYCN, είναι ένα πλασμίδιο μήκους 10547bp, στο οποίο απουσιάζει πλήρως ο ενισχυτής Nkx2.5-AR1.

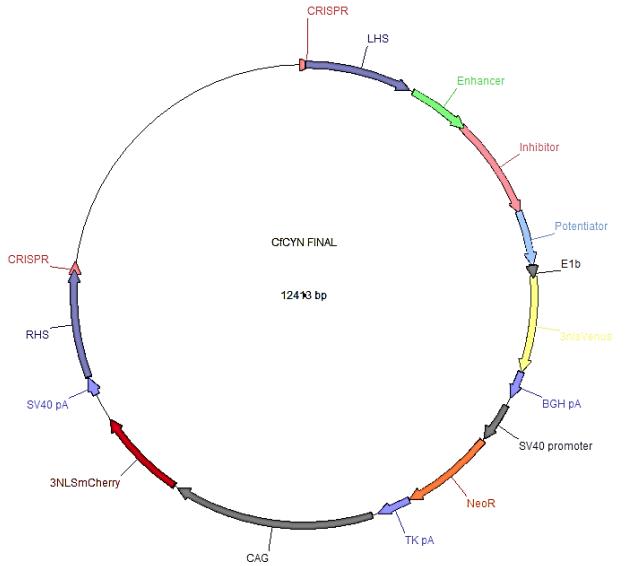


Εικόνα 19: CYCN plasmid

Το πλασμίδιο διαθέτει στα άκρα του τις περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο Hipp11. Η Cas9 νουκλεάση θα αναγνωρίσει αυτή την αλληλουχία τόσο στο γονιδίωμα, όσο και στο πλασμίδιο και θα κόψει εκεί, αφήνοντας το πλασμίδιο γραμμικό και το γενομικό DNA κομμένο. Δίπλα ακριβώς από τις περιοχές της CRISPR, βρίσκονται οι RHS και LHS (Right Homologous Sequence και Left Homologous Sequence), περιοχές ομολογίας με τα άκρα που έχει δημιουργήσει η πέψη της Cas9 στο γενομικό DNA. Μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού, το γραμμικό πλέον ένθεμα που έχουμε κατασκευάσει, θα τοποθετηθεί στο ακριβές σημείο που θέλουμε στο γενετικό τόπο Hipp11. Ακολουθεί το γονίδιο της φθορίζουσας χρωστικής YFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή E1b συνοδευόμενη από το polyA της, και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή SV40 και το polyA της. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη είναι απαραίτητο ώστε να γίνει η επιλογή των βλαστοκυττάρων που έχουν λάβει το ένθεμα, μετά τη χορήγησης του αντιβιοτικού νεομυκίνη. Τέλος, βρίσκεται το γονίδιο της χρωστικής mCherry υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG, ακολουθούμενο από το σήμα polyA. Το γονίδιο mCherry θα μας επιτρέψει να δούμε τα κύτταρα τα οποία ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο, να φθορίζουν κόκκινα.

### Πλασμίδιο ελέγχου CfYCN

Το πλασμίδιο ελέγχου CfYCN, είναι ένα πλασμίδιο μήκους 12413bp, στο οποίο βρίσκεται ολόκληρος ο ενισχυτής Nkx2.5-AR1, τοποθετημένος πριν το γονίδιο της YFP.

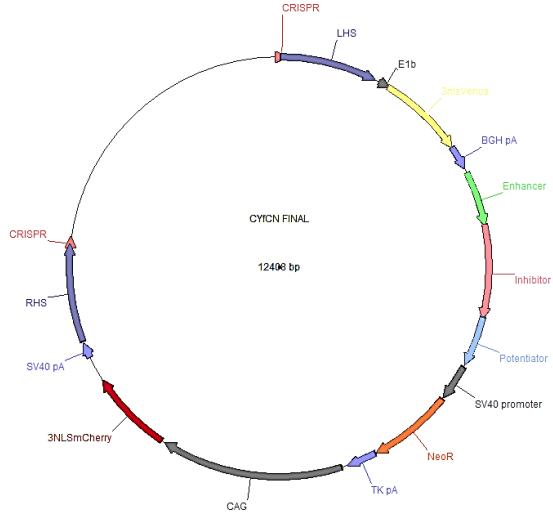


Εικόνα 20: CfYCN plasmid

Η βασική κατασκευή του πλασμιδίου CfYCN, ομοιάζει με αυτή του CYCN. Διαθέτει στα άκρα του τις περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο Hipp11 και δίπλα ακριβώς, βρίσκονται οι RHS και LHS. Ακολουθεί το γονίδιο της φθορίζουσας χρωστικής YFP υπό τον έλεγχο ολόκληρου του ενισχυτή Nkx2.5-AR1 (Enhancer- Inhibitor –Potentiator). Ακολουθεί ο υποκινητής E1b και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή SV40. Τέλος, βρίσκεται το γονίδιο της χρωστικής mCherry υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG.

### Πλασμίδιο ελέγχου CYfCN

Καθώς θέλαμε να εξετάσουμε εάν η θέση του ενισχυτή σχετίζεται με την ενεργότητα του, κατασκευάσαμε το πλασμίδιο ελέγχου CYfCN, ένα πλασμίδιο μήκους 12408bp, στο οποίο βρίσκεται ολόκληρος ο ενισχυτής Nkx2.5-AR1, τοποθετημένος όμως τώρα μετά το γονίδιο της YFP.

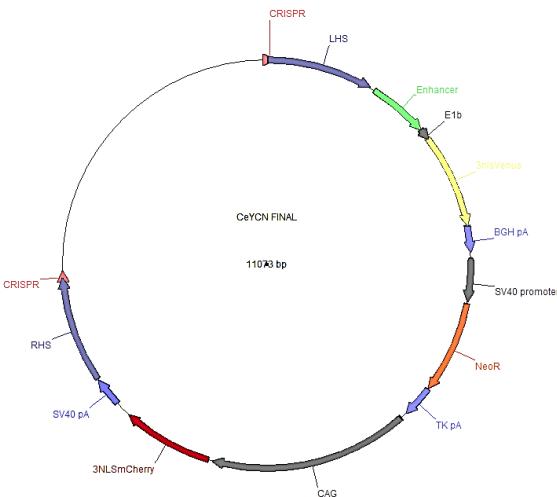


Εικόνα 21:CYfCN plasmid

Η κατασκευή του είναι ακριβώς ίδια με αυτή του CfYCN, με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στη θέση του ενισχυτή, καθώς αυτός τώρα βρίσκεται ακριβώς μετά το polyA σήμα της YFP.

### Πλασμίδιο ελέγχου CeYCN

Το πλασμίδιο ελέγχου CeYCN, είναι ένα πλασμίδιο μήκους 11073bp, στο οποίο βρίσκεται μόνο το κομμάτι του enhancer του ενισχυτή Nkx2.5-AR1, τοποθετημένο πριν το γονίδιο της YFP.



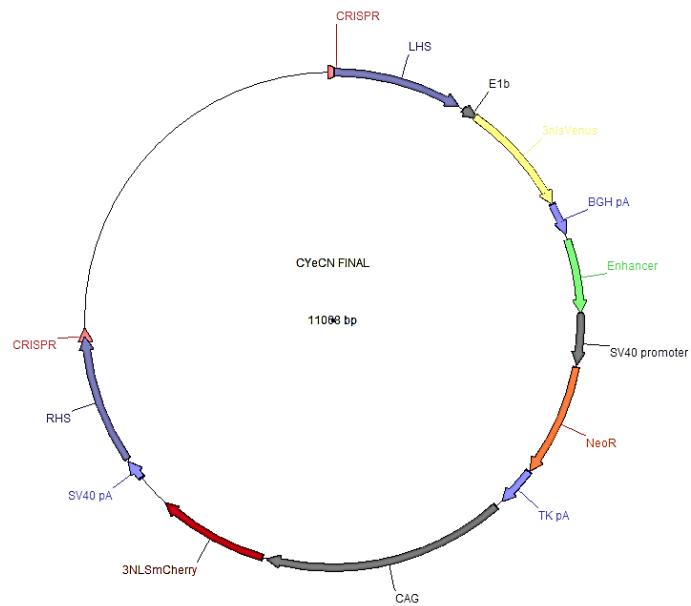
Εικόνα 22: CeYCN plasmid

Η βασική κατασκευή του πλασμιδίου CeYCN, ομοιάζει με αυτή των άλλων πλασμιδίων. Διαθέτει στα άκρα του τις περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο Hipp11 και δίπλα ακριβώς, βρίσκονται οι RHS και LHS. Ακολουθεί το γονίδιο της φθορίζουσας χρωστικής YFP υπό τον έλεγχο του τμήματος του Enhancer του ενισχυτή Nkx2.5-AR1. Ακολουθεί ο υποκινητής E1b και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του ισχυρού

υποκινητή SV40. Τέλος, βρίσκεται το γονίδιο της χρωστικής mCherry υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG.

### Πλασμίδιο ελέγχου CYeCN

Στην προσπάθεια μας να εξετάσουμε εάν η θέση του ενισχυτή σχετίζεται με την ενεργότητα του, κατασκευάσαμε και το πλασμίδιο ελέγχου CYeCN, ένα πλασμίδιο μήκους 11068bp, στο οποίο βρίσκεται το κομμάτι του enhancer του ενισχυτή Nkx2.5-AR1, τοποθετημένο όμως τώρα μετά το γονίδιο της YFP.

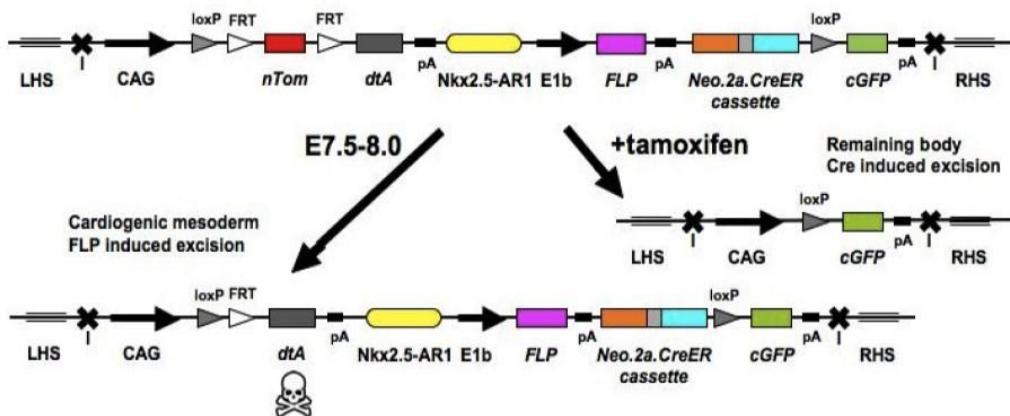


Εικόνα 23: CYeCN plasmid

Η κατασκευή του είναι ακριβώς ίδια με αυτή του CeYCN, με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στη θέση του ενισχυτή, καθώς αυτός τώρα βρίσκεται ακριβώς μετά το polyA σήμα της YFP.

# ΣΚΟΠÓΣ

Μεγάλη μερίδα της επιστημονικής κοινότητας, προσπαθώντας να λύσει το πρόβλημα της ανεπάρκειας οργάνων για μεταμοσχεύσεις, έχει καταφέρει να δημιουργήσει *in vivo* διάφορους ιστούς και όργανα, κάνοντας χρήση της τεχνικής της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης. Στα πλαίσια της προσπάθειας της ερευνητικής ομάδας του Κ. Παπαναγιώτου να σχηματίσει αλλογενή καρδιά σε ποντίκια, προτείνεται –αντί της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης– να χρησιμοποιηθούν δύο γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές εμβρυικών βλαστικών κυττάρων εκ των οποίων η μία θα συνεισφέρει σε καρδιακούς ιστούς και η άλλη σε μη καρδιακούς ιστούς στο αναπτυσσόμενο χιμαιρικό έμβρυο. Για να δημιουργηθούν οι δυο αυτές κυτταρικές σειρές, θα κατασκευαστεί εργαστηριακά από μια αλληλουχία DNA, η οποία θα εισαχθεί με τη μέθοδο CRISPR στο γενετικό τόπο *Hip11* του γονιδιώματος των mESC (αλληλουχία-δότη και αλληλουχία-δέκτη). Το *Nkx2.5* είναι ο πρώτος γνωστός δείκτης της καρδιακής γενεαλογίας, ενώ ο AR1 είναι το πρώτο ρυθμιστικό στοιχείο του γονιδίου *Nkx2.5* που ενεργοποιείται στο καρδιογενές μεσόδερμα την ημέρα E7.5. Και οι δύο αλληλουχίες που θα δημιουργηθούν θα εμπεριέχουν τον ενισχυτή του *Nkx2.5*, AR1. Είναι πολύ σημαντικό για την πειραματική διαδικασία να μην υπάρχει έκφραση του AR1 νωρίτερα από το φυσιολογικό δηλαδή την ημέρα E7.5. Εάν ο AR1 είναι ενεργός νωρίτερα, τότε στα κύτταρα δέκτη θα πυροδοτήσει την παραγωγή της FLP, η οποία θα καταλύσει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις δυο FRT αλληλουχίες, αποκόπτοντας την κασέτα *tdTomato*. Έτσι, ο CAG υποκινητής θα βρεθεί δίπλα από την *dtA*, ενεργοποιώντας τη και σκοτώνοντας τα κύτταρα που θα λάβουν την αλληλουχία-δέκτη, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 24: Host cell line. C. Papanayotou

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η κατασκευή των πλασμιδίων ελέγχου, των πλασμιδίων δηλαδή τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η ενεργότητα του καρδιακού ενισχυτή AR1 του γονιδίου *Nkx2.5*.

# Μέθοδοι & υλικά

---

## I. Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας

Κατασκευάστηκαν σειρές πλασμιδίων με μεθόδους μοριακής κλωνοποίησης και η ορθότητα της αλληλουχίας τους ελέγχθηκε με διαγνωστικές πέψεις με το ένζυμο περιορισμού *PstI*. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για διαμόλυνση εμβρυικών βλαστοκυττάρων ποντικών (mESCs). Τα βλαστοκύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν για όσο ήταν απαραίτητο, συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης με χρήση των τεχνικών της Real-Time PCR και της δοκιμής Λουσιφεράσης. Πιο αναλυτικά:

- Για τις ανάγκες του πειράματος Λουσιφεράσης, χρειάστηκε να κατασκευαστούν 6 πλασμίδια, κάθε ένα από τα οποία θα μας βοηθούσε να μελετήσουμε την ενεργότητα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου.
- Στη συνέχεια, χρειάστηκε να κατασκευαστούν 5 πλασμίδια ελέγχου για να μελετηθεί η ενεργότητα του καρδιακού ενισχυτή AR1 του γονιδίου Nkx2.5. Τα πλασμίδια ελέγχου Cf (Control full) διαθέτουν ολόκληρο τον ενισχυτή AR1 (Enhancer- Inhibitor -Potentiator), και τα πλασμίδια ελέγχου Ce (Control enhancer) διαθέτουν μόνο το κομμάτι “Enhancer”. Επιπλέον, θέλοντας να μελετήσουμε εάν η θέση του ενισχυτή παίζει κάποιο ρόλο στην γονιδιακή έκφραση, κατασκευάσαμε πλασμίδια ελέγχου τα οποία διαφέρουν ως προς τη θέση του Nkx2.5-AR1 σε σχέση με το γονίδιο YFP. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο ενισχυτής AR1 ελέγχει την έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής YFP (Yellow Fluorescent Protein), την οποία θα ποσοτικοποιήσουμε με την τεχνική της Real-Time PCR.

Παρακάτω, αναλύεται λεπτομερώς η πειραματική διαδικασία καθώς και τα ακριβή βήματα που ακολουθήθηκαν ώστε να κατασκευαστούν τα πλασμίδια που προαναφέρθηκαν.

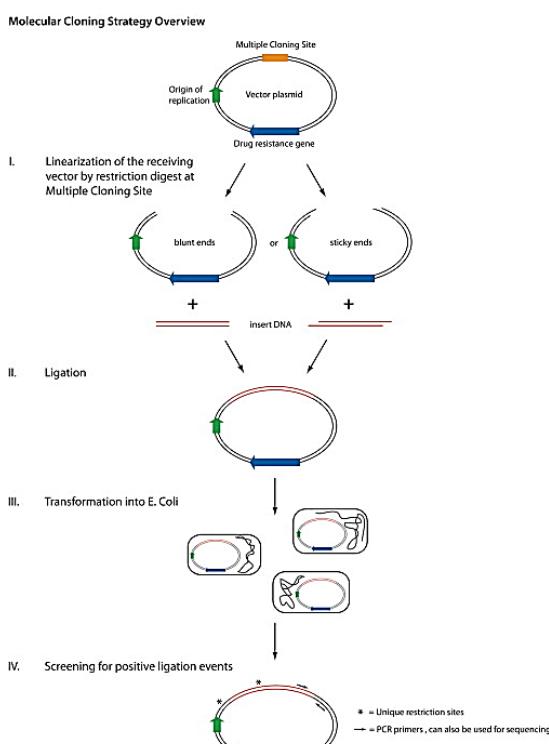
## II. Γενικό μέρος

### Τεχνικές μοριακής βιολογίας

#### Μοριακή κλωνοποίηση

Η μοριακή κλωνοποίηση είναι ένα σύνολο πειραματικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA και για τον πολλαπλασιασμό τους μέσα σε οργανισμούς-ξενιστές<sup>117</sup>. Η χρήση της λέξης κλωνοποίηση αναφέρεται στο γεγονός ότι η μέθοδος περιλαμβάνει την αντιγραφή ενός μορίου για την παραγωγή ενός πληθυσμού κυττάρων με ταυτόσημα μόρια DNA. Η μοριακή κλωνοποίηση γενικά χρησιμοποιεί αλληλουχίες DNA από δύο διαφορετικούς οργανισμούς: το είδος που είναι η πηγή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί, και τα είδη που θα χρησιμεύσουν ως ξενιστές για την αντιγραφή του ανασυνδυασμένου DNA.

Τα στάδιά της περιλαμβάνουν την κατασκευή του φορέα και των ένθετων τμημάτων DNA, την σύνδεση του ενθέματος στον φορέα, τον μετασχηματισμό βακτηρίων E. Coli και την ταυτοποίηση των θετικών κλώνων.



Εικόνα 25: Τα βασικά στάδια της Μοριακής Κλωνοποίησης. Juliane C. Lessard, in Methods in Enzymology, 2013

Τα περισσότερα από αυτά τα ένθετα τμήματα DNA δημιουργούνται είτε με πέψη ενός υπάρχοντος μορίου DNA με ένζυμα περιορισμού είτε με πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA με PCR. Τα μικρά ένθετα ~ 100 bp μπορούν επίσης να συντεθούν εμπορικά. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο περιλαμβάνουν διάφορα βασικά χαρακτηριστικά: μια θέση έναρξης τη αντιγραφής, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε

<sup>117</sup> Watson JD (2007). Recombinant DNA: genes and genomes: a short course. San Francisco: W.H. Freeman. ISBN 978-0-7167-2866-5.

αντιβιοτικό και μοναδικές θέσεις περιορισμού για να διευκολυνθεί η εισαγωγή θραυσμάτων DNA.

Μετά την επιτυχή απομόνωση, το DNA-στόχος συνδέεται σε έναν πλασμιδιακό φορέα, ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, και στη συνέχεια το ανασυνδυασμένο πλέον πλασμίδιο εισέρχεται σε βακτηριακά στελέχη E. Coli, μια διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού ώστε να γίνει τελικά η επιλογή των θετικών κλώνων.

Παρόλο που ο σχεδιασμός της κλωνοποίησης μπορεί να γίνει με λεπτομέρεια σε οποιονδήποτε επεξεργαστή κειμένου, υπάρχει ειδικό λογισμικό για το σκοπό αυτό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το ApE, το DNAStrider, το Serial Cloner και το Collagene. Στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ApE.

#### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η τεχνική της PCR αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, χαρίζοντας του μάλιστα το Νόμπελ Χημείας 10 χρόνια αργότερα. Πρόκειται για μια οικονομική, απλή και αξιόπιστη τεχνική η οποία μιμείται την διαδικασία αντιγραφής του DNA παράγοντας *in vitro* πολυαριθμα αντίγραφα μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Έχει βρει πληθώρα εφαρμογών όπως για παράδειγμα στον προγεννητικό έλεγχο, το τεστ πατρότητας, στην κλωνοποίηση γονιδίων, στο γενετικό αποτύπωμα<sup>118</sup>.

Για να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη περιοχή DNA με την μέθοδο της PCR, αρκεί να είναι γνωστές οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στα άκρα της. Βάση αυτών, ο εκάστοτε ερευνητής θα σχεδιάσει ολιγονουκλεοτιδικά μόρια τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers) και είναι αυτά που θα διαμεσολαβήσουν την εκκίνηση της διαδικασίας σύνθεσης και θα οριοθετήσουν την περιοχή που θα ενισχυθεί. Ιδιαίτερα χρήσιμο είναι το γεγονός ότι στο 5' άκρο των εκκινητών μπορούν να προστεθούν αλληλουχίες ειδικού ενδιαφέροντος, όπως στόχοι περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Η πραγματοποίησης μιας αντίδρασης PCR απαιτεί ένα υπόστρωμα DNA το οποίο θα λειτουργήσει ως μήτρα για την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε, τους δυο εκκινητές, ένα μείγμα ελεύθερων τριφοσφωρικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), την DNA πολυμεράση καθώς και ιόντα Mg<sup>2+</sup> τα οποία είναι απαραίτητα για να δράσει το ένζυμο και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο ρυθμίζει το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης<sup>119</sup>. Η DNA πολυμεράση που τυπικά χρησιμοποιείται στην PCR ονομάζεται Ταq πολυμεράση, όνομα που προκύπτει από το θερμοανθεκτικό βακτήριο από το οποίο απομονώθηκε (*Thermus aquaticus*).

Το πρώτο στάδιο της PCR περιλαμβάνει θέρμανση της αντίδρασης στους 95°C για 35-40'' ώστε να αποδιαταχθούν οι δύο έλικες του DNA (φάση αποδιάταξης-denaturation). Ακολουθεί ψύξη της αντίδρασης στους 50-65°C για περίπου 1' ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στο 3' άκρο της συμπληρωματικής τους αλυσίδας DNA (φάση

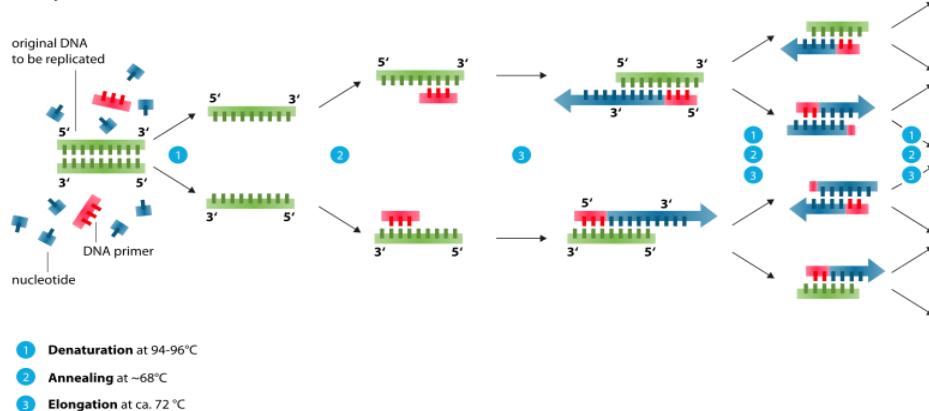
<sup>118</sup> "PCR". Genetic Science Learning Center, University of Utah.

<sup>119</sup> Joseph Sambrook & David W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-879-69576-7. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction

υβριδοποίησης-annealing). Η θερμοκρασία και ο χρόνος της φάσης αυτής, εξαρτώνται από το μήκος, την αλληλουχία και τη συγκέντρωση του ζεύγους των εκκινητών. Συνήθως, η θερμοκρασία υβριδοποίησης που χρησιμοποιούμε είναι 5°C χαμηλότερη από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών ( $T_m$ )<sup>120</sup>. Γενικά, όσο υψηλότερη θερμοκρασία χρησιμοποιούμε, τόσο πιο ειδικό είναι το τελικό προϊόν. Ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C για 0,5-2' και η DNA πολυμεράση αφού προσδεθεί στους εκκινητές, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA με κατεύθυνση 5'-3' (φάση επιμήκυνσης/σύνθεσης-elongation/extension). Η θερμοκρασία των 72°C είναι αυτή στην οποία η συγκεκριμένη πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα, ενώ ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου. Στο τέλος αυτής της φάσης, θεωρητικά, πρέπει να έχουμε διπλάσιο αριθμό μορίων DNA σε σχέση με την αρχή. Οι 3 παραπάνω φάσεις, επαναλαμβάνονται για περίπου 25-35 κύκλους, ώστε τελικά να παραχθεί αρκετή ποσότητα από την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει.

Μετά τον δεύτερο κύκλο της αντίδρασης έχουν παραχθεί 4 μόρια DNA τα οποία εκτός από την περιοχή που μας ενδιαφέρει, περιέχουν και γειτονικές της. Τα 2 πρώτα τμήματα DNA που περιέχουν αποκλειστικά την προς ενίσχυση περιοχή, προκύπτουν μετά από τον 3<sup>o</sup> κύκλο της αντίδρασης. Από εκεί και έπειτα ο αριθμός αυτών των μορίων αυξάνεται εκθετικά με αποτέλεσμα στο τέλος της αντίδρασης να έχουμε εκατομμύρια αντίγραφα της περιοχής μας. Ο αριθμός των μορίων DNA ( $\chi$ ), που έχουμε στο μείγμα της αντίδρασης μετά από κάθε κύκλο, μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση  $\chi=2^n$  όπου  $n$  είναι ο αριθμός των κύκλων της PCR.

#### Polymerase chain reaction - PCR



Εικόνα 26: τα στάδια της PCR.[https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

<sup>120</sup> Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro". Nucleic Acids Res. 18 (21): 6409–6412. doi:10.1093/nar/18.21.6409. PMC 332522. PMID 2243783.

Η αντίδραση της PCR ετοιμάζεται στον πάγο ως εξής:

5X KAPA HiFi Buffer	5λ
10 mM KAPA dNTP Mix	0.75λ
10 μM Forward Primer	0.75λ
10 μM Reverse Primer	0.75λ
Template DNA	όσο απαιτείται *
1 U/μL KAPA HiFi DNA Polymerase	0.5λ
PCR-grade water	έως 25λ
Τελικός όγκος	25λ

\*για γενομικό DNA συστήνεται η χρήση 10-100ng, ενώ για λιγότερο περίπλοκα μόρια DNA (π.χ. πλασμίδιο) 0.1-1ng είναι αρκετό.

Αφού ετοιμαστεί η αντίδραση, μεταφέρεται σε προ θερμασμένο κυκλοποιητή (95°C), υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

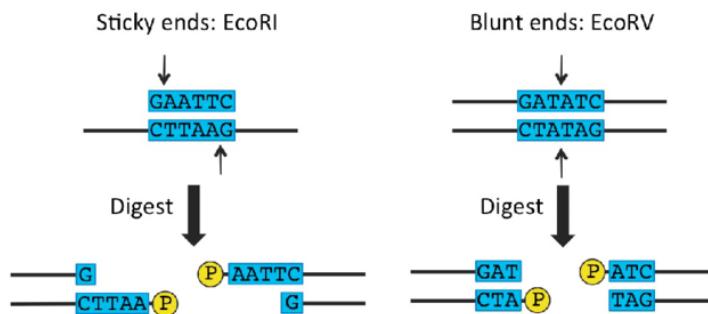
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min.	1 κύκλος
Αποδιάταξη	98°C	20 sec.	15-35 κύκλοι
Υβριδοποίηση	60-75°C	15sec.	15-35 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	15-60sec/kb	15-35 κύκλοι
Τελική επιμήκυνση	72°C	1min/kb	1 κύκλος

Σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκε το Kapa Hifi PCR Kit από την Roche. Η συγκεκριμένη πολυμεράση, ανήκει στην κατηγορία των proofreading πολυμερασών, μπορεί δηλαδή να ελέγχει κάθε νουκλεοτίδιο που τοποθετεί και να απομακρύνει τα λάθος ενσωματωμένα νουκλεοτίδια από το άκρο του εκκινητή πριν από την περαιτέρω επέκταση του.

#### Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι βακτηριακά ένζυμα που διασπούν το δίκλωνo DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες-στόχους (θέσεις περιορισμού), παράγοντας έτσι καθορισμένου μεγέθους θραύσματα. Η θέση αναγνώρισης για τα περισσότερα από τα κοινώς χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι μια βραχεία παλίνδρομη ακολουθία (δηλαδή η ίδια αλληλουχία νουκλεοτίδιων με κατεύθυνση 5'-3' και στις 2 αλυσίδες), συνήθως μήκους 4 έως 12 bp. Κάθε ένζυμο κόβει το παλίνδρομο σε μια συγκεκριμένη θέση και δύο διαφορετικά ένζυμα μπορεί να έχουν την ίδια ακολουθία αναγνώρισης, αλλά να διασπούν το DNA σε διαφορετικά σημεία μέσα στην αλληλουχία. Ανάλογα με τη θέση την οποία αναγνωρίζει και πέπτει το εκάστοτε ένζυμο, μπορούν να παραχθούν μόρια DNA με τυφλά άκρα ή με προεξέχοντα (κολλώδη) 5' ή 3' άκρα<sup>121</sup>. Μετά από πέψη περιορισμού, το DNA μπορεί στη αναλυθεί χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

<sup>121</sup> Smith D.R. (1993) Restriction Endonuclease Digestion of DNA. In: Murphy D., Carter D.A. (eds) Transgenesis Techniques. Methods in Molecular Biology™, vol 18. Humana Press



Εικόνα 27: Bertero, Alessandro & Brown, Stephanie & Vallier, Ludovic. (2017). Methods of Cloning. 10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3.

Το σύνηθες πρωτόκολλο για μια πέψη με περιοριστικά ένζυμα είναι το εξής:

Περιοριστικό ένζυμο	0.5λ
DNA	όσο απαιτείται*
10X NEBuffer**	1λ (1X)
H <sub>2</sub> O	έως 10λ
Τελικός όγκος αντίδρασης	10λ

\*συνήθως χρησιμοποιείται ~1.5γ DNA

\*\*Ανάλογα με το ένζυμο που θα χρησιμοποιηθεί, θα χρειαστεί το ανάλογο buffer. Τα πιο συνηθισμένα NEBuffers είναι το CutSmart και το 3.1. Άλλες εταιρίες έχουν δικά τους ρυθμιστικά.

Η αντίδραση στη συνέχεια επωάζεται στην κατάλληλη για το ένζυμο θερμοκρασία (συνήθως 37°C) για όσο χρόνο απαιτεί το εκάστοτε πρωτόκολλο. Συνήθως οι μονές πέψεις επωάζονται για 30-60', ενώ η χρήση περισσότερων περιοριστικών ένζυμων αυξάνει το χρόνο επώασης.

### Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεΐνων. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων και γι' αυτό τα μόρια DNA που ηλεκτροφορούνται, κινούνται προς την κάθοδο. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα μεγαλύτερα μόρια είναι δυσκολότερο να διέλθουν από τους πόρους του πηκτώματος και επομένως μετακινούνται βραδύτερα. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρωστικές (π.χ. βρωμιούχο αιθίδιο) που φθορίζουν στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η χρήση πηκτώματος αγαρόζης επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους έως 25 kb, ανάλογα με την συγκέντρωση του τζελ-όσο υψηλότερη η συγκέντρωση του πηκτώματος, τόσο πιο εύκολα διαχωρίζονται μόρια DNA μικρότερου μήκους. Ταυτόχρονα με το προς εξέταση δείγμα "τρέχουμε" σε διπλανό πηγαδάκι ένα δείγμα-μάρτυρα το οποίο περιέχει ζώνες γνωστού μοριακού βάρους. Το μέγεθος του

δείγματος αντιστοιχίζεται με τη ζώνη του μάρτυρα που βρίσκεται στο ίδιο ύψος, και έτσι μπορεί να εκτιμηθεί<sup>122</sup>.

Για την παρασκευή 1% gel αγαρόζης χρησιμοποιούνται:

- 1gr αγαρόζης (Sigma-Aldrich)
- 20ml 5% TBE
- 80ml ddH<sub>2</sub>O
- 5λ βρωμιούχο αιθίδιο

Για την παρασκευή 1L Buffer ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται:

- 200ml 5% TBE
- 800ml ddH<sub>2</sub>O
- 20λ βρωμιούχο αιθίδιο

Για την παρασκευή 2L 5X TBE χρησιμοποιούνται:

- 108gr Tris
- 55gr Boric Acid
- 7.45gr EDTA

**Ένωση τμημάτων DNA (Ligation)**

Στη μοριακή βιολογία, η ένωση δύο θραυσμάτων νουκλεϊκού οξέος επιτελείται μέσω της δράσης ενός ενζύμου που ονομάζεται λιγάση. Πρόκειται για μια βασική εργαστηριακή διαδικασία στη μοριακή κλωνοποίηση, η οποία διασαφηνίστηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο του I. Robert Lehman<sup>123 124</sup>. Κατά την διαδικασία αυτή, θραύσματα DNA συνδέονται μεταξύ τους για να δημιουργήσουν μόρια ανασυνδυασμένου DNA, όπως για παράδειγμα όταν ένα τμήμα DNA εισάγεται σε ένα πλασμίδιο. Τα άκρα των τμημάτων DNA συνδέονται μεταξύ τους με το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3'-υδροξυλίου του ενός με την 5'-φωσφορική ομάδα του άλλου. Ως πηγή ενέργειας στα ζώα και τους βακτηριοφάγους, χρησιμοποιείται η ATP, ενώ στα βακτήρια χρησιμοποιείται NAD<sup>+</sup><sup>125</sup>. Τόσο το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται ως φορέας, όσο και το τμήμα DNA που θέλουμε να του εισάγουμε, έχουν κοπεί με τον ίδιο συνδυασμό ενζύμων, αφήνοντας συμπληρωματικά (κολλώδη) ή τυφλά άκρα. Στην περίπτωση που τα άκρα είναι κολλώδη, η διαδικασία της ένωσης είναι εύκολη και αποτελεσματική. Εντούτοις, στη σύνδεση των τυφλών άκρων, η διαδικασία εξαρτάται από την τυχαία σύγκρουση ώστε τα άκρα να ευθυγραμμιστούν πριν να μπορούν να συνδεθούν και ως εκ τούτου είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική<sup>126</sup>. Η δημοφιλέστερη επιλογή στο εργαστήριο, είναι η T4 DNA λιγάση (προέρχεται από τον

<sup>122</sup> D. Voytas, "Agarose gel electrophoresis," in Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 2001. doi: 10.1002/0471142727.mb0205as51.

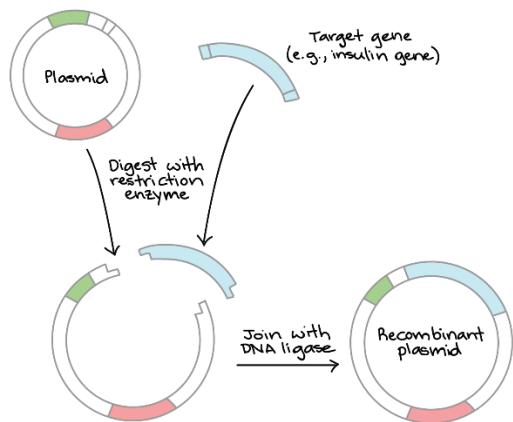
<sup>123</sup> Nicole Kresge, Robert D. Simoni and Robert L. Hill (January 12, 2007). "Insights into DNA Joining: I. Robert Lehman's Work on DNA Ligase". The Journal of Biological Chemistry. 282

<sup>124</sup> Modorich P, Lehman IR (10 November 1973). "Deoxyribonucleic acid ligase. A steady state kinetic analysis of the reaction catalyzed by the enzyme from Escherichia coli" (PDF). J Biol Chem. 248 (21): 7502–11. PMID 4355585.

<sup>125</sup> Lubert Stryer. Biochemistry (3rd ed.). Freeman. pp. 658–659

<sup>126</sup> Venetia A. Saunders (6 December 2012). Microbial genetics applied to biotechnology: principles and techniques of Gene Transfer and Manipulation. Springer. ISBN 9781461597964.

βακτηριοφάγο T4), η οποία είναι ικανή να ενώσει τυφλά άκρα μορίων DNA<sup>127</sup>. Η λιγάση που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν η T4 DNA ligase από τη New England Biolabs (NEB), και η αναλογία vector/insert ήταν κατά κανόνα 1/3.



Εικόνα 28: <https://socratic.org/questions/how-are-restriction-and-dna-ligase-enzymes-used-to-insert-a-foreign-gene-into-a>

Για μια τυπική αντίδραση λιγάσης εφαρμόζεται το εξής πρωτόκολλο:

T4 DNA Ligase Reaction Buffer 10X	1λ
Vector DNA	~25ng
Insert DNA*	~25ng
T4 DNA Ligase	0.5λ
ddH <sub>2</sub> O	έως 10λ
Τελικός όγκος	10λ

\*για τον ακριβή υπολογισμό της ποσότητας του vector DNA, χρησιμοποιείται το NEBiocalculator. Η αναλογία μορίων vector DNA/insert DNA που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι 1/3.

Εάν τα τμήματα DNA που θέλουμε να ενώσουμε έχουν κολλώδη άκρα, η αντίδραση της λιγάσης διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60'. Εάν τα άκρα είναι τυφλά, διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 h ή στους 16°C overnight.

#### Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation)

Επόμενο βήμα στη διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης, είναι ο μετασχηματισμός βακτηρίων, μια διαδικασία οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, με την οποία ορισμένα βακτήρια καταλαμβάνουν ξένο γενετικό υλικό από το περιβάλλον. Η διαδικασία, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1928, σε πειράματα του Griffith, σε Streptococcus pneumoniae<sup>128</sup> και επιβεβαιώθηκε το 1944 στο πείραμα των Oswald Avery, Colin MacLeod και Maclyn McCarty<sup>129</sup>. Η διαδικασία του μετασχηματισμού έχει ως εξής: ειδικά για μετασχηματισμό βακτήρια αναμιγνύονται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που θέλουμε να ενσωματώσουν σε αναλογία όγκου 10:1. Ακολουθεί παραμονή του μείγματος στον πάγο για τουλάχιστον 30 λεπτά, ώστε το ξένο γενετικό υλικό να επικαθίσει πάνω στα βακτήρια.

<sup>127</sup> Robert W. Old; Sandy B. Primrose (1994-09-27). Principle of Gene Manipulation - An Introduction to Genetic Engineering (5th ed.). Blackwell Scientific. p. 37. ISBN 9780632037124

<sup>128</sup> J Hyg (Lond). 1928 Jan;27(2):113-59. The Significance of Pneumococcal Types. Griffith F.

<sup>129</sup> Avery, Oswald T.; Colin M. MacLeod; Maclyn McCarty (1944-02-01). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III". Journal of Experimental Medicine. 79 (2): 137–158. doi:10.1084/jem.79.2.137. PMC 2135445. PMID 19871359.

Ακολούθως, τα βακτήρια υποβάλλονται σε θερμικό σοκ (heat shock), επώαση δηλαδή στους 42°C για 45''<sup>130</sup>. Αυτό, κάνει τη μεμβράνη τους διαπερατή, και το πλασμίδιο εισέρχεται μέσα στα βακτήρια. Στη συνέχεια, τα βακτήρια παραμένουν άλλα 5 λεπτά στον πάγο, ώστε η μεμβράνη να επανέλθει στην αρχική κατάσταση και έπειτα πολλαπλασιάζονται για περίπου 45 λεπτά στους 37°C, παρουσία θρεπτικού υλικού LB. Τέλος, τα βακτήρια απλώνονται σε πιάτα LB agar τα οποία περιέχουν θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικό και αφήνονται να μεγαλώσουν όλο το βράδυ στους 32-37°C, ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε.

Για την κατασκευή των πιάτων, αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα LB agar με το εξής πρωτόκολλο (για 1l) :

- 10g tryptone
- 5g yeast extract
- 10g NaCl
- 1L ddH<sub>2</sub>O
- 15g agar

Το διάλυμα αποστειρώνεται και στη συνέχεια προστίθεται 1ml αμπικιλίνη. Ακολούθως μοιράζεται σε ειδικά πιάτα τα οποία αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου το θρεπτικό πήξει.

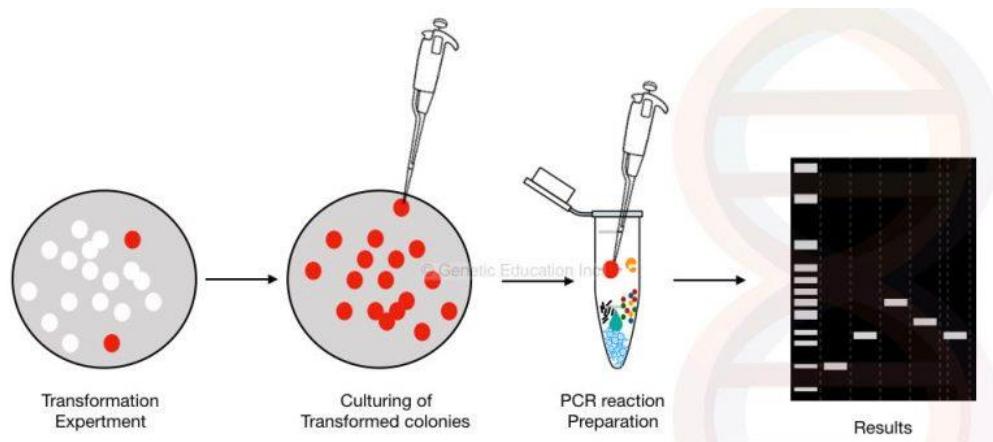
Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση περιέχουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Έτσι, καθώς τα βακτήρια τοποθετούνται σε ένα πιάτο παρουσία αντιβιοτικού, αυτά τα οποία έλαβαν το πλασμίδιο, θα επιζήσουν, ενώ βακτήρια χωρίς πλασμίδιο θα πεθάνουν. Κάθε βακτήριο που έχει λάβει ένα πλασμίδιο δημιουργεί μια συστάδα πανομοιότυπων βακτηρίων που περιέχουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο και ονομάζεται αποικία<sup>131</sup>. Την επόμενη μέρα, οι αποικίες ελέγχονται για να φανεί εάν έλαβαν το σωστό πλασμίδιο, συνήθως με χρήση colony PCR.

### Colony PCR

Η colony PCR είναι μια τροποποίηση της συμβατικής PCR κατά την οποία οι βακτηριακές αποικίες χρησιμοποιούνται απευθείας ως υπόστρωμα (εικ.5). Άλληλουχίες που βρίσκονται στο πλασμίδιο που περιέχει η βακτηριακή αποικία μπορούν να ενισχυθούν χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών. Οι ενδιάμεσοι ειδικοί εκκινητές ενισχύουν την αλληλουχία που έχει εισαχθεί στο πλασμίδιο, και οι πλευρικοί εκκινητές ειδικοί για τον πλασμιδιακό φορέα, το DNA στις πλευρικές περιοχές του ενθέτου. Μια βακτηριακή αποικία συλλέγεται και προστίθεται απευθείας στο mastermix που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια της PCR. Με την προσθήκη ενός αρχικού σταδίου θέρμανσης στην PCR, τα βακτηριακά τοιχώματα σπάνε και το πλασμιδιακό DNA εξέρχεται από το κύτταρο και ενισχύεται στην αντίδραση. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα Colony PCR είναι η Taq DNA πολυμεράση από New England Biolabs (NEB).

<sup>130</sup> Bacterial transformation: The heat shock method. (2016). In (2016). In JoVE science education database. Retrieved from <http://www.jove.com/science-education/5059/bacterial-transformation-the-heat-shock-method>.

<sup>131</sup> Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). DNA tools and biotechnology. In Campbell biology (10th ed., pp. 408-435). San Francisco, CA: Pearson.



Εικόνα 29: <http://geneticeducation.co.in/what-is-colony-pcr/>

Για μια Colony PCR με το πρωτόκολλο της Taq DNA polymerase, χρησιμοποιούνται:

10X ThermoPol Reaction Buffer	2.5λ
10mM dNTPs	0.5λ
10μM Forward primer	0.5λ
10μM Reverse primer	0.5λ
Template DNA	Colony
Taq DNA Polymerase	0.125λ
ddH <sub>2</sub> O	έως 25λ
Τελικός όγκος	25λ

Η παραπάνω αντίδραση, εισάγεται σε προ θερμασμένο κυκλοποιητή (95°C), υπό τις εξής συνθήκες:

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Σπάσιμο μεμβράνης βακτηρίων/Αποδιάταξη	95°C	3min
30 κύκλοι	95°C	15-30sec
	45-68°C	15-60sec
	72°C	1min/kb
Επιμήκυνση	72°C	5min
Τέλος	4-10°C	Forever

### Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Οι βακτηριακές αποικίες οι οποίες βγήκαν θετικές στο πείραμα της colony PCR, ετοιμάζονται στην συνέχεια για υγρή καλλιέργεια, ώστε τα βακτήρια που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο να πολλαπλασιαστούν. Το 1951, ο Giuseppe Bertani, χρησιμοποίησε στα πειράματα του ένα θρεπτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα στην υγρή καλλιέργεια, το λυσογόνο ζωμό (Lysogeny Broth-LB)<sup>132</sup>. Το LB, εκτός από Lysogeny Broth, είναι επίσης

<sup>132</sup> Bertani, G (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli". J. Bacteriol. 62 (3): 293–300. PMC 386127. PMID 14888646.

σύνηθες να αναφέρεται ως ζωμός Luria, ζωμός Lennox ή μέσο Luria-Bertani<sup>133 134</sup>. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα σύνθεσης του LB. Αν και είναι διαφορετικά, διαθέτουν παρόμοια σύνθεση συστατικών απαραίτητων για την προώθηση της ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των εξής: πεπτίδια και πεπτόνες καζεΐνης, βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένων βιταμινών B), ιχνοστοιχεία (π.χ. άζωτο, θείο, μαγνήσιο), μεταλλικά στοιχεία. Τα ιόντα νατρίου για μεταφορά και ωσματική ισορροπία παρέχονται από το χλωριούχο νάτριο. Η τρυπτόνη χρησιμοποιείται για την παροχή βασικών αμινοξέων, όπως πεπτιδίων και πεπτονών, στα αναπτυσσόμενα βακτήρια, ενώ το εκχύλισμα ζυμομύκητα χρησιμοποιείται για την παροχή πληθώρας οργανικών ενώσεων χρήσιμων για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν βιταμίνες και ορισμένα ιχνοστοιχεία. Παρακάτω ακολουθεί το πρωτόκολλο παρασκευής LB που χρησιμοποιήθηκε:

Για τελικό όγκο 1L:

- 10g tryptone
- 5g yeast extract
- 10g NaCl
- 1L ddH<sub>2</sub>O

Αποστέρωση του τελικού διαλύματος.

Για μια υγρή καλλιέργεια αναμιγνύονται 6ml LB με 12ml αμπικιλίνη (γενικά για χ ml LB, προστίθενται 2x ml αμπικιλίνη). Στη συνέχεια, με το τιπ μιας πιπέτας, επιλέγεται η αποικία την οποία θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε από το πιάτο και μεταφέρεται στο δοκιμαστικό σωλήνα με το LB-amp. Η διαδικασία πραγματοποιείται εξ 'ολοκλήρου δίπλα σε φλόγιστρο, ώστε να μην υπάρξουν μολύνσεις. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται όλο το βράδυ σε κινούμενο επωαστήρα στους 30-32°C.

#### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια είναι μια σημαντική τεχνική στη μοριακή βιολογία και ένα ουσιαστικό βήμα σε πολλές διαδικασίες, οι οποίες απαιτούν την απομόνωση πλασμιδίου υψηλής καθαρότητας. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε όλες τις διαδικασίες μοριακής βιολογίας όπως η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η κλωνοποίηση, η PCR, η επιμόλυνση και η αλληλούχιση. Ο διαχωρισμός του πλασμιδιακού από το χρωμοσωμικό βακτηριακό DNA γίνεται χρησιμοποιώντας αλκαλική λύση. Τα βασικά στάδια της απομόνωσης πλασμιδίων είναι η διάσπαση της κυτταρικής δομής και ο διαχωρισμός του πλασμιδίου από το χρωμοσωμικό DNA, τα υπολείμματα κυττάρων και άλλο αδιάλυτο υλικό. Τα βακτήρια λύονται με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιέχει δωδεκυλοθειεικό νάτριο (SDS) και υδροξείδιο του νατρίου. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου γίνεται διάσπαση των περισσότερων κυττάρων, το χρωμοσωμικό καθώς και το πλασμιδιακό DNA μετουσιώνονται. Η επακόλουθη εξουδετέρωση με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού καλίου, δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για

<sup>133</sup> Luria, S. E.; Adams, J. N.; Ting, R. C. (1960). "Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles". *Virology*. 12 (3): 348–390. doi:10.1016/0042-6822(60)90161-6. PMID 13764402

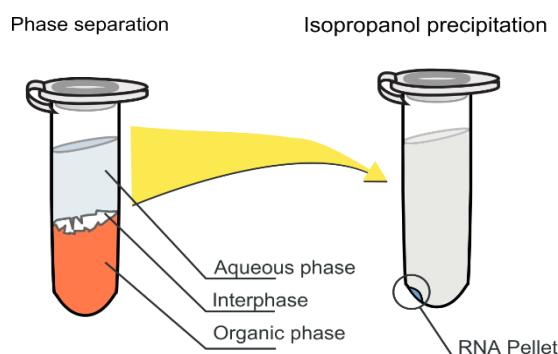
<sup>134</sup> Lennox, E. S. (1955). "Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1". *Virology*. 1 (2): 190–206. doi:10.1016/0042-6822(55)90016-7. PMID 13267987

τη δέσμευση μόνο του πλασμιδιακού DNA στην ειδική στήλη μεμβράνης πυριτίου. Οι πρωτεΐνες, το γονιδιωματικό DNA και τα κυτταρικά υπολείμματα στη συνέχεια κατακρημνίζονται σε ένα στάδιο φυγοκέντρησης και το υπερκείμενο μεταφέρεται στην ειδική στήλη. Η μόλυνση με άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται με πλύση με αιθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το καθαρό πλασμιδιακό DNA τελικά εκλούεται υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος με ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα. Για τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης πλασμιδίου NucleoSpin® Plasmid της MACHEREY-NAGEL.

## Μελέτη γονιδιακής έκφρασης

### Απομόνωση RNA

Η ταυτόχρονη απομόνωση του RNA, του DNA και των πρωτεϊνών από βιολογικά δείγματα έχει εισαχθεί από τον Chomczynski το 1993 και στην πορεία των ετών, έχει επιδεχθεί βελτιστοποιήσεις<sup>135</sup>. Η μέθοδος του Chomczynski βασίζεται στην απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων (RNA και DNA) με άλατα γουανιδινίου και φαινόλη. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την εργασία είναι το TRI tidy G™ της AppliChem. Αρχικά προστίθεται 1ml TRI tidy G™ ανά 1-5 x 10<sup>6</sup> κύτταρα και η πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται. Το μείγμα παραμένει για μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συμπλόκων RNA/πρωτεϊνών. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου, καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15'. Μετά από 15' φυγοκέντρηση σε 12.000 g στους +4°C, το RNA βρίσκεται στην άνω, υδατική φάση του δείγματος και μπορεί να συλλεχθεί. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και 15' φυγοκέντρηση σε 12.000 g στους +4°C θα οδηγήσει σε κατακρήμνιση του RNA σε πελέτα την οποία στη συνέχεια θα ξεπλύνουμε με αιθανόλη (70% και 100%, διαδοχικά) και θα επαναδιαλύσουμε σε RNase-free ddH<sub>2</sub>O.



Εικόνα 30: [https://en.wikipedia.org/wiki/Acid\\_guanidinium\\_thiocyanate-phenol-chloroform\\_extraction](https://en.wikipedia.org/wiki/Acid_guanidinium_thiocyanate-phenol-chloroform_extraction)

### DNase treatment

Η DNase I (δεοξυριβονουκλεάση I) είναι μια ενδονουκλεάση που διασπά το μονόκλωνο και δίκλωνο DNA σε δι-, τρι- και ολιγο-νουκλεοτίδια. Χρησιμοποιείται μετά την απομόνωση του

<sup>135</sup> A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. (Chomczynski, P. (1993) BioTechniques 15, 532-537)

RNA, ώστε να αποτραπεί οποιαδήποτε μόλυνση του δείγματος με μόρια DNA. Μια τυπική αντίδραση DNases έχει ως εξής:

Μια αντίδραση DNase για 10 $\mu$ g RNA ετοιμάζεται στον πάγο ως εξής:

RNA	~10 $\mu$ g
10X DNase I Reaction Buffer	10λ
DNase I (RNase-free)	1λ
ddH <sub>2</sub> O	έως 100λ
Τελικός όγκος	100λ

Η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 10min. Στη συνέχεια προστίθεται 1λ 0.5M EDTA ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

#### Καθαρισμός δειγμάτων με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)

Μετά την αντίδραση με Dnase που περιεγράφηκε παραπάνω, τα δείγματα RNA πρέπει να καθαριστούν από την παρουσία του ενζύμου. Ο καθαρισμός γίνεται με διάλυμα φαινόλης:χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 και στηρίζεται στην αρχή ότι ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από το pH. Σε pH 7,0 και υψηλότερο, το RNA και το DNA θα λυθούν στην υδατική φάση. Κάτω από το pH 7.0, το DNA θα μετουσιωθεί και θα καθιζάνει στην οργανική φάση, αφήνοντας RNA στην υδατική φάση. Η φαινόλη: χλωροφόρμιο αναγκάζει τις πρωτεΐνες να μετουσιωθούν και να καταστούν διαλυτές στην οργανική φάση ή ενδιάμεσα, ενώ τα νουκλεϊνικά οξέα παραμένουν στην υδατική φάση. Η προσθήκη χλωροφόρμιου καθιστά τη φάση πιο υδρόφιβη από τη φαινόλη μόνη της και εμποδίζει το πολυ (A) + RNA να παραμείνει στην ενδιάμεση φάση λόγω σχηματισμού αδιάλυτων συμπλεγμάτων RNA-πρωτεΐνης. Η ισοαμυλική αλκοόλη προστίθεται στο διάλυμα φαινόλης για να βοηθήσει στην αναστολή της δραστικότητας της RNase και στην πρόληψη της διαλυτοποίησης μεγάλων τμημάτων RNA με μακρά τμήματα πολυ (A) στη φάση της φαινόλης.

#### Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση DNA από ένα πρότυπο ώριμο mRNA (messenger RNA), μέσω αντίστροφης μεταγραφής, παράγει το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA-cDNA). Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση, οι αντίστροφες μεταγραφάσες (RTs), χρησιμοποιούν ένα πρότυπο RNA και ένα μικρό μόριο εκκινητή συμπληρωματικό προς το 3'άκρο του RNA για να κατευθύνουν τη σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ως εκμαγείο για την αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)<sup>136</sup>.

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript™ RT reagent kit της TAKARA. Ακολουθεί το πρωτόκολλο για μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής:

<sup>136</sup> Y. Kohara, in Encyclopedia of Genetics, 2001

5X PrimeScript™ Buffer	2λ
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5λ
Oligo dT Primer (50μM)*	0.5λ
Random 6mers (100μM)*	0.5λ
Total RNA	>500ng**
RNase Free dH <sub>2</sub> O	έως 10λ
Τελικός όγκος	10λ

\* Οι Oligo dT εκκινητές είναι μονόκλωνες αλληλουχίες δεοξυθυμίνης (dT), που υβριδοποιούνται στην πολυ (A) ουρά των μορίων mRNA. Χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τυχαία 6μερή, τα οποία δένουν σε τυχαίες θέσεις στο mRNA, διευκολύνοντας έτσι τη λειτουργία της αντίστροφης μεταγραφάσης.

\*\*Έως 500ng RNA μπορούν να μετατραπούν σε cDNA σε 10λ αντίδρασης.

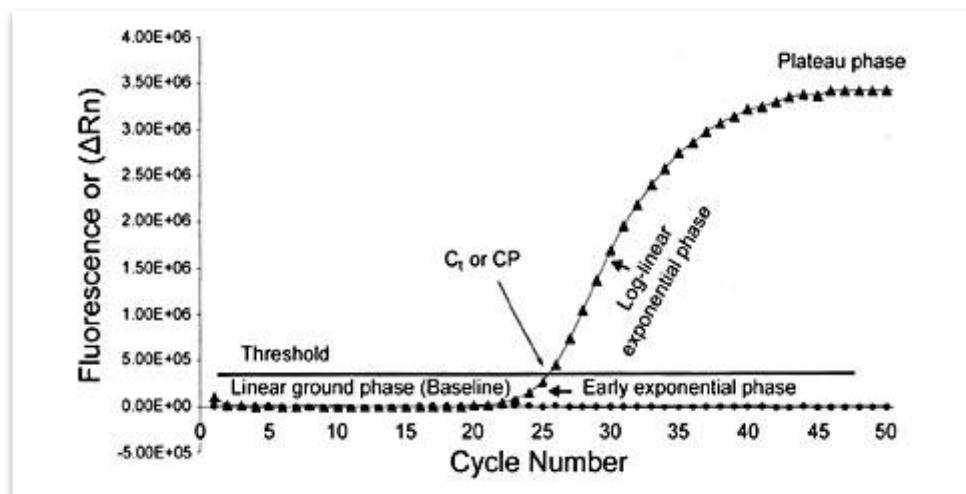
Το μείγμα της αντίδρασης στη συνέχεια επωάζεται στις εξής συνθήκες:

- 37°C για 15' (δράση αντίστροφης μεταγραφάσης)
- 85°C για 5'' (απενεργοποίηση ενζύμου)
- 4°C

#### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-qPCR)

Η Real-Time PCR ανήκει στην κατηγορία των ποσοτικών PCR(Quantitative PCR, Q-PCR). Στη Real-Time PCR, η ποσότητα του προϊόντος μετράται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της έντασης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας η οποία ενσωματώνεται στην αλληλουχία που ενισχύεται. Ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που σχηματίζεται και έχει άμεση σχέση με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολέις. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι

αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος<sup>137</sup>.



Εικόνα 31: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης. <http://www.cgp-journal.com/2005%20issue%20/Quantitative%20Real-time.html>

Για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR green I, η οποία ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA παραχθεί κατά την αντίδραση (ανήκει στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης). Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm, ενώ εκπέμπει στα 520 nm μόνο αφού ενσωματωθεί στο νεοσυντιθέμενο DNA. Έτσι, η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Το kit το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X), ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού λογισμικού του μηχανήματος της RT-PCR (Bio Rad CFX manager).

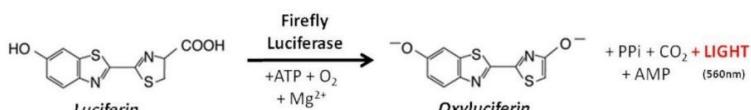
Το πρωτόκολλο για μια αντίδραση qPCR με τελικό όγκο 20λ, έχει ως εξής:

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	10λ
10 μM forward primer	0.4λ
10 μM reverse primer	0.4λ
Template DNA	<20ng
PCR-grade water	έως 20λ
Τελικός όγκος	20λ

<sup>137</sup> Mikael Kubista, José Manuel Andrade, Martin Bengtsson, Amin Forootan, Jiri Jonák, Kristina Lind, Radek Sindelka, Robert Sjöback, Björn Sjögren, Linda Strömbom, Anders Ståhlberg, Neven Zoric, The real-time polymerase chain reaction, Molecular Aspects of Medicine, Volume 27, Issues 2–3, 2006, Pages 95-125, ISSN 0098-2997

### Αντίδραση Λουσιφεράσης

Η αντίδραση λουσιφεράσης είναι μια πειραματική τεχνική η οποία επιτρέπει την διερεύνηση της ενεργότητας κάποιου cis-δρώντος στοιχείου, όπως για παράδειγμα ενός γονιδιακού υποκινητή ή ενισχυτή, μετρώντας την εκπομπή φωτός από το ένζυμο λουσιφεράση που εκφράζεται υπό τον έλεγχο της υπό μελέτη ρυθμιστικής περιοχής. Στη φύση, η βιοφωταύγεια συμβαίνει όταν η χημική ενέργεια μετατρέπεται σε φως και είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε πολλούς οργανισμούς, όπως οι πυγολαμπίδες, οι μύκητες και πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί. Η λουσιφεράση καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης, παρουσία ATP, οξυγόνου και μαγνησίου με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός, οξυλουσιφερίνης, CO και AMP.



Εικόνα 32: <https://www.goldbio.com/articles/article/a-crash-course-on-luciferase-assays>

Τυπικά, το γονίδιο αναφοράς (γονίδιο λουσιφεράσης) κλωνοποιείται με μία αλληλουχία DNA ενδιαφέροντος (π.χ. υποκινητή ή ενισχυτή) σε έναν πλασμιδιακό φορέα με τον οποίο στη συνέχεια επιμολύνονται βλαστικά κύτταρα. Μετά από 24-48 ώρες, τα επιμολυσμένα κύτταρα υποβάλλονται σε λύση με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε να απελευθερωθούν όλες οι πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της λουσιφεράσης. Τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση και η πελέτα επαναδιαλύεται σε 100λ Reporter Lysis Buffer. 10λ κυττάρων μεταφέρονται σε ειδικά γυάλινα σωληνάκια τα οποία τοποθετούνται στο Luminometer και στη συνέχεια προστίθενται 100λ υποστρώματος (Luc substrate).

Για την προετοιμασία 2ml διαλύματος υποστρώματος (Luc substrate) χρησιμοποιούνται τα εξής:

- 40λ 1M Tris, pH=8
- 53λ 150mM MgSO<sub>4</sub>
- 0.4λ 0,5M EDTA
- 66λ 1M DTT
- 10.7λ 50mM CoA
- 233λ 4Mm Luciferin
- 5.2λ 0.2M ATP
- 1574λ ddH<sub>2</sub>O

Ο φθορισμός διαβάζεται σε καθορισμένο χρόνο μετά την ανάμιξη από το λουμινόμετρο. Εφόσον ο υποκινητής που μελετάμε είναι συγχωνευμένος με το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης, η δραστικότητα της λουσιφεράσης μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με τη δραστικότητα του υποκινητή<sup>138</sup>.

<sup>138</sup> Luciferase Assay, Stephen T. Smale, Cold Spring Harb Protoc; 2010; doi:10.1101/pdb. prot542

## Καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων

Η ανάπτυξη κυττάρων στο εργαστήριο, είναι γνωστή ως κυτταροκαλλιέργεια. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) είναι καρυοτυπικά φυσιολογικές, αυτοανανεούμενες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass-ICM) του εμβρύου πριν από την εμφύτευση<sup>139 140</sup>. Οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού των κυττάρων βασίζονται σε δισδιάστατες τεχνικές (2-D) με τη χρήση ειδικών πλαστικών πιάτων και εξειδικευμένων θρεπτικών μέσων. Πρόσφατα μάλιστα, οι νέες προσεγγίσεις για την καλλιέργεια των βλαστοκυττάρων έδωσαν έμφαση στην τρισδιάστατη (3-D) κυτταρική ανάπτυξη για να μιμηθεί το *in vivo* περιβάλλον<sup>141 142</sup>. Η εσωτερική επιφάνεια των πιάτων καλλιέργειας επικαλύπτεται με εμβρυϊκά δερματικά κύτταρα ποντικού (Mouse embryonic fibroblasts-MEFs), ειδικά κατεργασμένα με μιτομυκίνη C, η οποία δημιουργεί εγκάρσιες συνδέσεις στο DNA έτσι ώστε να μην διαιρούνται. Αυτό το στρώμα κυττάρων ονομάζεται στρώμα τροφοδοσίας (feeder cells layer) και παρέχει στα βλαστικά κύτταρα μια επιφάνεια στην οποία μπορούν να προσκολληθούν. Τα βλαστικά κύτταρα προκειμένου να παραμείνουν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, χρειάζονται BMP (Bone Morphogenetic Proteins) και LIF (Leukemia Inhibitory Factor). Το BMP προστίθεται στην καλλιέργεια μέσω του ορού, ενώ τα κύτταρα τροφοδοσίας συχνά τροποποιούνται γενετικά ώστε να απελευθερώνουν θρεπτικά συστατικά στο μέσο καλλιέργειας, όπως το LIF. Οι ερευνητές έχουν πλέον επινοήσει τρόπους για την ανάπτυξη εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων χωρίς κύτταρα feeders, μια σημαντική επιστημονική πρόοδος καθώς μειώνεται ο κίνδυνος μόλυνσης της καλλιέργειας. Σε αυτή την περίπτωση, το θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας εμπλουτίζεται με ένα κοκτέιλ ανασταλτικών παραγόντων MEK (MEKi) και GSK3 (GSK3i), το 2i<sup>143</sup>.

### Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Τα θρεπτικά υλικά είναι πολύ σημαντικά στην κυτταροκαλλιέργεια, καθώς προμηθεύουν τα κύτταρα με τα απαραίτητα στοιχεία που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Το πιο συνηθισμένο θρεπτικό μέσο στην καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, είναι το DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Το DMEM, συμπληρώνεται με ορό FBS (fetal bovine serum), γλουταμίνη (συγκεκριμένα χρησιμοποιείται Glutamax,ένα διπεπτίδιο που διασπάται και απελευθερώνει γλουταμίνη. Είναι πιο σταθερό και δεν αποσυντίθεται σε τοξική αμμωνία), το αντιβιοτικό Penstrep, ένα μείγμα πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (Penicillin-G).

<sup>139</sup> Evans, M., Kaufman, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154–156 (1981). <https://doi.org/10.1038/292154a0>

<sup>140</sup> Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(12):7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634

<sup>141</sup> E. Knight, S. Przyborski, Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro, J. Anat. 227 (2015) 746–756.

<sup>142</sup> J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, Tissue Eng. Part B Rev. 14 (2008) 61–86.

<sup>143</sup> Sim YJ, Kim MS, Nayfeh A, et al. 2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. Stem Cell Reports. 2017;8(5):1312–1328. doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.001 (Sim YJ and doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.001 n.d.)

Streptomycin) και β-μερκαπτοαιθανόλη ώστε να προκύψει το τελικό θρεπτικό μέσο για τα βλαστοκύτταρα.

Για τελικό όγκο 200ml θρεπτικού υλικού για ESCs χρησιμοποιούμε:

- 20ml FBS (10%)
- 2ml Glutamax
- 2ml Penstrep
- 200λ β-μερκαπτοαιθανόλη
- Συμπληρώνουμε με DMEM ως τα 200ml

Όταν καλλιεργούνται κύτταρα feeders, χρησιμοποιείται ένα διαφορετικό θρεπτικό υλικό, το οποίο περιέχει DMEM, FBS, και το αντιβιοτικό Penstrep.

Για τελικό όγκο 200ml θρεπτικού υλικού SNL χρησιμοποιούμε:

- 20ml FBS (10%)
- 2ml Glutamax
- 2ml Penstrep
- Συμπληρώνουμε με DMEM ως τα 200ml

#### Σπάσιμο κυττάρων (cell splitting)

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα καλό είναι να καλλιεργούνται έως ότου φτάσουν μια συγκεκριμένη πυκνότητα. Από εκεί και έπειτα απαιτείται το “σπάσιμο” των κυττάρων (split) και το μοίρασμα τους σε περισσότερα πιάτα καλλιέργειας για να αποφεύγεται η διαφοροποίησή τους. Η διαδικασία αυτή συνήθως γίνεται κάθε 2-3 ημέρες, και τα βλαστικά κύτταρα μοιράζονται σε νέα πιάτα με αναλογία 1:3 έως 1:6, ανάλογα με το βαθμό ανάπτυξης τους. Μια γενική αρχή που ακολουθείται, είναι ότι τα κύτταρα πρέπει να “σπάνε”, όταν έχουν φτάσει σε 70% πυκνότητα. Πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση του θρεπτικού από το πιάτο και μια πλύση με PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού που περιέχει πρωτεΐνες οι οποίες απενεργοποιούν την θρυψίνη.

Το PBS (Phosphate-Buffered Saline) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο βρίσκει πολλές εφαρμογές στην κυτταροκαλλιέργεια, διότι διατηρεί το pH και την οσμωμοριακότητα των κυττάρων σταθερά. Για την παρασκευή 500ml 10x PBS χρησιμοποιούνται:

- 40gr NaCl
- 7.2gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1.2gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1gr KCl

Το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί στην κυτταροκαλλιέργεια αραιώνεται 10 φορές (έως 1x) και έχει pH 7.4.

Για να ανασηκωθούν τα κύτταρα από το πιάτο στον πάτο του οποίου έχουν κολλήσει, απαιτείται επώαση τους στους 37°C για μερικά λεπτά (max. 5') με κατάλληλη ποσότητα ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που διασπά τις πρωτεΐνες, την θρυψίνη. Όταν προστίθεται σε μια κυτταρική καλλιέργεια, η θρυψίνη διασπά τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν στα

κύτταρα να προσκολλώνται στο πιάτο καλλιέργειας αλλά και μεταξύ τους, αφήνοντας τα κύτταρα σε εναιώρημα. Η ποσότητα της θρυψίνης που θα χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται από το μέγεθος του πιάτου στο οποίο έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα. Μετά την θρυψίνη, προστίθεται ίση ποσότητα θρεπτικού υλικού ώστε να την απενεργοποιήσει. Επειδή τα συσσωματώματα των ESCs, τείνουν να διαφοροποιούνται προς ενδόδερμα, είναι σημαντικό να γίνει καλός διαχωρισμός των αποικιών σε μονά κύτταρα μετά την επώαση με θρυψίνη<sup>144</sup>.

#### Διαμόλυνση βλαστοκυττάρων (stem cells transfection)

Η διαμόλυνση είναι η διαδικασία κατά την οποία νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες εισάγονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα με μη ιικές μεθόδους. Αυτή η τεχνολογία μεταφοράς γονιδίων επιτρέπει τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας και της έκφρασης πρωτεΐνων μέσα στο κυτταρικό περιβάλλον. Τυπικά, η επιμόλυνση των ζωικών κυττάρων περιλαμβάνει το παροδικό άνοιγμα πόρων στην κυτταρική μεμβράνη ώστε να επιτραπεί η πρόσληψη υλικού. Ορισμένες από τις κοινώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές επιμόλυνσης περιλαμβάνουν την καθίζηση με φωσφορικό ασβέστιο, την λιπομόλυνση και την ηλεκτροδιάτρηση, ενώ στην παρούσα εργασία η τεχνική η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι η λιπομόλυνση. Κατά τη διάρκεια της λιπομόλυνσης, η έγχυση γενετικού υλικού στα κύτταρα γίνεται με τη βοήθεια λιποσωμάτων, τα οποία είναι κυστίδια που μπορούν εύκολα να συγχωνευθούν με την κυτταρική μεμβράνη, καθώς και τα δύο διαθέτουν εξωτερικά φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Η τεχνική της λιπομόλυνσης χρησιμοποιεί γενικά ένα θετικά φορτισμένο (κατιονικό) λιπίδιο (κατιονικά λιποσώματα ή μίγματα) για να σχηματίσει ένα συσσωμάτωμα με το αρνητικά φορτισμένο (ανιονικό) γενετικό υλικό. Τα θετικά φορτισμένα συσσωματώματα στη συνέχεια, έλκονται από την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική στιβάδα των βλαστοκυττάρων, την οποία διαπερνούν, ενώ στη συνέχεια μεταφέρονται εντός του πυρήνα<sup>145</sup>. Για τις διαμολύνσεις των βλαστοκυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν το Lipofectamine® Reagent και το PLUS™ Reagent της Invitrogen. Για transfection σε 24-well χρησιμοποιούνται τα εξής:

DNA ανά πηγαδάκι	1γ*
PLUS™ Reagent ανά πηγαδάκι	0.5λ
Lipofectamine® Reagent ανά πηγαδάκι	1λ

\*στην περίπτωση του transient transfection χρησιμοποιείται 1γ από το πλασμιδιακό DNA που θέλουμε να εισάγουμε, ενώ στην περίπτωση του stable transfection χρησιμοποιείται 0.5γ του επιθυμητού πλασμιδίου και 0.5γ πλασμιδίου CRISPR.

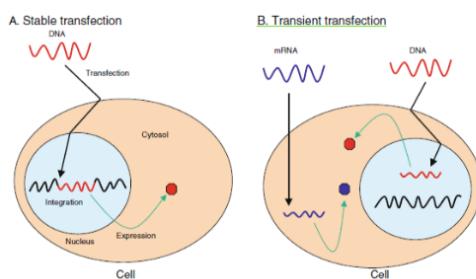
Τόσο το PLUS, όσο και η Lipofectamine αραιώνονται το κάθε ένα σε 25λ DMEM. Στη συνέχεια, το μείγμα DMEM-Plus προστίθεται στο Eppendorf που περιέχει το 1λ του πλασμιδίου με το οποίο θα διαμολύνουμε τα κύτταρα και όλη αυτή η αντίδραση προστίθεται στο μείγμα DMEM-Lipofectamine. Η τελική αντίδραση αφήνεται για 5' σε RT και μετά το πέρας του χρόνου, μεταφέρεται στο πηγαδάκι με τα βλαστοκύτταρα και η 24-well πλάκα, επιστρέφεται στους 37°C στον επωαστήρα. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι ο αριθμός των κυττάρων που έχει κάθε πηγαδάκι, εξαρτάται από το είδος του transfection. Έτσι, στην περίπτωση του transient

<sup>144</sup> Huang, H. L.; Hsing, H. W.; Lai, T. C.; Chen, Y. W.; Lee, T. R.; Chan, H. T.; Lyu, P. C.; Wu, C. L.; Lu, Y. C.; Lin, S. T.; Lin, C. W.; Lai, C. H.; Chang, H. T.; Chou, H. C.; Chan, H. L. (2010). "Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells". Journal of Biomedical Science. 17 (1): 36.

<sup>145</sup> Recillas-Targa F (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. Mol Biotechnol 34(3):337–354

transfection χρησιμοποιούνται 400.000 βλαστοκύτταρα ανά πηγαδάκι, ενώ στην περίπτωση του stable, 200.000. Τα διαμολυσμένα βλαστοκύτταρα καλλιεργούνται για όσες μέρες χρειάζεται, ανάλογα με πείραμα που θα ακολουθήσει. Κάθε 1-2 μέρες ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται αντιβιοτικό (Penstrep) για προστασία από μολύνσεις.

Το γενετικό υλικό, αφού μεταφερθεί στον πυρήνα των κυττάρων-στόχων, μπορεί είτε να ενσωματωθεί στο γενομικό DNA (stable transfection) ή να παραμείνει στον πυρήνα αλλά εκτός της γενομικής αλληλουχίας (transient transfection). Στην περίπτωση του stable transfection, το εισαγόμενο γενετικό υλικό διατηρεί την έκφραση του και όταν τα κύτταρα διαιρούνται, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα transient transfections.



Εικόνα 33: Τύποι διαμόλυνσης. Kim, T.K., Eberwine, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173–3178 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>

Για να γίνει το stable transfection και η αλληλουχία στόχος να εισαχθεί σε συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματος, χρειάζεται κάποιο μοριακό σύστημα το οποίο να το επιτρέπει αυτό. Πολλές τεχνικές επεξεργασίας του γονιδιώματος είναι γνωστές και χρησιμοποιούνται ευρέως όπως για παράδειγμα οι νουκλεάσες δακτυλίου ψευδαργύρου (zinc-finger nucleases-ZFNs)<sup>146</sup><sup>147</sup>, οι TALENs (transcription activator-like effector nucleases)<sup>148</sup> και το σύστημα CRISPR-Cas9<sup>149</sup><sup>150</sup>, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Το σύστημα CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) είναι ένα μικροβιακό σύστημα ανοσίας το οποίο χρησιμοποιεί RNA-κατευθυνόμενες νουκλεάσες που πέπτουν το ξένο γενετικό υλικό<sup>151</sup>. Το σύστημα CRISPR-Cas9, χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό πρωτεΐνων και βραχέων τμημάτων RNA για να στοχεύσει και τελικά να κόψει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Τα βακτήρια συλλέγουν αλληλουχίες DNA από ξενιστές π.χ. από βακτηριοφάγους, οι οποίες ονομάζονται “protospacers” και τις ενσωματώνουν στο γονιδίωμα τους. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για να εκφράσουν έναν σύντομο οδηγό RNA, που στη συνέχεια μπορεί να

<sup>146</sup> Wood AJ, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*. 2011; 333:307. [PubMed: 21700836]

<sup>147</sup> Miller JC, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25:778–785. [PubMed: 17603475]

<sup>148</sup> Reyon D, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30:460–465. [PubMed: 22484455]

<sup>149</sup> Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010; 327:167–170. [PubMed: 20056882]

<sup>150</sup> Cong L, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339:819–823. [PubMed: 23287718]

<sup>151</sup> Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 2011; 45:273–297. [PubMed: 22060043]

χρησιμοποιηθεί από το σύστημα CRISPR-Cas για να καταστρέψει οποιεσδήποτε αλληλουχίες DNA ταιριάζουν με τα protospacers<sup>152</sup>.

Η επεξεργασία του γονιδιώματος με το σύστημα CRISPR/Cas9 βασίζεται σε μια απλοποιημένη έκδοση του βακτηριακού συστήματος προστασίας. Τα βλαστοκύτταρα διαμολύνονται με το πλασμίδιο-στόχο και με ένα ειδικά σχεδιασμένο πλασμίδιο CRISPR. Το πλασμίδιο CRISPR παρέχει στο κύτταρο έναν οδηγό RNA (guide RNA-gRNA) ειδικά σχεδιασμένο για μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος (στην παρούσα εργασία αυτή είναι ο γενετικός τόπος *Hipp11*). Η νουκλεάση Cas9 θα χρησιμοποιήσει την ακολουθία που υποδεικνύει το gRNA για να συνδεθεί στο συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματος και να κόψει τη διπλή έλικα του DNA. Οι φυσικοί μηχανισμοί επισκευής DNA του κυττάρου μπορούν στη συνέχεια να αξιοποιηθούν για να κάνουν συγκεκριμένες αλλαγές στο γονιδίωμα, με τον εξής τρόπο: Το πλασμίδιο-στόχος διαθέτει στα άκρα του ενθέματος τις περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο *Hipp11*. Η Cas9 νουκλεάση θα αναγνωρίσει αυτή την αλληλουχία τόσο στο γονιδίωμα, όσο και στο πλασμίδιο και θα κόψει εκεί, αφήνοντας το πλασμίδιο γραμμικό και το γενομικό DNA κομμένο. Δίπλα ακριβώς από τις περιοχές της CRISPR, βρίσκονται οι RHS και LHS (Right Homologous Sequence και Left Homologous Sequence), περιοχές ομολογίας με τα άκρα που έχει δημιουργήσει η πέψη της Cas9 στο γενομικό DNA. Μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού, το γραμμικό πλέον ένθεμα που έχουμε κατασκευάσει, θα τοποθετηθεί στο ακριβές σημείο που θέλουμε στο γενετικό τόπο *Hipp11*.

#### Selection βλαστοκυττάρων με αντιβιοτικό

Μετά τη διαμόλυνση των βλαστοκυττάρων με το επιθυμητό πλασμίδιο χρειάζεται ένα σύστημα το οποίο θα μας επιτρέπει να ξεχωρίσουμε ποια κύτταρα έχουν λάβει το πλασμίδιο και ποια όχι. Για το λόγο αυτό στα πλασμίδια τα οποία σχεδιάζονται στο εργαστήριο, προστίθεται μια κασέτα η οποία προσφέρει αντίσταση σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Για τους σκοπούς τη παρούσας εργασίας, το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η νεομυκίνη, έτσι το γονίδιο περιλήφθηκε στα πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των βλαστοκυττάρων. Τα μη διαμολυνθέντα κύτταρα τελικά πεθαίνουν όταν η καλλιέργεια υποβάλλεται σε αγωγή με νεομυκίνη ή παρόμοιο αντιβιοτικό. Η χορήγηση του αντιβιοτικού ξεκινά την επόμενη μέρα της διαμόλυνσης και συνεχίζεται κάθε 1-2 ημέρες.

<sup>152</sup> Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9 Rajat M. Gupta and Kiran Musunuru J Clin Invest. 2014;124(10):4154–4161. doi:10.1172/JCI72992.

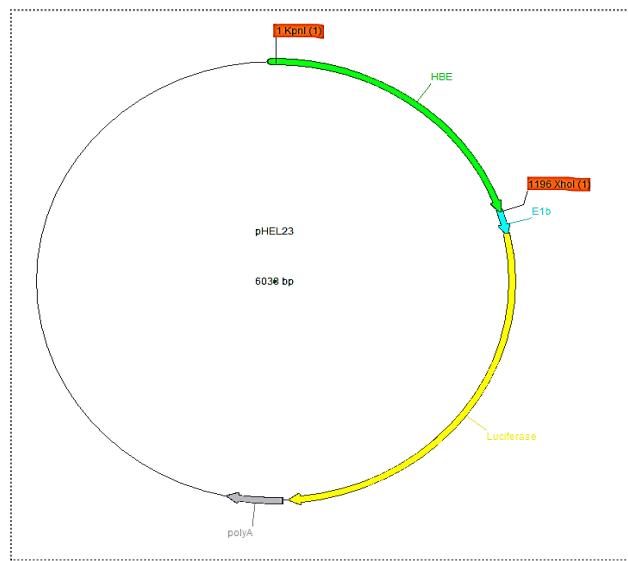
### III. Ειδικό μέρος

Με χρήση των μεθόδων μοριακής βιολογίας που περιεγράφηκαν παραπάνω, έγινε η κατασκευή των πλασμίδιων που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της εργασίας. Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά τα βήματα που χρειάστηκαν ώστε να πάρουμε τα τελικά πλασμίδια ελέγχου, καθώς και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο της λουσιφεράσης.

### Πλασμίδια Λουσιφεράσης

Για τις ανάγκες του πειράματος Λουσιφεράσης, χρειάστηκε να κατασκευαστούν 6 πλασμίδια, κάθε ένα από τα οποία θα μας βοηθούσε να μελετήσουμε την ενεργότητα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου. Οι αλληλουχίες που επιλέξαμε να μελετήσουμε ήταν οι περιοχές LHS (Left Homologous Sequence), RHS (Right Homologous Sequence), Ins1 (Insulator 1), Ins2 (Insulator 2), AR1f (ενισχυτής AR1 full), AR1 (ενισχυτής AR1 μόνο με το κομμάτι “enhancer”) και για αυτό το λόγο κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα πλασμίδια, τα οποία είχαν την εκάστοτε αλληλουχία-στόχο πριν το γονίδιο αναφοράς (γονίδιο λουσιφεράσης). Σαν πλασμίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το pEL που εκφράζει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του ελάχιστου υποκινητή E1b

Αρχικά, το πλασμίδιο **pHEL23<sup>153</sup>** κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI/Xhol και μετά από ηλεκτροφόρηση, απομονώθηκε με χειρουργικό νυστέρι η άνω μπάντα μήκους 4843bp η οποία λειτούργησε ως vector για την κατασκευή και των 6 πλασμίδιων. Η μπάντα αφού απομονώθηκε, καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up από MACHEREY-NAGEL.

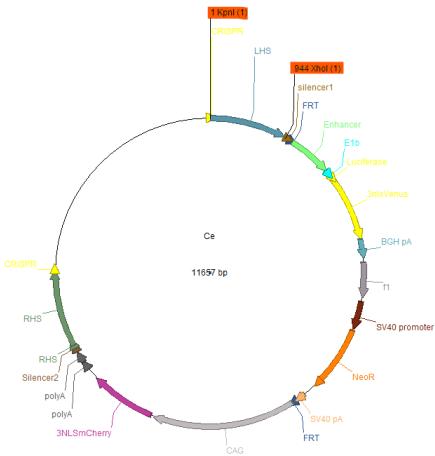


Εικόνα 34: Το πλασμίδιο pHEL23. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων KpnI/Xhol.

<sup>153</sup> Papanayotou C, Benhaddou A, Camus A, et al. A novel nodal enhancer dependent on pluripotency factors and smad2/3 signaling conditions a regulatory switch during epiblast maturation. PLoS Biol. 2014;12(6):e1001890. Published 2014 Jun 24. doi: 10.1371/journal.pbio.1001890

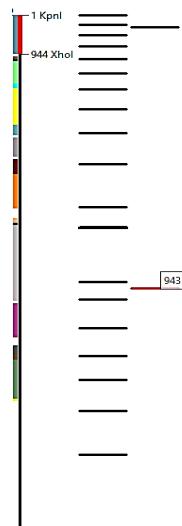
## Πλασμίδιο pLHSE1bLuc

Με το συγκεκριμένο πλασμίδιο μελετήθηκε η ενεργότητα της αλληλουχίας LHS. Ως vector χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη του **pHEL23** με KpnI/Xhol, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Για να πάρουμε την αλληλουχία LHS, που θα λειτουργούσε ως insert, πραγματοποιήσαμε πέψη στο πλασμίδιο **Ce** με τα ένζυμα περιορισμού KpnI/Xhol.



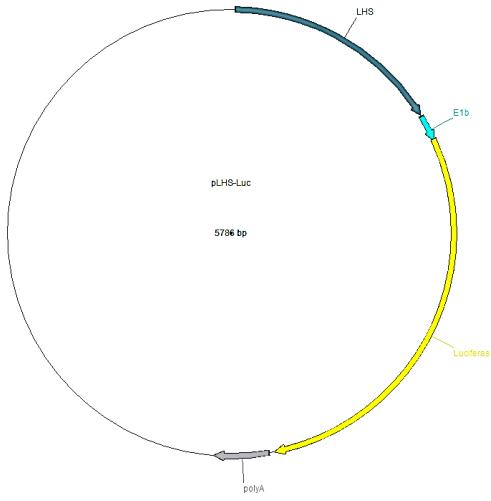
Εικόνα 35: Το πλασμίδιο Ce. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού KpnI/Xhol.

Από την πέψη προέκυψαν 2 θραύσματα DNA όπως φαίνεται στην εικόνα 3. Από αυτά επιλέχθηκε το κάτω, μήκους 943bp, απομονώθηκε και καθαρίστηκε με το ειδικό kit.



Εικόνα 36: Το πλασμίδιο Ce κομμένο ενζυμικά με KpnI/Xhol.

Τα δυο θραύσματα DNA, vector και insert, ενώθηκαν μεταξύ τους με αντίδραση λιγάσης και προέκυψε το πλασμίδιο **pLHSE1bLuc** όπως φαίνεται παρακάτω:



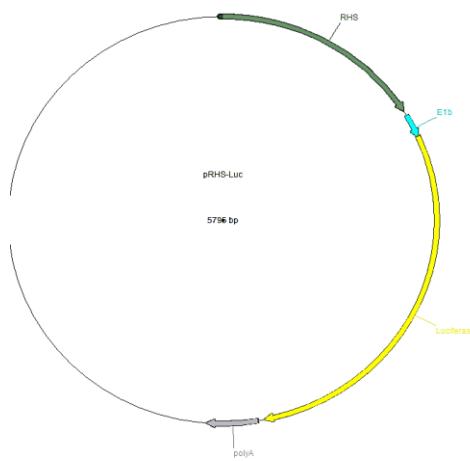
Εικόνα 37:το πλασμίδιο pLHSE1bLuc.

### Πλασμίδιο pRHSE1bLuc

Με το συγκεκριμένο πλασμίδιο μελετήθηκε η ενεργότητα της αλληλουχίας RHS. Ως vector χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη του **pHEL23** με KpnI/Xhol, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτή τη φορά, το insert προέκυψε από PCR. Ως υπόστρωμα DNA, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **Ce**, ενώ οι primers ήταν οι εξής:

Forward primer	agcttc <u>cggtacc</u> TATGGCTCACATCTGTC
Reverse primer	caagg <u>tctcgag</u> ATGTGAACAAAGCACCCTATGG

Με την παραπάνω αντίδραση PCR, πολλαπλασιάσαμε την αλληλουχία RHS από το πλασμίδιο **Ce**, προσθέτοντας της άκρα τα οποία αναγνωρίζουν τα ένζυμα KpnI/Xhol (υπογραμμισμένα στον παραπάνω πίνακα) και άλλα 6 νουκλεοτίδια στο 5' άκρο τα οποία βοηθάνε το ένζυμο περιορισμού να προσδεθεί στην θέση περιορισμού. Το προϊόν PCR στη συνέχεια καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up και κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού KpnI/Xhol. Το insert που απομονώθηκε μετά την ηλεκτροφόρηση, ενώθηκε με τον vector με αντίδραση λιγάσης και έτσι προέκυψε το πλασμίδιο **pRHSE1bLuc**, όπως φαίνεται στην εικόνα:



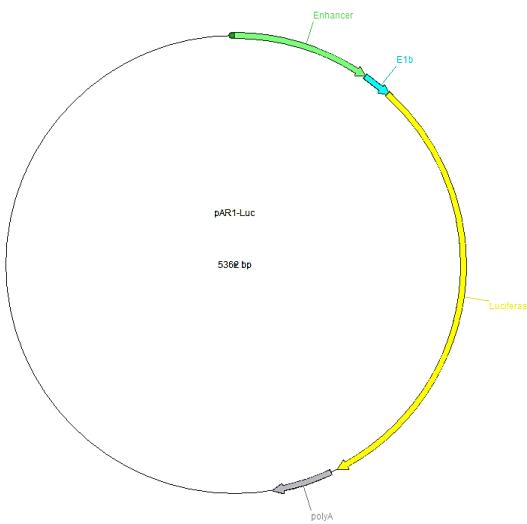
Εικόνα 38:το πλασμίδιο pRHSE1bLuc.

### Πλασμίδιο pAR1E1bLuc

Με το συγκεκριμένο πλασμίδιο μελετήθηκε η ενεργότητα του ενισχυτή AR1 που φέρει μόνο το τμήμα “enhancer”. Ως vector χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη του **pHEL23** με KpnI/Xhol, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το insert προέκυψε πάλι από PCR. Ως υπόστρωμα DNA, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **Ce**, ενώ οι primers ήταν οι εξής:

Forward primer	tctagaggta <u>c</u> CTGGGTCC <u>T</u> ATGCGG
Reverse primer	tctagact <u>c</u> g <u>a</u> TCAGGTGCACATGACGG

Με την παραπάνω αντίδραση PCR, πολλαπλασιάσαμε την αλληλουχία του ενισχυτή AR1 από το πλασμίδιο **Ce**, προσθέτοντας της άκρα τα οποία αναγνωρίζουν τα ένζυμα KpnI/Xhol. Το προϊόν PCR στη συνέχεια καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up και κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού KpnI/Xhol. Το insert που απομονώθηκε μετά την ηλεκτροφόρηση, ενώθηκε με τον vector με αντίδραση λιγάσης και έτσι προέκυψε το πλασμίδιο **pAR1E1bLuc**, όπως φαίνεται στην εικόνα:



Εικόνα 39: το πλασμίδιο pAR1E1bLuc.

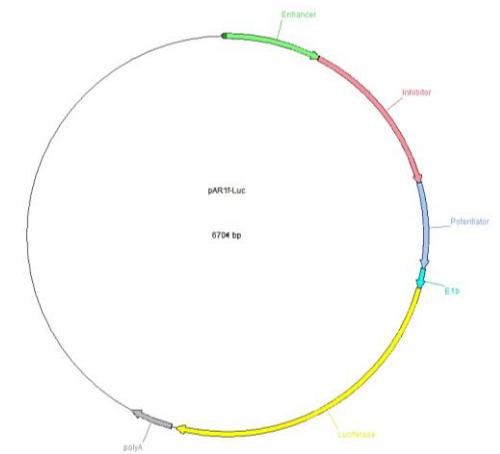
### Πλασμίδιο pAR1fE1bLuc

Με το συγκεκριμένο πλασμίδιο μελετήθηκε η ενεργότητα ολόκληρου του ενισχυτή AR1 (AR1f). Ως vector χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη του **pHEL23** με KpnI/Xhol, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το insert προέκυψε πάλι από PCR. Ως υπόστρωμα DNA, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **Cf**, ενώ οι primers ήταν οι εξής:

Forward primer	tctagaggta <u>c</u> CTGGGTCC <u>T</u> ATGCGG
Reverse primer	tctagact <u>c</u> g <u>a</u> TCACTTGTTCGGGACTGG

Με την παραπάνω αντίδραση PCR, πολλαπλασιάσαμε την αλληλουχία του ενισχυτή AR1f από το πλασμίδιο **Cf**, προσθέτοντας της άκρα τα οποία αναγνωρίζουν τα ένζυμα KpnI/Xhol. Το προϊόν PCR στη συνέχεια καθαρίστηκε με το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up και κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού KpnI/Xhol. Το insert που απομονώθηκε μετά την ηλεκτροφόρηση,

ενώθηκε με τον vector με αντίδραση λιγάσης και έτσι προέκυψε το πλασμίδιο **pAR1fE1bLuc**, όπως φαίνεται στην εικόνα:



Εικόνα 40:το πλασμίδιο pAR1fE1bLuc.

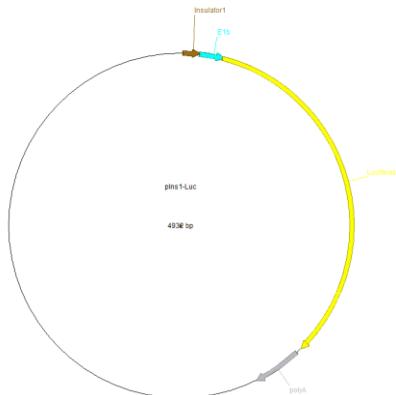
### Πλασμίδιο pIns1E1bLuc

Με το συγκεκριμένο πλασμίδιο μελετήθηκε η ενεργότητα του Insulator1 (Ins1). Ως vector χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη του pHEL23 με KpnI/Xhol, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το insert προέκυψε με υβριδοποίηση των δυο κάτωθι ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών:

Primer 1	CATTCCTTTAATGGTCTTTCTGGACACCACTAGGGGTCAGAAGTAGT TCATCAAACCTTCTTCCCTCCCTA
Primer 2	<u>tcga</u> TAGGGAGGGAAAGAAAGTTGATGAACTACTTCTGACCCCTAGTG GTGTCCAGAAAAGACCATTAAAGGAATGgtac

Μετά την υβριδοποίηση των αλληλουχιών, το δίκλωνο μόριο DNA που θα προκύψει, θα έχει άκρα συμπληρωματικά με αυτά του pHEL23 που έχει κοπεί με KpnI/Xhol. 5λ (200μM) από κάθε ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία αραιώθηκαν με H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 20λ και αφέθηκαν στους 95°C για 1 ώρα ώστε να υβριδοποιηθούν.

Μετά από αντίδραση λιγάσης, το πλασμίδιο που προέκυψε ήταν το **pIns1E1bLuc**.



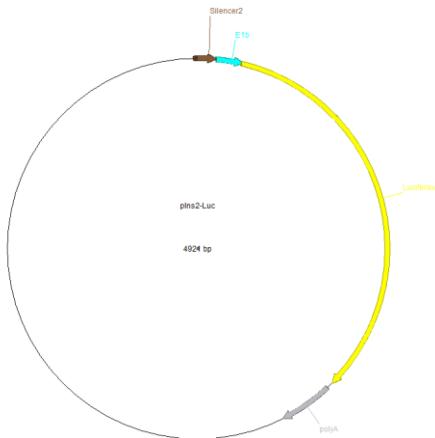
Εικόνα 41:το πλασμίδιο pIns1E1bLuc.

## Πλασμίδιο pIns2E1bLuc

Με το συγκεκριμένο πλασμίδιο μελετήθηκε η ενεργότητα του Insulator2 (Ins2). Ως vector χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία που προέκυψε από την πέψη του pHEL23 με Κροί/Χhol, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το insert προέκυψε με υβριδοποίηση των δυο κάτωθι ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών:

Primer1	CATCTTGGACCATTAGCTCCACAGGTATCTTCTTCCCTCTAGTGGT CATAAACAGCAGCTTCAGCTACCTCTC
Primer2	<u>tcga</u> GAGAGGGTAGCTGAAGCTGCTGTTATGACCACTAGAGGGAAGA AGATAACCTGTGGAGCTAATGGTCCAAGATG <u>gtac</u>

Μετά από αντίδραση λιγάσης, το πλασμίδιο που προέκυψε ήταν το **pIns2E1bLuc**.



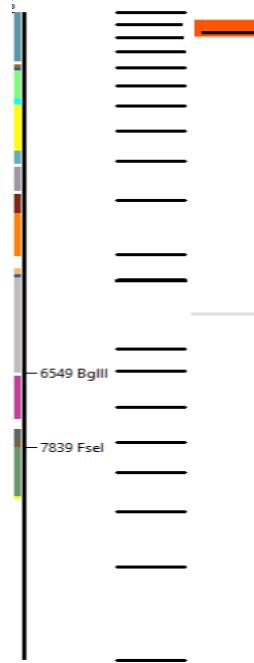
Εικόνα 42: το πλασμίδιο pIns2E1bLuc.

## Πλασμίδια ελέγχου

Τα αρχικά πλασμίδια ελέγχου που είχαν κατασκευαστεί στο εργαστήριο περιέκλειαν τις γονιδιακές κασέτες ανάμεσα σε δυο αλληλουχίες-μονωτές (Insulators), οι οποίες τις προστάτευαν από την επίδραση ρυθμιστικών περιοχών του γενετικού τόπου *Hip11*. Ωστόσο σε πειράματα Λουσιφεράσης που διενεργήσαμε φάνηκε ότι οι Insulators ενεργοποιούν τη μεταγραφή και γι' αυτό χρειάζεται να αφαιρεθούν από τα πλασμίδια ελέγχου. Ο τρόπος κατασκευής του κάθε πλασμίδιου περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

## Πλασμίδιο CeYCN

Η κατασκευή του πλασμίδιου CeYCN γίνεται σε δυο βήματα. Αρχικά, το πλασμίδιο **Ce** κόβεται ενζυμικά με BgIII/Fsel, επωάζεται 30' με αλκαλική φωσφατάση (rSAP-rapid Shrimp Alkaline Phosphatase) ώστε να αφαιρεθούν οι φωσφορικές ομάδες από τα άκρα του, μειώνοντας τον κίνδυνο να επιανακυκλοποιηθεί, και μετά από ηλεκτροφόρηση απομονώνεται η άνω μπάντα στα 10367bp (vector).



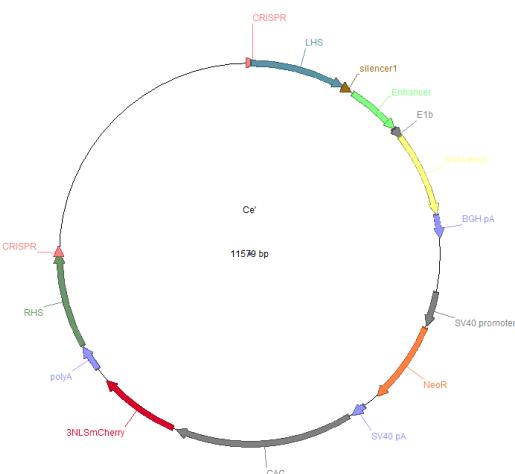
Εικόνα 43: Το πλασμίδιο Ce κομμένο ενζυμικά με BgIII/FseI, μετά από ηλεκτροφόρηση. Με πορτοκαλί φαίνεται η μπάντα που απομονώθηκε.

Για να κατασκευάσουμε το insert για την αντίδραση λιγάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα DNA το Ce και primers τους εξής:

Forward primer	TTGTCCCCAAATCTGGCGGAG
Reverse primer	aacataggccggccccTCTAGAACTAGTGGATCCAG

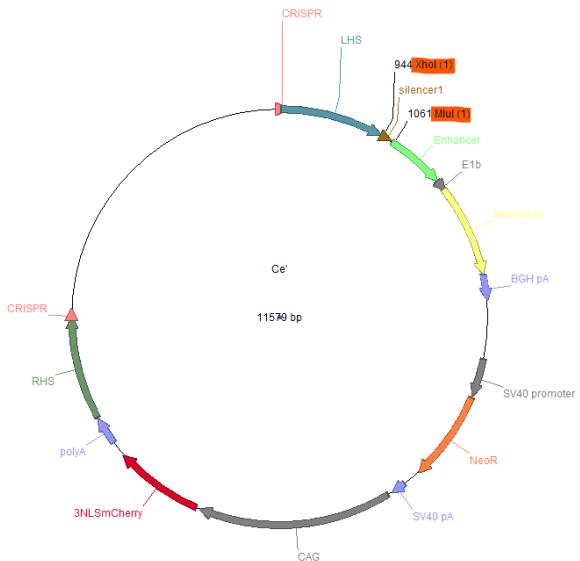
Αυτή η PCR συνθέτει το γονίδιο της mCherry και το πολύ-A της με άκρα BgIII – FseI χωρίς τον Ins2.

Μετά από αντίδραση λιγάσης, το πλασμίδιο που προέκυψε δεν έχει τον Insulator του 3' άκρου και ονομάστηκε Ce' (εικ.9).



Εικόνα 44: το πλασμίδιο Ce'.

Σε δεύτερη φάση, το **Ce'**, κόπηκε με Xhol/MluI και επωάστηκε με την πολυμεράση Klenow, η οποία “γέμισε” τα κολλώδη άκρα που είχαν δημιουργήσει τα ένζυμα περιορισμού. Η αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε, απομονώθηκε η άνω μπάντα στα 11462 bp και μπήκε μόνη της σε αντίδραση λιγάσης ώστε να κλείσει, έχοντας χάσει πλέον και τον δεύτερο Insulator (Ins1).

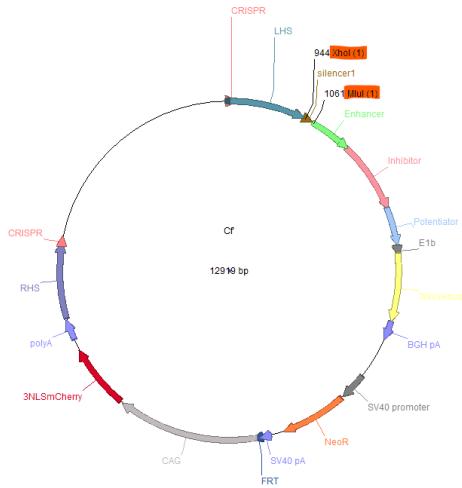


Εικόνα 45: Ce' plasmid. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων MluI/Xhol

Το τελικό πλασμίδιο που προέκυψε είναι το **CeYCN**.

### Πλασμίδιο CfYCN

Για την κατασκευή του πλασμιδίου CfYCN ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με αυτή για την κατασκευή του CeYCN, με τη διαφορά ότι εδώ χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο **Cf** αντί για το **Ce**. Αρχικά το πλασμίδιο **Cf'** δημιουργήθηκε έχοντας ως vector το Cf κομμένο με BglII/FseI και ως insert το προϊόν PCR με υπόστρωμα το Cf και primers τους ίδιους με παραπάνω. Το **Cf'** αφού κόπηκε με Xhol/MluI και επωάστηκε με την πολυμεράση Klenow, μπήκε σε αντίδραση αυτό-λιγάσης ώστε να κλείσει, έχοντας χάσει πλέον και τον δεύτερο Insulator.

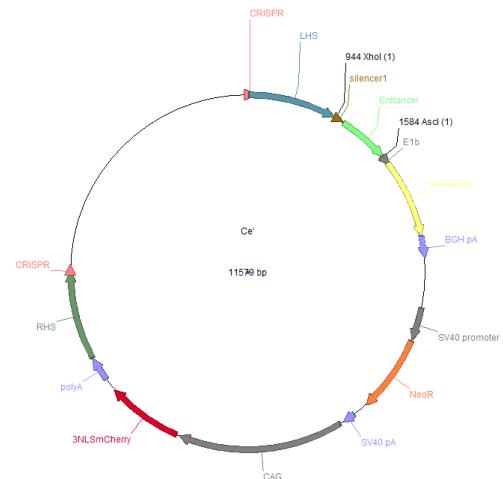
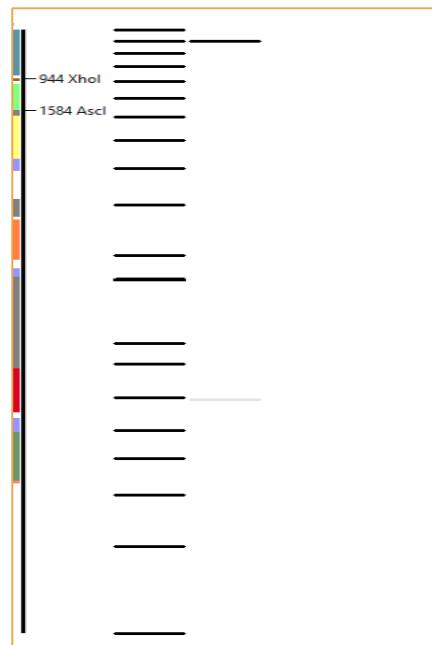


Εικόνα 46: Cf' plasmid. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού των ενζύμων MluI/Xhol

Το τελικό πλασμίδιο που προέκυψε είναι το **CfYCN**.

### Πλασμίδιο CYCN

Για την κατασκευή του πλασμιδίου CYCN το οποίο εκτός από τους Insulators δεν έχει ούτε τον Enhancer AR1, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο Ce'. Το Ce' κόπηκε ενζυμικά με τα περιοριστικά ένζυμα Xhol/Ascl, επωάστηκε με την πολυμεράση Klenow, η οποία “γέμισε” τα κολλώδη άκρα που είχαν δημιουργήσει τα ένζυμα περιορισμού και απομονώθηκε η άνω μπάντα μήκους 10939bp.



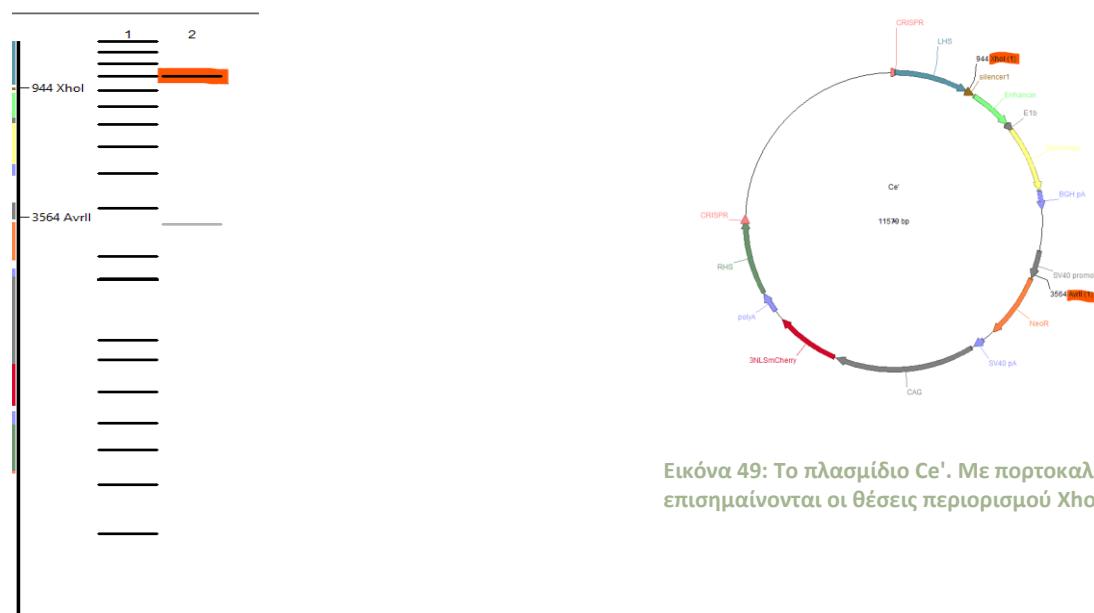
Εικόνα 47: Το πλασμίδιο Ce' με τις θέσεις περιορισμού Ascl/Xhol.

Εικόνα 48: Το πλασμίδιο Ce' κομμένο με Ascl/Xhol, μετά από ηλεκτροφόρηση. Διακρίνεται η άνω μπάντα που απομονώθηκε.

Όπως γίνεται σαφές και από τις εικόνες 14-15, μετά την πέψη αφαιρείται από το πλασμίδιο ο Insulator και ο AR1. Στη συνέχεια, το πλασμίδιο μπήκε σε αντίδραση λιγάσης μόνο του ώστε να κυκλοποιηθεί και να δώσει το πλασμίδιο CYCN.

### Πλασμίδιο CYeCN

Η κατασκευή του πλασμιδίου CYeCN υπήρξε πιο περίπλοκη. Αρχικά, το πλασμίδιο Ce' κόπηκε ενζυμικά με Xhol/AvrII και επωάστηκε σε αντίδραση Αλκαλικής Φωσφατάσης. Μετά από ηλεκτροφόρηση, απομονώθηκε η άνω μπάντα, μήκους 8959bp η οποία στη συνέχεια λειτούργησε ως vector.



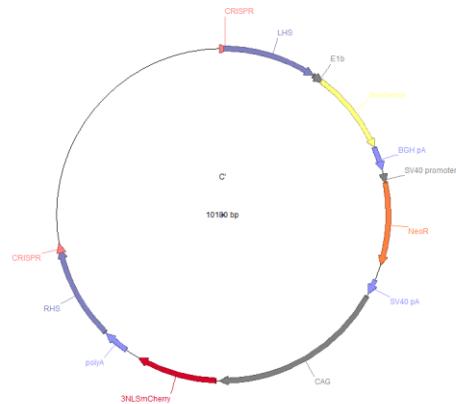
Εικόνα 49: Το πλασμίδιο Ce'. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού Xhol/AvrII.

Εικόνα 50: Το πλασμίδιο Ce' κομμένο ενζυμικά με Xhol/AvrII, μετά από ηλεκτροφόρηση. Με πορτοκαλί φαίνεται η μπάντα που απομονώθηκε.

Για να κατασκευάσουμε το insert για την αντίδραση λιγάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα DNA το Ce' και primers τους εξής:

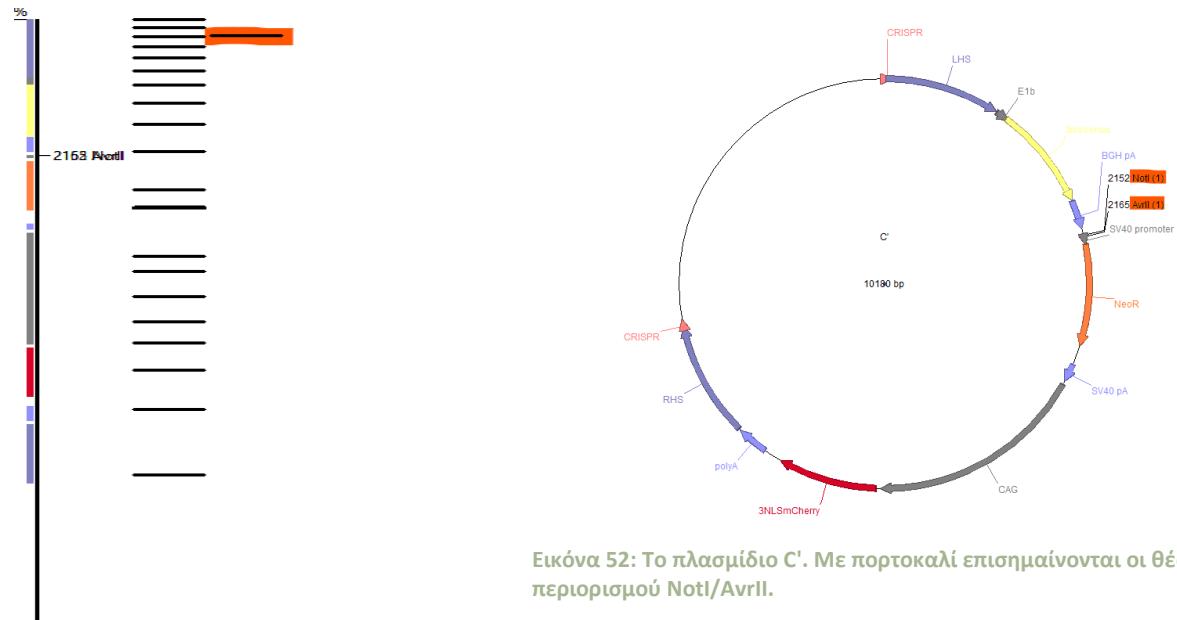
Forward primer	acgttc <u>cctcgag</u> TCTAGAGGGTATATAATGGATCCCATCGC
Reverse primer	aagaat <u>cctaggaaatttgcggccgc</u> GAGCCCCAGCTGGTTCTTTC

Αυτή η PCR συνθέτει τις γονιδιακές αλληλουχίες E1b-YFP-BGH pA-SV40 promoter με άκρα Xhol-AvrI. Μετά από αντίδραση λιγάσης, προέκυψε το ενδιάμεσο πλασμίδιο C'.



Εικόνα 18: το πλασμίδιο C'.

Το C' στη συνέχεια κόπηκε ενζυμικά με NotI/AvrII, επωάστηκε με Αλκαλική Φωσφατάση και μετά από ηλεκτροφόρηση απομονώθηκε η άνω μπάντα μήκους 10167bp η οποία στη συνέχεια λειτούργησε ως vector.



Εικόνα 52: Το πλασμίδιο C'. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού NotI/AvrII.

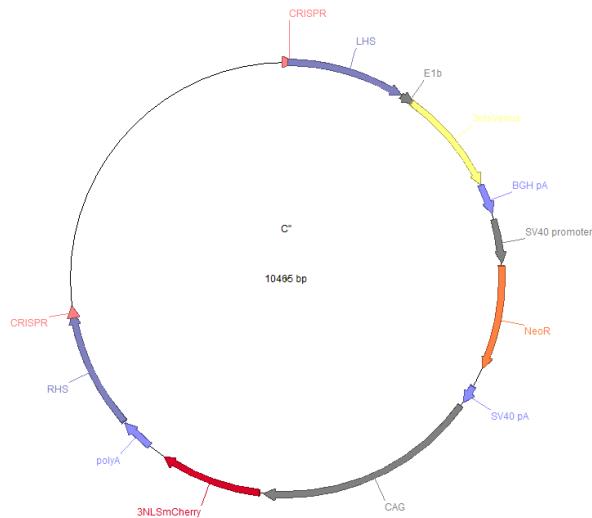
Εικόνα 51: Το πλασμίδιο C' κομμένο ενζυμικά με NotI/AvrII, μετά από ηλεκτροφόρηση. Με πορτοκαλί φαίνεται η μπάντα που απομονώθηκε.

Για να κατασκευάσουμε το insert για την αντίδραση λιγάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα DNA το Ce' και primers τους εξής:

Forward primer	atcttaqcgccgcgttagaaaggcgcgCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAG
Reverse primer	GATCCTCATCCTGTCTTGTAGATCCG

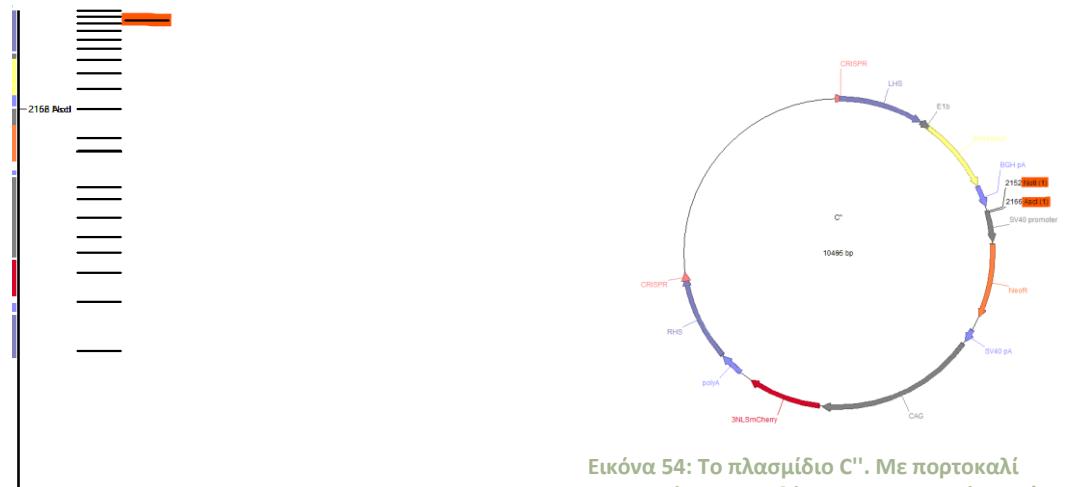
Αυτή η PCR συνθέτει ξανά τον SV40 promoter αυτή τη φορά με τις αλληλουχίες των ενζύμων NotI-Ascl στο ένα άκρο.

Μετά από αντίδραση λιγάσης, προέκυψε άλλο ένα ενδιάμεσο πλασμίδιο, το C''.



Εικόνα 53:Το πλασμίδιο C''.

Το C'' στη συνέχεια, “κόπηκε” με τα περιοριστικά ένζυμα NotI/Ascl, επωάστηκε με Αλκαλική Φωσφατάση και μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκε η άνω μπάντα μήκους 10451 bp, η οποία και λειτούργησε ως vector.



Εικόνα 54: Το πλασμίδιο C''. Με πορτοκαλί επισημαίνονται οι θέσεις περιορισμού NotI/Ascl.

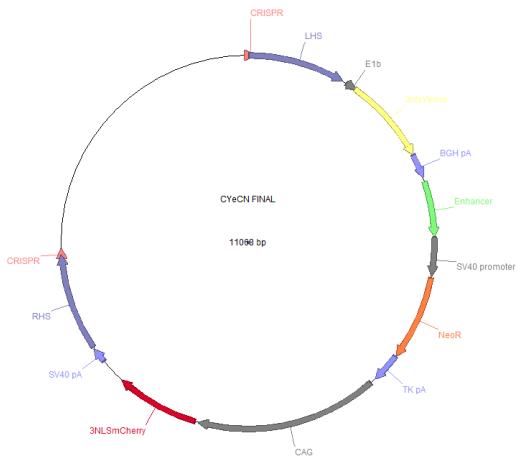
Εικόνα 55: Το πλασμίδιο C'' κομμένο ενζυμικά με NotI/Ascl, μετά από ηλεκτροφόρηση. Με πορτοκαλί φαίνεται η μπάντα που απομονώθηκε.

Για να κατασκευάσουμε το insert για την αντίδραση λιγάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα DNA το Ce και primers τους εξής:

Forward primer	acgaca <u>gcggccgc</u> CCAGTCTGGGTCTAATGCG
Reverse primer	atcttag <u>gcgcgcc</u> TCAAGGTGCACATGACGGCTGC

Αυτή η PCR συνθέτει τον AR1 μόνο με το κομμάτι “enhancer”, με άκρα NotI-Ascl.

Μετά από αντίδραση λιγάσης, προέκυψε το τελικό πλασμίδιο, το **CYeCN**.



Εικόνα 56: το πλασμίδιο CYeCN.

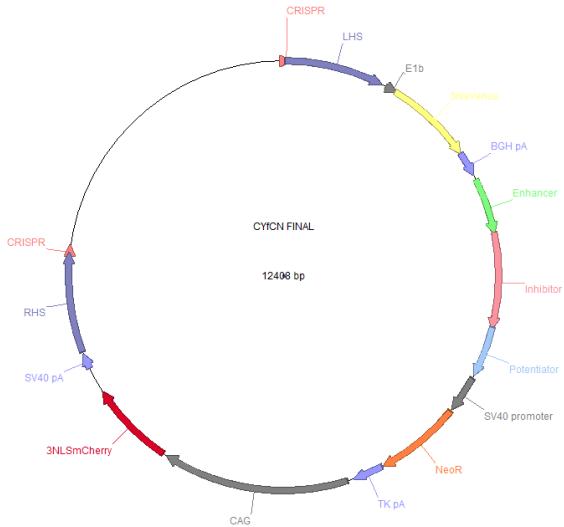
### Πλασμίδιο CYfCN

Για την κατασκευή του πλασμιδίου CYfCN, χρησιμοποιήθηκε πάλι ως vector το πλασμίδιο C'' κομμένο ενζυμικά με NotI/Ascl. Για να κατασκευάσουμε το insert για την αντίδραση λιγάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με υπόστρωμα DNA το Cf και primers τους εξής:

Forward primer	acgaca <u>gcggccgc</u> CCAGTCTGGGTCTAATGCG
Reverse primer	atcttag <u>gcgcgcc</u> TCTACTTGTTCGGGACTGG

Αυτή η PCR συνθέτει ολόκληρο τον AR1, με άκρα NotI-Ascl.

Μετά από αντίδραση λιγάσης, προέκυψε το τελικό πλασμίδιο, το **CYfCN**.



Εικόνα 57:το πλασμίδιο CYfCN.

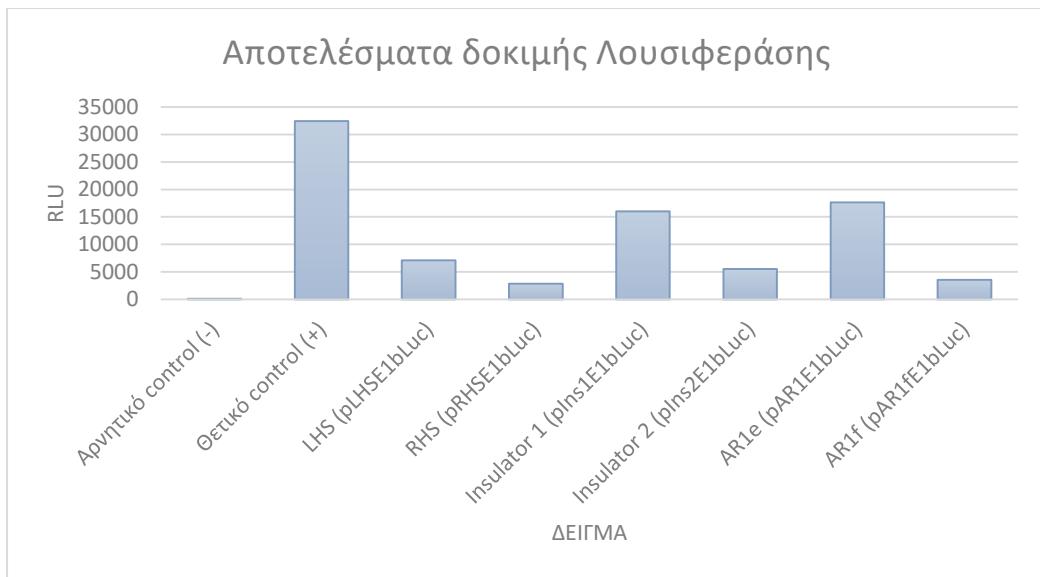
# Αποτελέσματα

## Δοκιμή λουσιφεράσης

Για τις ανάγκες του πειράματος κατασκευάσαμε 6 πλασμίδια, κάθε ένα από τα οποία θα μας βοηθούσε να μελετήσουμε την ενεργότητα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου. Οι αλληλουχίες που επιλέξαμε να μελετήσουμε ήταν οι περιοχές LHS (Left Homologous Sequence), RHS (Right Homologous Sequence), Ins1 (Insulator 1), Ins2 (Insulator 2), AR1f (ενισχυτής AR1 full), AR1e (ενισχυτής AR1 μόνο το κομμάτι “enhancer”). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δυο πλασμίδια control για τον έλεγχο του πειράματος. Το θετικό control διέθετε έναν ενισχυτή ο οποίος είναι γνωστό ότι είναι ενεργός στα βλαστούταρα<sup>154</sup>, ενώ το αρνητικό control τον ελάχιστο υποκινητή E1b. Τα πλασμίδια είχαν την εκάστοτε αλληλουχία-στόχο πριν το γονίδιο αναφοράς (γονίδιο λουσιφεράσης), και το φως που παράγεται, διαβάζεται για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια (10 sec) από το λουμινόμετρο. Τα αποτελέσματα του λουμινόμετρου, εκφράζονται σε μονάδες RLU (Relative Luminometer Units) και είναι ανάλογα με την έκφραση του γονιδίου λουσιφεράσης, δηλαδή όσο υψηλότεροι είναι οι αριθμοί, τόσο υψηλότερη είναι η έκφραση. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα αποτελέσματα που πήραμε από το λουμινόμετρο για κάθε δείγμα:

Δείγμα	RLU
Αρνητικό control (-)	122
Θετικό control (+)	32463
LHS (pLHSE1bLuc)	7110
RHS (pRHSE1bLuc)	2864
Insulator 1 (pIns1E1bLuc)	16009
Insulator 2 (pIns2E1bLuc)	5518
AR1e (pAR1E1bLuc)	17632
AR1f (pAR1fE1bLuc)	3571

<sup>154</sup> Papanayotou C, Benhaddou A, Camus A, et al. A novel nodal enhancer dependent on pluripotency factors and smad2/3 signaling conditions a regulatory switch during epiblast maturation. PLoS Biol. 2014;12(6):e1001890. Published 2014 Jun 24. doi: 10.1371/journal.pbio.1001890

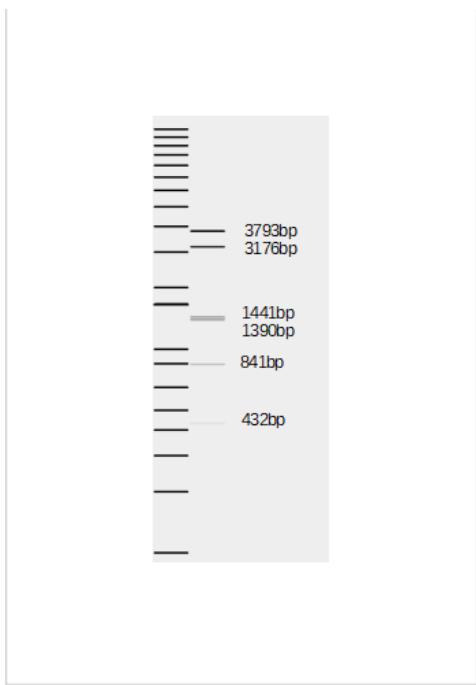


Πίνακας 1: Το γράφημα παρουσιάζει τα αποτελέσματα της δοκιμής Λουσιφεράσης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή RLU, τόσο μεγαλύτερή η ενεργότητα της υπό μελέτης αλληλουχίας.

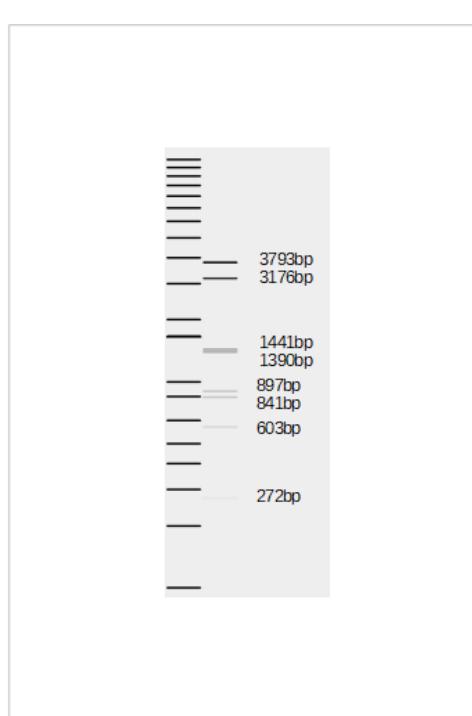
Βάση των ανωτέρω αποτελεσμάτων, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι αλληλουχίες με την μεγαλύτερη ενεργότητα είναι οι Insulator1 και AR1e.

### Διαγνωστική πέψη πλασμιδίων ελέγχου

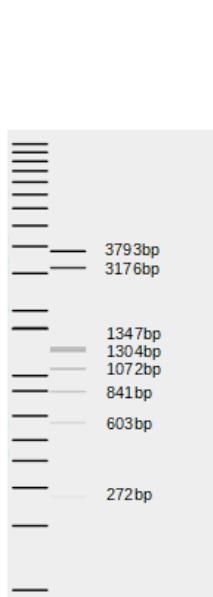
Αφού κατασκευάστηκαν τα 5 νέα πλασμίδια ελέγχου, από τα οποία απουσιάζουν πλήρως, οι αλληλουχίες των Insulators, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με το ένζυμο PstI για να βεβαιωθούμε ότι η αλληλουχία τους είναι αυτή που αρχικά είχαμε σχεδιάσει. Με χρήση του προγράμματος ApE, βλέπουμε τις αναμενόμενες μπάντες από την ηλεκτροφόρηση της εκάστοτε πέψης, και στη συνέχεια τις συγκρίνουμε με την εικόνα που παίρνουμε στο τζελ της ηλεκτροφόρησης. Παρακάτω φαίνονται οι αναμενόμενες μπάντες μετά από πέψη των 5 πλασμιδίων ελέγχου με το ένζυμο PstI, όπως προκύπτουν από το πρόγραμμα ApE:



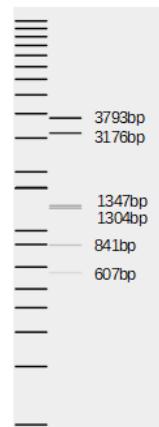
Εικόνα 59: Το πρότυπο πέψης του CeYCN με PstI.



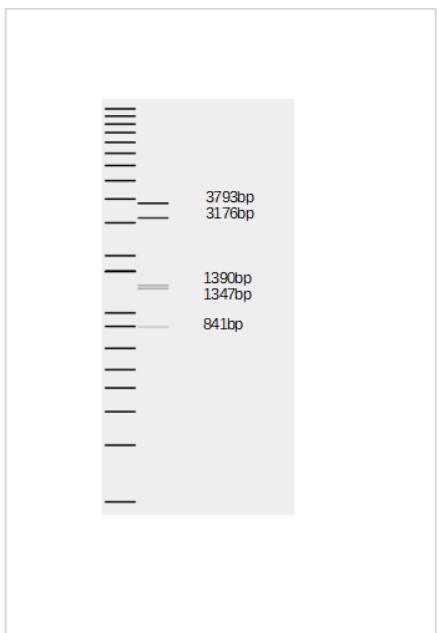
Εικόνα 58: Το πρότυπο πέψης του CfYCN με PstI



Εικόνα 61: Το πρότυπο πέψης του CYfCN με PstI.

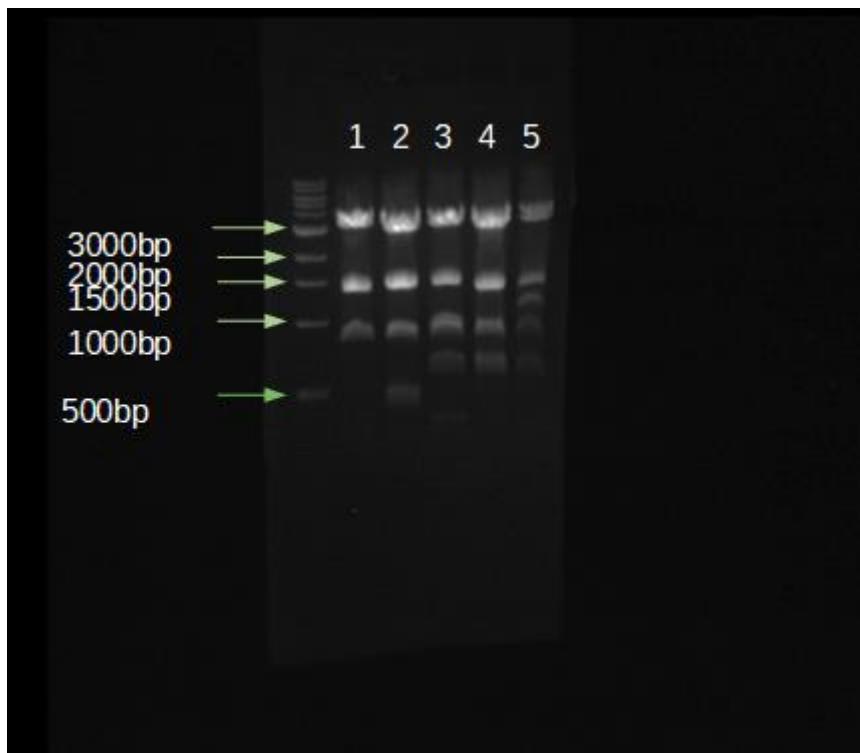


Εικόνα 60: Το πρότυπο πέψης του CYeCN με PstI.



Εικόνα 62: Το πρότυπο πέψης του CYCN με PstI.

Ακολουθεί το τζελ ηλεκτροφόρησης των πέψεων:



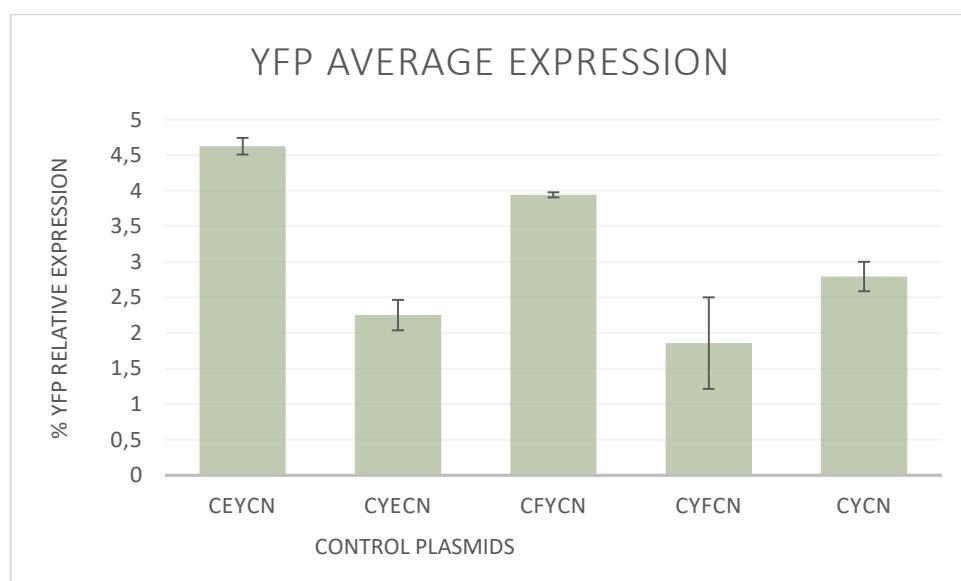
Εικόνα 63: Οι πέψεις των πλασμιδίων ελέγχου με PstI μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα αγαρόζης.  
Στα αριστερά φαίνονται οι μπάντες του 1kb DNA ladder, ενώ με βέλη επισημαίνεται το μέγεθος κάθε μπάντας. Η σειρά των πλασμιδίων ελέγχου έχει ως εξής: 1-CYCN, 2-CeYCN, 3-CfYCN, 4-CYeCN, 5-CYfCN.

Συγκρίνοντας λοιπόν τα αναμενόμενα αποτελέσματα που πήραμε από το λογισμικό ArE με αυτά που πήραμε από την ηλεκτροφόρηση των πέψεων των πλασμιδίων ελέγχου, είδαμε ότι υπάρχει συμφωνία στο πρότυπο των μπαντών που προέκυψαν. Καταλήξαμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι τα πλασμίδια ελέγχου που κατασκευάσαμε με μεθόδους μοριακής κλωνοποίησης, είναι αυτά ακριβώς που είχαμε σχεδιάσει στον υπολογιστή για τις ανάγκες του πειράματος.

### Real Time PCR

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αποτελέσματα της Real Time PCR καταγράφονται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μετρώντας την μεταβολή του φθορισμού και απεικονίζονται με τη μορφή εκθετικής καμπύλης παρουσιάζοντας έτσι την ανάλογη αύξηση των προϊόντων.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου YFP παρουσιάζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου mCherry, ενός γονιδίου με σταθερά επίπεδα έκφρασης στα πλασμίδια ελέγχου. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 64: Η σχετική έκφραση του γονιδίου YFP σε κάθε πλασμίδιο ελέγχου. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο mCherry.

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων συμπεράναμε ότι τελικά τόσο η θέση όσο και η σύσταση του ενισχυτή AR1 επηρεάζουν την ενεργότητα του. Συγκεκριμένα, η έκφραση του YFP ήταν υψηλότερη στο πλασμίδιο CeYCN το οποίο έφερε τον μερικό ενισχυτή πριν το γονίδιο YFP, ενώ την χαμηλότερη έκφραση παρατηρήσαμε στο πλασμίδιο CYfCN το οποίο έφερε ολόκληρο τον ενισχυτή μετά το γονίδιο YFP.

# Συμπεράσματα-συζήτηση

---

Μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας στις μέρες μας είναι η ανισορροπία ανάμεσα στη ζήτηση μοσχευμάτων και στη διαθεσιμότητα τους, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας να αναφέρει ότι μόνο το 10% της παγκόσμιας ανάγκης σε μοσχεύματα καλύπτεται<sup>155</sup>. Στο πλαίσιο αυτό, προκύπτουν κι άλλα ζητήματα όπως για παράδειγμα οι θάνατοι λόγω οργανικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, το φαινόμενο του μεταμοσχευτικού τουρισμού και η απόρριψη ενός μοσχεύματος λόγω της ανοσολογικής απόκρισης του δέκτη.

Η Αναγεννητική Ιατρική, η οποία επικεντρώνεται στην επισκευή, την αντικατάσταση ή αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων, με την χρήση εμβρυικών και επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων έχει ήδη κάνει ελπιδοφόρα βήματα προς την επίλυση των ανωτέρω προβλημάτων. Συγκεκριμένα, ερευνητές κάνοντας χρήση της τεχνικής της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης, έχουν καταφέρει να δημιουργήσει *in vivo* διάφορους ιστούς και όργανα. Έως σήμερα, οι ερευνητές έχουν καταφέρει να δημιουργήσουν μεταξύ άλλων, Τ και Β λεμφοκύτταρα σε ποντίκια ανίκανα να τα παράγουν ενδογενώς<sup>156</sup>, λειτουργικό πάγκρεας από βλαστοκύτταρα ποντικών και αρουραίων σε ποντίκια knock-out για το γονίδιο *Pdx1* (*Pdx1*<sup>-/-</sup>), έναν σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για την ανάπτυξη του παγκρέατος<sup>157</sup>, λειτουργικό πάγκρεας σε *Pdx1*<sup>-/-</sup> χοίρους, νεφρούς από βλαστοκύτταρα ποντικών σε ποντίκια knock-out για το γονίδιο *Sall1*<sup>-/-</sup>, απαραίτητο για τη νεφρογένεση<sup>158</sup>.

Μέχρι σήμερα, καμία ερευνητική ομάδα δεν έχει κατορθώσει με καμία μέθοδο να δημιουργήσει καρδιά. Η ομάδα του Izpisua Belmonte προσπάθησε να δημιουργήσει καρδιά σε *Nkx2.5*<sup>-/-</sup> ποντίκια εγχέοντας PSCs αρουραίων με τη μέθοδο της συμπληρωματικότητας της βλαστοκύστης. Όπως είναι ήδη γνωστό, η αποσιώπηση του σημαντικού καρδιακού δείκτη *Nkx2.5*, δεν οδηγεί σε πλήρη απουσία καρδιάς, αλλά έχει ως αποτέλεσμα έναν καρδιακό ιστό μη κανονικής μορφολογίας στα knock out ζώα. Κατ' επέκταση, η έγχυση των PSCs αρουραίων αν και έσωσε την μορφολογία του καρδιακού ιστού στα χιμαιρικά ζώα, δεν οδήγησε στο σχηματισμό του οργάνου αποκλειστικά από τα κύτταρα δότες. Επιπροσθέτως, οι ερευνητές δεν κατάφεραν να πάρουν ζωντανά χιμαιρικά ζώα. Γίνεται λοιπόν κατανοητό, ότι η ανάπτυξη καρδιάς με τη συμπληρωματικότητα της βλαστοκύστης είναι μάλλον αδύνατη, καθώς η αποσιώπηση ενός και μόνο γονιδίου, δεν οδηγεί σε πλήρη έλλειψη του οργάνου. Για το λόγο αυτό, από το 2016 η ερευνητική ομάδα του K. Παπαναγιώτου έχει στρέψει τις προσπάθειες της στη δημιουργία αλλογενούς καρδιάς σε ποντίκια, με μια διαφορετική γενετική

<sup>155</sup> Jones B, Bes M. Keeping kidneys. Bull. World Health Organ. 2012

<sup>156</sup> Chen, J, R Lansford, V Stewart, F Young, and fw Alt. (1993). RAG-2- deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4528–4532.

<sup>157</sup> Kobayashi T, T Yamaguchi, S Hamanaka, M Kato-Itoh, Y Yamazaki, M Ibata, H Sato, YS Lee, J Usui, et al. (2010).

Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. Cell 142:787–799.

<sup>158</sup> Usui J, T Kobayashi, T Yamaguchi, AS Knisely, R Nishinakamura and H Nakuchi. (2012). Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. Am J Pathol 180:2417–2426.

προσέγγιση η οποία υπόσχεται να λύσει κάποια από τα προβλήματα που πρόκυπταν με τη συμπληρωματικότητα της βλαστούστης, όπως για παράδειγμα η αποίκιση και άλλων ιστών εκτός από τον ιστό-στόχο ή η επίδραση που έχει η αποσιώπηση ενός γονιδίου σε άλλες πτυχές της φυσιολογίας των χιμαιρικών ζώων. Πιο συγκεκριμένα, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν δύο γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές εμβρυικών βλαστικών κυττάρων εκ των οποίων η μία θα συνεισφέρει σε καρδιακούς ιστούς και η άλλη σε μη καρδιακούς ιστούς στο αναπτυσσόμενο χιμαιρικό έμβρυο. Τόσο για τα κύτταρα του δότη όσο και για του δέκτη, θα δημιουργηθεί εργαστηριακά μια αλληλουχία DNA η οποία θα εισαχθεί με τη μέθοδο CRISPR, στο γενετικό τόπο *Hip11* του γονιδιώματος των mESC. Και οι δύο αλληλουχίες που θα δημιουργηθούν θα εμπεριέχουν τον ενισχυτή του *Nkx2.5*, AR1. Το *Nkx2.5*, είναι ο πρώτος γνωστός δείκτης της καρδιακής γενεαλογίας, ενώ ο AR1 ο οποίος βρίσκεται 9kb άνωθεν του γονιδίου, είναι το πρώτο ρυθμιστικό στοιχείο του γονιδίου *Nkx2.5* που ενεργοποιείται στο καρδιογενές μεσόδερμα. Είναι ενεργός στο πρωτογενές καρδιακό πεδίο από την ημέρα E7.5 και στο δευτερογενές καρδιακό πεδίο από την ημέρα E8.0. Το *Nkx2.5* εκφράζεται επίσης στον αναπτυσσόμενο φάρυγγα, θυρεοειδή και στομάχι, αλλά η έκφραση του εκεί ρυθμίζεται από άλλες ρυθμιστικές περιοχές και όχι από τον AR1<sup>159</sup>.

Η αλληλουχία των κυττάρων δέκτη (εικ.1) θα χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση των mESCs μαζί με ένα πλασμίδιο CRISPR το οποίο εκφράζει την νουκλεάση Cas9 και το gRNA το οποίο οδηγεί το ένζυμο σε συγκεκριμένη αλληλουχία στον γενετικό τόπο *Hip11*. Οι περιοχές LHS και RHS στα άκρα της αλληλουχίας μας θα επιτρέψουν στον επιδιορθωτικό μηχανισμό του DNA να την εισάγει στο γενετικό τόπο, μέσω του μηχανισμού ομόλογου ανασυνδυασμού. Τα κύτταρα τα οποία θα ενσωματώσουν την αλληλουχία στο γονιδίωμα τους, θα αποκτήσουν ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και θα εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική tdTomato υπό τον έλεγχο του υποκινητή CAG. Η διφθεροτοξίνη A (dtA) δεν θα παραχθεί καθώς το γονίδιο tdTomato έχει τοποθετηθεί ανάμεσα στο γονίδιο της dtA και τον υποκινητή CAG και η ρεκομπινάση FLP δεν θα εκφραστεί αφού ο ενισχυτής *Nkx2.5-AR1*, δεν είναι ενεργός στα βλαστοκύτταρα. Όσον αφορά την κασέτα CreER, αυτή θα παράγει την CreER ρεκομπινάση η οποία όμως είναι ανενεργή απουσία ταμοξιφένης.

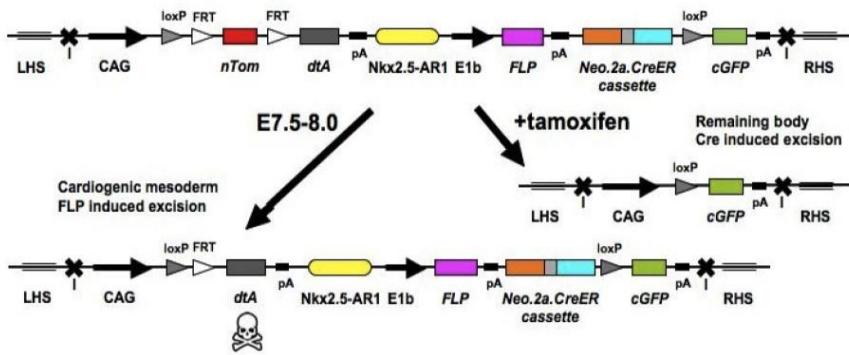
Μέχρι την ημέρα E7.5 τα κύτταρα του δέκτη θα βρίσκονται διάσπαρτα στα χιμαιρικά έμβρυα. Την ημέρα αυτή, ο *Nkx2.5-AR1* θα ενεργοποιηθεί και η FLP ρεκομπινάση θα παραχθεί στο πρωτογενές καρδιακό πεδίο, ενώ την ημέρα E8.0 στο δευτερογενές. Η FLP θα καταλύσει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις δυο FRT αλληλουχίες, αποκόπτοντας την κασέτα tdTomato. Έτσι, ο CAG υποκινητής βρίσκεται δίπλα από την dtA, ενεργοποιώντας τη και σκοτώνοντας τα κύτταρα στην καρδιά του εμβρύου. Την ημέρα E8.5 γίνεται προσθήκη ταμοξιφένης οπότε η CreER ρεκομπινάση ενεργοποιείται στα κύτταρα δέκτες που βρίσκονται έξω από το καρδιογενές μεσόδερμα και καταλύει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις IoxP περιοχές, αποκόπτοντας όλες τις ενδιάμεσες αλληλουχίες, αφήνοντας μόνο την κασέτα GFP. Τα κύτταρα δέκτη επιζούν μόνο στο σώμα του εμβρύου καθώς η dtA έχει απομακρυνθεί με τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στα FRT.

Είναι πολύ σημαντικό για την πειραματική διαδικασία να μην υπάρχει έκφραση του AR1 νωρίτερα από το φυσιολογικό δηλαδή την ημέρα E7.5. Αυτό διότι εάν εκφράζεται πρόωρα

---

<sup>159</sup> Schwartz RJ, Olson EN. Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating *Nkx2-5* transcription. (1999) Development. 126(19):4187-92.

στα βλαστοκύτταρα τα οποία θα επιμολύνουμε αργότερα με τα πλασμίδια του δέκτη, θα ενεργοποιήσει την FLP η οποία θα καταλύσει τον ομόλογο ανασυνδιασμό ανάμεσα στις δυο FRT αλληλουχίες, αποκόπτοντας την κασέτα *tdTomato*. Έτσι, ο CAG υποκινητής θα βρεθεί δίπλα από την *dtA*, ενεργοποιώντας τη και σκοτώνοντας όσα βλαστοκύτταρα το έχουν λάβει, οδηγώντας σε αποτυχία του πειράματος.



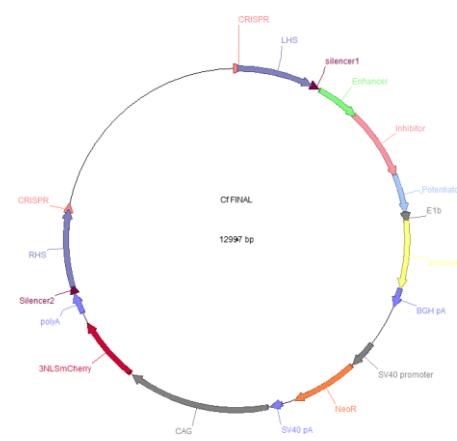
Εικόνα 65: το πλασμίδιο του δέκτη. Φαίνεται πώς η ενεργοποίηση του AR1 οδηγεί σε θάνατο των βλαστοκυττάρων που θα το λάβουν.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η κατασκευή και η μελέτη των πλασμιδίων ελέγχου, των πλασμιδίων δηλαδή τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η ενεργότητα του καρδιακού ενισχυτή AR1 του γονιδίου *Nkx2.5*. Ο ενισχυτής AR1, βρίσκεται περίπου 9 kb άνωθεν του γονιδίου και αποτελείται από 2 θετικές ρυθμιστικές περιοχές (Enhancer και Potentiator) με μια ενδιάμεση αρνητική ρυθμιστική περιοχή (Inhibitor)<sup>160</sup>. Αυτός ο ενισχυτής ρυθμίζει την έκφραση του *Csx* / *Nkx2.5* από τα πρώτα στάδια της καρδιογένεσης μέχρι την καρδιακή αναδίπλωση αλλά στη συνέχεια, η δραστηριότητα του περιορίζεται στη δεξιά κοιλία, αφήνοντας άλλες ρυθμιστικές περιοχές να αναλάβουν την γονιδιακή έκφραση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>161</sup>, η ρυθμιστική περιοχή “Enhancer” είναι ικανή από μόνη της να επάγει την έκφραση του *Nkx2.5* στην καρδιά, ενώ η ρυθμιστική περιοχή του Potentiator δεν έχει αυτόνομη δραστηριότητα. Για τον λόγο αυτό κατασκευάσαμε 2 τύπους πλασμιδίων-ελέγχου. Τα πλασμίδια ελέγχου Cf (Control full) που διαθέτουν ολόκληρο τον ενισχυτή AR1 (Enhancer- Inhibitor -Potentiator), και τα πλασμίδια ελέγχου Ce (Control enhancer) που διαθέτουν μόνο το κομμάτι “Enhancer”. Και στις δύο περιπτώσεις, ο ενισχυτής AR1 ελέγχει την έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής YFP (Yellow Fluorescent Protein). Εφόσον ο ενισχυτής *Nkx2.5-AR1*, φυσιολογικά δεν είναι ενεργός, παρά μόνο την ημέρα E7.5 στο μορφογενετικό πεδίο της καρδιάς, τα βλαστοκύτταρα τα οποία ενσωματώσουν τα πλασμίδια ελέγχου δεν πρέπει να εκφράζουν την YFP, παρά μόνο όταν διαφοροποιηθούν προς καρδιοκύτταρα.

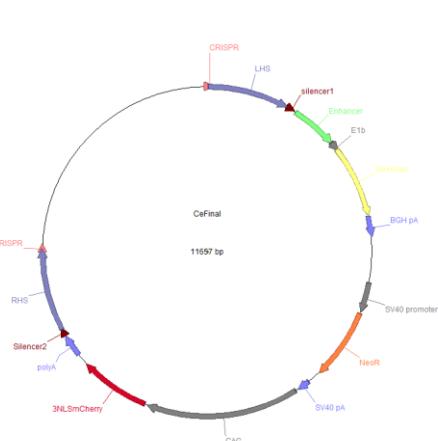
160 Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN. Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer. Development. 1999;126(1):75–84.

161 Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN. Control of early cardiac-specific transcription of *Nkx2-5* by a GATA-dependent enhancer. Development. 1999;126(1):75–84.

Στο εργαστήριο είχαν αρχικά κατασκευαστεί 2 πλασμίδια ελέγχου, ένα με όλον τον ενισχυτή *Nkx2.5-AR1* (Cf) και ένα μόνο με το κομμάτι του enhancer (Ce). Τα πλασμίδια είχαν κοινή κατασκευή, διαφέροντας μόνο ως προς τη σύσταση του AR1. Διαθέτουν στα άκρα τους περιοχές που αναγνωρίζει η CRISPR στον γενετικό τόπο Hipp11. Η Cas9 νουκλεάση θα αναγνωρίσει αυτή την αλληλουχία τόσο στο γονιδίωμα, όσο και στο πλασμίδιο και θα κόψει εκεί, αφήνοντας το πλασμίδιο γραμμικό και το γενομικό DNA κομμένο. Δίπλα ακριβώς από τις περιοχές της CRISPR, βρίσκονται οι RHS και LHS (Right Homologous Sequence και Left Homologous Sequence), περιοχές ομοιογίας με τα άκρα που έχει δημιουργήσει η πέψη της Cas9 στο γενομικό DNA. Μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού, το γραμμικό πλέον ένθεμα που έχουμε κατασκευάσει, θα τοποθετηθεί στο ακριβές σημείο που θέλουμε στο γενετικό τόπο Hipp11. Ακολουθεί το γονίδιο της φθορίζουσας χρωστικής YFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή E1b συνοδευόμενη από το polyA της, και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή SV40 και το polyA της. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη είναι απαραίτητο ώστε να γίνει η επιλογή των βλαστοκυττάρων που έχουν λάβει το ένθεμα, μετά τη χορήγησης του αντιβιοτικού νεομυκίνη. Στη συνέχεια βρίσκεται το γονίδιο της χρωστικής mCherry υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CAG, ακολουθούμενου από το σήμα polyA. Το γονίδιο mCherry θα μας επιτρέψει να δούμε τα κύτταρα τα οποία ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο, να φθορίζουν κόκκινα. Τέλος, ακριβώς μετά την αλληλουχία RHS και πριν την RHS, υπάρχουν οι περιοχές Insulators, οι οποίες προστατεύουν την αλληλουχία από την επίδραση ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος. Τα αρχικά πλασμίδια ελέγχου Ce, Cf φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 66: Το πλασμίδιο ελέγχου Cf

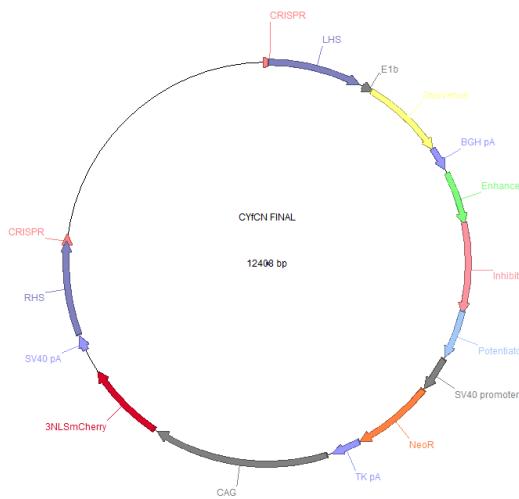


Εικόνα 67: Το πλασμίδιο ελέγχου Ce

Τα πλασμίδια αυτά, είχαν χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση βλαστοκυττάρων και στη συνέχεια μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με χρήση qPCR. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν αυξημένη έκφραση της YFP, δηλαδή υψηλή ενεργότητα του ενισχυτή. Για τον λόγο αυτό, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, η διενεργήθηκε τεστ λουσιφεράσης το οποίο έδειξε ότι η έκφραση της YFP πυροδοτείται από κάποιο τμήμα της αλληλουχίας των Insulators.

Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκαν νέα πλασμίδια ελέγχου από τα οποία απουσιάζουν πλήρως, οι αλληλουχίες των Insulators. Όπως και τα προηγούμενα, όλα τα πλασμίδια διατηρούν κάποιες κοινές γονιδιακές αλληλουχίες οι οποίες επιτρέπουν την εισαγωγή του πλασμιδίου στο επιθυμητό σημείο του γενετικού τόπου Hipp11(αλληλουχίες CRISPR, LHS, RHS) και την επιλογή των βλαστοκυττάρων που έχουν ενσωματώσει το ένθεμα (κασέτα αντίστασης στη νεομυκίνη). Επιπροσθέτως, θέλοντας να μελετήσουμε εάν η θέση του ενισχυτή παιζει κάποιο ρόλο στην γονιδιακή έκφραση, κατασκευάσαμε πλασμίδια ελέγχου τα οποία διαφέρουν ως προς τη θέση του *Nkx2.5-AR1* σε σχέση με το γονίδιο YFP. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση βλαστοκυττάρων με τη μέθοδο CRISPR, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα Real time PCR ώστε να μελετηθεί το ποσοστό της σχετικής έκφρασης του γονιδίου YFP σε σχέση με την έκφραση του mCherry.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αποτελούν ένα σημαντικό βήμα στη μετέπειτα προσπάθεια των πειραμάτων για τη δημιουργία αλλογενούς καρδιάς, καθώς καταφέραμε να μελετήσουμε τη συμπεριφορά του ενισχυτή AR1, όταν αυτός ενσωματωθεί στο γονίδιώμα των βλαστοκυττάρων. Αποδείχθηκε ότι τόσο η θέση, όσο και η σύσταση του ενισχυτή AR1 επηρεάζουν την ενεργότητα του. Συγκεκριμένα, στα βλαστοκυττάρα ολόκληρος ο ενισχυτής AR1 (AR1f) έχει χαμηλότερη ενεργότητα σε σχέση με τον μερικό ενισχυτή (AR1e), ενώ η ιδανικότερη θέση του είναι καθοδικά του γονιδίου YFP. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το πλασμίδιο CYfCN (εικ.4), είναι το ιδανικότερο για χρήση καθώς τόσο η σύσταση όσο και η θέση του ενισχυτή AR1, πυροδοτούν το χαμηλότερο ποσοστό έκφρασης του YFP.



Εικόνα 68: Το πλασμίδιο ελέγχου CYfCN

Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι για την συνέχεια του project, είναι ιδανική η χρήση ολόκληρου του ενισχυτή AR1 για την κατασκευή των πλασμιδίων δότη και δέκτη, καθώς η ενεργότητα του είναι σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα πριν την ημέρα E7.5.

Επιπροσθέτως, το πλασμίδιο που κατασκευάσαμε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για την μελέτη της ενεργότητας και άλλων ενισχυτών, καθώς περιέχει όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για τη μελέτη αυτή, χωρίς ωστόσο κάποια από αυτές να πυροδοτεί γονιδιακή έκφραση, αλλοιώνοντας έτσι τα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία προσθέτει στην ήδη υπάρχουσα γνώση σχετικά με τον ενισχυτή AR1 του καρδιακού δείκτη  $Nkx2.5$  και την ενεργότητα του, προτείνει μια νέα πλασμιδιακή κατασκευή με την οποία μπορεί να μελετηθεί η ενεργότητα και άλλων ενισχυτών, και συμβάλει καθοριστικά στον πειραματικό σχεδιασμό του project για την δημιουργία της αλλογενούς καρδιάς.

---

# Βιβλιογραφία

---

"PCR". Genetic Science Learning Center, University of Utah. n.d.

A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue. n.d.

A. Buchberger, K. Ragge, H.H. Arnold, the myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994), pp. 17289-17296. n.d.

Amy I Kavka, Jeremy B.A Green, Tales of tails: Brachyury and the T-box genes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1333, Issue 2, 1997. n.d.

Anderson RH, Spicer DE, Hlavacek AM, Cook AC, Backer CL: Wilcox's surgical anatomy of the heart. 4th ed., Cambridge University Press, 2013. n.d.

Anonymous. Second Global Consultation in Human Transplantation: Towards a Common Attitude to Transplantation. World Health Organization, 2007. n.d.

Antoon Moorman et al., Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks, *Heart* 2013. n.d.

Avery, Oswald T., Colin M. MacLeod, και Maclyn McCarty (1944-02-01). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Typ. n.d.

Bellamy V, Vanneau V, Bel A, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* 2015, και 34(9):1198–207. n.d.

Benoit G. Bruneau, Zheng-Zheng Bao, Makoto Tanaka, Jean-Jacques Schott, Seigo Izumo, Constance L. Cepko, J.G. Seidman, Christine E. Seidman, Cardiac Expression of the Ventricle-Specific Homeobox Gene Irx4 Is Modulated by Nkx2-5 and dHand, *Developmental Biol.* n.d.

Bertani, G (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli". *J. Bacteriol.* 62 (3): 293–300. PMC 386127. PMID 14888646. n.d.

Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 2011, και 45:273–297. [PubMed: 22060043]. n.d.

Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013, και 3(10): a013847. Published 2013 Oct 1. doi:10.1101/cshperspect. a013847. n.d.

- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169:338–346. n.d.
- Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6, 826–835 (2005) doi:10.1038/nrg1710. n.d.
- C Biben and R P Harvey, Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development., *Genes Dev.* June 1, 1997 11: 1357-1369, και doi:10.1101/gad.11.11.1357. n.d.
- C Biben, T Hatzistavrou, R.P Harvey, Expression of NK-2 class homeobox gene Nkx2–6 in foregut endoderm and heart, *Mechanisms of Development*, Volume 73, Issue 1, 1998. n.d.
- C.L. Lien, C. Wu, B. Mercer, R. Webb, J.A. Richardson, E.N. Olson, Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer, *Development* 1999 126: 75-84. n.d.
- Chan YS, J Goke, JH Ng, X Lu, KA Gonzales, CP Tan, WQ Tng, ZZ Hong, YS Lim, HH Ng. (2013). Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* 13:663-675. n.d.
- Chen, J, R Lansford, V Stewart, F Young, and fw Alt. (1993). RAG-2- deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4528–4532. n.d.
- Ching Yi Chen and Robert J. Schwartz, Identification of Novel DNA Binding Targets and Regulatory Domains of a Murine Tinman Homeodomain Factor, *nkx-2.5*, 1995, *The Journal of Biological Chemistry* 270, 15628-15633. n.d.
- Christine M. Liberatore, Robin D. Searcy-Schrick, Eric B. Vincent, Katherine E. Yutzey, Nkx-2.5 Gene Induction in Mice Is Mediated by a Smad Consensus Regulatory Region, *Developmental Biology*, Volume 244, Issue 2, 2002. n.d.
- Cleaver OB, Patterson KD, Krieg PA, Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in Xenopus embryos results in myocardial hyperplasia, *Development*. 1996 Nov, και 122(11):3549-56. n.d.
- Cong L, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013, και 339:819–823. [PubMed: 23287718]. n.d.
- D. Voytas, “Agarose gel electrophoresis,” in *Current Protocols in Molecular Biology*. John. n.d.
- D.Y. Stainier, B. Fouquet, J.N. Chen, K.S. Warren, B.M. Weinstein, S.E. Meiler, M.A. Mohideen, S.C. Neuhauss, L. Solnica-Krezel, A.F. Schier, F. Zwartkruis, D.L. Stemple, J. Malicki, W. Driever, M.C. Fishman, Mutations affecting the formation and function. n.d.

- De Los Angeles et al., (2015) - Hallmarks of pluripotency, *Nature* 525:469. n.d.
- development, *Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian*. n.d.
- E. Knight, S. Przyborski, Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro, *J. Anat.* 227 (2015) 746–756. n.d.
- Edouard G Stanley, Christine Biben, Andrew Elefantiy, Louise Barnett, Frank Koentgen, Lorraine Robb and Richard P Harvey, Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5., *Int. J.* n.d.
- Evans SM, Yan W, Murillo MP, Ponce J, Papalopulu N. *tinman*, a Drosophila homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of gene in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of *tinman*. *Develo.* n.d.
- Evans, M., Kaufman, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156 (1981). <https://doi.org/10.1038/292154a0>. n.d.
- Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9 Rajat M. Gupta and Kiran Musunuru *J Clin Invest.* 2014, *kai* 124(10):4154–4161. doi:10.1172/JCI72992. n.d.
- Frasch, M. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464–467 (1995) doi:10.1038/374464a0. n.d.
- G. Ranganayakulu, D.A. Elliott, R.P. Harvey, E.N. Olson, Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice, *Development* 1998 125: 3037-3048. n.d.
- Gafni O, L Weinberger, AA Mansour, YS Manor, E Chomsky, D Ben-Yosef, Y Kalma, S Viukov, I Maza, et al. (2013). Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells. *Nature* 504:282-286. n.d.
- Good RA, Meuwissen HJ, Hong R, Gatti RA. Bone marrow transplantation: correction of immune deficit in lymphopenic immunologic deficiency and correction of an immunologically induced pancytopenia. *Trans Assoc AM Physicians.* 1969, *kai* 82:278–85. n.d.
- H. Zhang, A. Bradley, Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. n.d.
- Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009, 10:526–537. n.d.

- Hideko Kasahara, Sonia Bartunkova, Martina Schinke, Makoto Tanaka, and Seigo Izumo, Cardiac and Extracardiac Expression of Csx/Nkx2.5 Homeodomain Protein, Circulation Research 1998, και 82(9). doi.org/10.1161/01.RES.82.9.936. n.d.
- Hippenmeyer, S. et al. Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. Neuron 68, 695–709 (2010). n.d.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science. 2010, και 327:167–170. [PubMed: 20056882]. n.d.
- <http://www.jove.com/science-education/5059/bacterial-transformation-the-heat-shock-method.>, Bacterial transformation: The heat shock method. (2016). In (2016). In JoVE science education database. Retrieved from. n.d.
- Illingworth CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. 1974, Journal of Pediatric Surgery, Volume 9, Issue 6, 853 - 858. n.d.
- I Lyons, L M Parsons, L Hartley, R Li, J E Andrews, L Robb, and R P Harvey, Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5, Genes Dev. July 1, 1995 9: 1654-1666; doi:10.1101/gad.9.13.1654
- International Summit on Transplant Tourism and Organ Trafficking. The Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism. Clin J Am Soc Nephrol., 2008, 3(5):1227–1231. doi:10.2215/CJN.03320708. n.d.
- Israni AK et al., OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: deceased organ donation. Am. J. Transplant. 2014. n.d.
- J D Molkentin, Q Lin, S A Duncan, and E N Olson, Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis., Genes Dev. April 15, 1997 11: 1061-1072, και doi:10.1101/gad.11.8.1061. n.d.
- J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, Tissue Eng. Part B Rev. 14 (2008) 61–86. n.d.
- J.M. Reecy, X. Li, M. Yamada, F.J. DeMayo, C.S. Newman, R.P. Harvey, R.J. Schwartz, Identification of upstream regulatory regions in the heart-expressed homeobox gene Nkx2-5, Development 1999 126: 839-849. n.d.
- Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell. 2008, και 132(4):567–582. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015. n.d.
- James M. Reecy, Miho Yamada, Kathleen Cummings, Drazen Sosic, Ching-Yi Chen, Gregor Eichele, Eric N. Olson, Robert J. Schwartz,. n.d.
- Jeffery D. Molkentin, The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6: UBIQUITOUSLY EXPRESSED REGULATORS OF TISSUE-SPECIFIC GENE EXPRESSION, J. Biol. Chem. 2000 275: 38949-. doi:10.1074/jbc.R000029200. n.d.
- Jones B, Bes M. Keeping kidneys. Bull. World Health Organ. 2012. n.d.

Joseph Sambrook & David W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-879-69576-7. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. n.d.

Kobayashi T, M Kato-Itoh, and H Nakauchi. (2014). Targeted Organ Generation Using Mixl1 Inducible Mouse Pluripotent Stem Cells in Blastocyst Complementation. *Stem Cells and Development* 24:182-189. n.d.

Kobayashi T, T Yamaguchi, S Hamanaka, M Kato-Itoh, Y Yamazaki, M Ibata, H Sato, YS Lee, J Usui, et al. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142:787–799. n.d.

Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, και 90(17):8145–8149. doi:10.1073/pnas.90.17.8145. n.d.

Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E. et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60–65 (2009) doi:10.1038/nature08152. n.d.

Kriks S, J-W Shim, J Piao, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011, και 480(7378):547–51. n.d.

Kyu-Ho Lee, Qihong Xu, Roger E. Breitbart, A Newtinman-Related Gene, nkx2.7, Anticipates the Expression of nkx2.5 and nkx2.3 in Zebrafish Heart and Pharyngeal Endoderm, *Developmental Biology*, Volume 180, Issue 2, 1996. n.d.

Laverriere A. C., MacNeill C., Mueller C., Poelmann R. E., Burch J. B., Evans T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177-23184. n.d.

Lennox, E. S. (1955). "Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1". *Virology*. 1 (2): 190–206. doi:10.1016/0042-6822(55)90016-7. PMID 13267987. n.d.

Li, X. et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing. *Cell Res* 24, 501 504 (2014). n.d.

Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA and Olson EN. (1999). Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer. *Development* 126, 75-84. n.d.

Lubert Stryer. *Biochemistry* (3rd ed.). Freeman. pp. 658–659, n.d.

Luciferase Assay, Stephen T. Smale, Cold Spring Harb Protoc, 2010, και doi:10.1101/pdb.prot542. n.d.

- Luria, S. E., J. N. Adams, και R. C. (1960). "Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles". *Virology*. 12 (3): 348–390. doi:10.1016/0042-6822(60)90161-6. PMID Ting. n.d.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1981, 78(12):7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634. n.d.
- M. Tanaka, Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki, S. Izumo, the cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development, *Development* 1999 126: 1269-1280. n.d.
- manuscript, AnesthAnalg. Author, και available in PMC 2017 September 01. n.d.
- Matsunari H, H Nagashima, M Watanabe, K Umeyama, K Nakano, M Nagaya, T Kobayashi, T Yamaguchi, R Sumazaki, LA Herzenberg and H Nakauchi. (2013). Blastocyst complementation generates exogenous pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sc.* n.d.
- Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenous pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, και 110(12):4557–4562. doi:10.1073/pnas.1222902110. n.d.
- Mikael Kubista, José Manuel Andrade, Martin Bengtsson, Amin Forootan, Jiri Jonák, Kristina Lind, Radek Sindelka, Robert Sjöback, Björn Sjögren, Linda Strömbom, Anders Ståhlberg, Neven Zoric, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 27, Issues 2–3, 2006, Pages 95-125, ISSN 0098-2997
- Miller JC, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2007, και 25:778–785. [PubMed: 17603475]. n.d.
- Modorich P, Lehman IR (10 November 1973). "Deoxyribonucleic acid ligase. A steady state kinetic analysis of the reaction catalyzed by the enzyme from *Escherichia coli*" (PDF). *J Biol Chem.* 248 (21): 7502–11. PMID 4355585. n.d.
- Nagai, T, K Ibata, E. S. Park, M Kubota, K Mikoshiba, και A (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications". *Nature Biotechnology*. 20 (1): 87–90. doi:10.1038/nbt0102-87. PMID Miyawaki. n.d.
- National Institutes of Health resource for stem cell research, 2008. n.d.
- Nichols J and A Smith. (2009). Naïve and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 4:487-492, n.d.
- Nicole Kresge, Robert D. Simoni and Robert L. Hill (January 12, 2007). "Insights into DNA Joining: I. Robert Lehman's Work on DNA Ligase". *The Journal of Biological Chemistry*. 282. n.d.

Old, Robert W., καὶ Sandy B. Primrose (1994-09-27). Principle of Gene Manipulation - An Introduction to Genetic Engineering (5th ed.). Blackwell Scientific. p. 37. ISBN 9780632037124. n.d.

Orlando G, Soker S, Stratta RJ, Atala A. Will regenerative medicine replace transplantation? Cold Spring Harb Perspect Med. 2013, καὶ 3(8): a015693. Published 2013 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect. a015693. n.d.

Papanayotou C, Benhaddou A, Camus A, et al. A novel nodal enhancer dependent on pluripotency factors and smad2/3 signaling conditions a regulatory switch during epiblast maturation. PLoS Biol. 2014, καὶ 12(6):e1001890. Published 2014 Jun 24. doi:10.1371/journa. n.d.

Patakis, Aeschylus. Prometheus bound. Athens:, καὶ 415 B.C. n.d.

Pedro M. Baptista, Anthony Atala, in Translating Regenerative Medicine to the Clinic, 2016. n.d.

Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, et al. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. Cell. 2007, καὶ 128(5):947–959. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.042. n.d.

R. Bodmer, the gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila, Development 1993 118: 719-729. n.d.

R.D. Searcy, E.B. Vincent, C.M. Liberatore, K.E. Yutze, A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice, Development 1998 125: 4461-4470. n.d.

R.J. Schwartz, E.N. Olson, Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription. n.d.

Recillas-Targa F (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. Mol Biotechnol 34(3):337–354. n.d.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2011). DNA tools and biotechnology. In Campbell biology (10th ed., pp. 408-435). San Francisco, CA: Pearson. n.d.

Reyon D, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat. Biotechnol. 2012, καὶ 30:460–465. [PubMed: 22484455]. n.d.

Rosenthal N. Prometheus 's vulture and the stem-cell promise. N Engl J Med, 2003,349:267-274 DOI: 10.1056/NEJMra020849. n.d.

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro". Nucleic Acids Res. 18 (21): 6409–6412. doi:10.1093/nar/18.21.6409. PMC 332522. PMID 2243783. n.d.

- Saidi RF, Hejazi Kenari SK. Clinical transplantation and tolerance: are we there yet? *Int J Organ Transplant Med* 2014, και 5(4):137–45. n.d.
- Schultheiss, T & Xydas, S & Lassar, Andrew. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* (Cambridge, England). 121. 4203-14. n.d.
- Schwartz RJ, Olson EN. Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription. (1999) *Development*. 126(19):4187-92. n.d.
- Shimazono Y. The state of the international organ trade: a provisional picture based on integration of available information. *Bull World Health Organ.*, 2007,85(12):955–962. doi:10.2471/blt.06.039370. n.d.
- Sim YJ, Kim MS, Nayfeh A, et al. 2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports*. 2017, και 8(5):1312–1328. doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.001. n.d.
- Sissman, Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: Comparative chronology1970. n.d.
- Smith D.R. (1993) Restriction Endonuclease Digestion of DNA. In: Murphy D., Carter D.A. (eds) *Transgenesis Techniques. Methods in Molecular Biology™*, vol 18. Humana Press. n.d.
- Spermatogenesis — Fertilization — Contraception - Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction | S. Nieschlag | Springer. n.d.
- T.J. Lints, L.M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons, R.P. Harvey. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development* 1993 119: 419-431. n.d.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006, και 126(4):663–76. n.d.
- Tasic, B. et al. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 7902–7907 (2011). n.d.
- Theunissen TW, BE Powell, H Wang, M Mitalipova, DA Faddah, J Reddy, ZP Fan, D Maetzel, K Ganz, et al. (2014). Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naïve human pluripotency. *Cell Stem Cell* [Epub ahead of print]. n.d.
- Tolosa L, Caron J, Hannoun Z, et al. Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Res Ther* 2015, και 6(1):246. n.d.
- Usui J, T Kobayashi, T Yamaguchi, AS Knisely, R Nishinakamura and H Nakauchi. (2012). Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *Am J Pathol* 180:2417–2426. n.d.

- Usui, Jo-ichi et al., Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *The American Journal of Pathology* 2012, Volume 180, Issue 6, 2417 – 2426. n.d.
- Vegas AJ, Veiseh O, Gürtler M, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 2016, και 22(3):306–11. n.d.
- Venetia A. Saunders (6 December 2012). *Microbial genetics applied to biotechnology: principles and techniques of Gene Transfer and Manipulation*. Springer. ISBN. 9781461597964, n.d.
- Wagers AJ, Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639–648. n.d.
- Watson JD (2007). *Recombinant DNA: genes and genomes: a short course*. San Francisco: W.H. Freeman. ISBN. 978-0-7167-2866-5., n.d.
- Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 2005, και 85:635–678. n.d.
- Wood AJ, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*. 2011, και 333:307. [PubMed: 21700836]. n.d.
- Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 2017, και 168(3):473–486.e15. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.036. n.d.
- [www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2010.pdf](http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2010.pdf). n.d.
- Xu X, Yin Z, Hudson JB, Ferguson EL, Frasch M. Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the Drosophila mesoderm. *Genes Dev.* 1998, και 12(15):2354–2370. doi:10.1101/gad.12.15.2354. n.d.
- Y. Kohara, in *Encyclopedia of Genetics*, 2001. n.d.
- Yamaguchi, T., Sato, H., Kato-Itoh, M. et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542, 191–196 (2017) doi:10.1038/nature21070. n.d.
- Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007, και 318(5858):1917–20. n.d.
- Yu Liu & Robert J Schwartz (2013) Transient Mesp1 expression, *Transcription*, 4:3, 92-96, DOI: 10.4161/trns.24588. n.d.
- Zaza A, Rosen M: An introduction to cardiac electrophysiology. Taylor & Francis, 2000. n.d.
- Zhu, F. et al. DICE, an efficient system for iterative genomic editing in human pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 42, e34. n.d.

Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης, 3η έκδοση, Jonathan M.W Slack. n.d.